

UCA-FC
Biotecnología
D 542
C.1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias



Estudio de proteómica comparativa de modelos de
infección por inyección e inmersión estática de
Pseudomonas aeruginosa PAO1 en *Danio rerio* (pez cebra)

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología
Molecular

FRANCISCO JAVIER DÍAZ PASCUAL

Director del Seminario de Título: Dr. Francisco P. Chávez

Septiembre, 2015

Santiago - Chile



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 Titulo, presentado por el Sr. Francisco Javier Díaz Pascual.

“Estudio de proteómica comparativa de modelos de infección por inyección e inmersión estática de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en *Danio rerio* (pez cebra).”

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

Director Seminario de Título:

Dr. Francisco P. Chávez

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Dr. Miguel Allende

Evaluador:

Dr. Andrés Marcoleta



Santiago de Chile, 17 de Septiembre de 2015.

BIOGRAFÍA



Nací el 12 de Diciembre de 1991 en Punta Arenas. A los 6 años ingresé al Colegio Cruz del Sur en Punta Arenas donde cursé tanto la enseñanza básica como la enseñanza media. Durante este período siempre estuve interesado en las ciencias biológicas y exactas.

El 2010 ingresé a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Durante el primer año de estudios, atraído por la investigación, realicé cortas pasantías en los laboratorios del Dr. Julio Alcayaga y la Dra. Lorena Norambuena.

Con el fin de aprender e investigar en el área de la microbiología, el año 2012 ingresé al laboratorio del Dr. Francisco Chávez donde he permanecido, a veces intermitentemente, hasta la fecha y fue allí donde realicé mi seminario de Título.

El año 2013 obtuve el grado de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular y egresé de la correspondiente carrera profesional en 2014.

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de esta tesis me ha ayudado y apoyado mucha gente, de los cuales estoy muy agradecido. Primero que todo, quiero agradecer a mi familia por apoyarme y entregarme afecto en todos los momentos complicados y por permitir que estudie en una Universidad tan lejos de mi ciudad natal. Quiero agradecer también a mis amigos por ser siempre un escape en momentos de estrés.

Quiero agradecer también al Dr. Francisco Chávez por permitirme entrar a su laboratorio, y entregarme en conjunto con un agradable ambiente de trabajo las herramientas, materiales y conocimientos, y ser un apoyo en la realización de esta tesis.

Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio por su paciencia, su apoyo y su simpatía en las incontables horas de trabajo juntos.

También deseo agradecer al Dr. Miguel Allende y a todos los integrantes de su laboratorio por permitirme trabajar con sus peces cebra y por enseñarme muchas cosas, sin lo cual este trabajo no hubiese sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , un patógeno oportunista.....	1
2. Modelos animales para estudiar la patogénesis bacteriana.....	3
3. El pez cebra como modelo de infección bacteriana.....	4
4. Estudio de la relación patógeno-hospedero en el pez cebra utilizando técnicas ómicas.....	7
5. Métodos de infección del pez cebra.....	8
6. Objetivo General.....	11
7. Objetivos Específicos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	12
2. Cuantificación de los niveles de píocianina y pioverdina.....	12
3. Mantenimiento de larvas de pez cebra.....	14
4. Infección de peces cebra con <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión estática.....	14
5. Infección de peces cebra con <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección y visualización de inflamación.....	15
6. Monitoreo de la infección y curvas de sobrevivencia.....	16
7. Selección de condición para estudio de proteómica comparativa.....	17
8. Proteómica comparativa.....	17
9. Análisis de proteómica comparativa.....	19
3. RESULTADOS.....	21
1. Cuantificación de píocianina y pioverdina mediante espectrometría.....	21
2. Ensayos de infección de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por medio de inmersión estática.....	24
3. Ensayos de infección de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por medio de inyección en la arteria caudal.....	26
4. Estudio de proteómica comparativa.....	31
1. Análisis de enriquecimiento de proteínas aumentadas o disminuidas en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por inyección o inmersión con respecto al control.....	34
2. Análisis de enriquecimiento de proteínas aumentadas o disminuidas solo en una condición.....	35
4. DISCUSIÓN.....	43
5. CONCLUSIONES.....	53

6. BIBLIOGRAFÍA.....	54
7. ANEXO.....	59

.....

.....

.....

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reportes previos de inyecciones en el sistema circulatorio del pez cebra con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	9
Tabla 2. Tabla 2. Análisis de enriquecimiento de grupos de proteínas con niveles cambiados en las larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión o inyección de acuerdo a vía....	37
Tabla suplementaria 1. Conteo de unidades formadoras de colonia de las suspensiones bacterianas utilizadas en los ensayos de inmersión.....	59
Tabla Suplementaria 2. Resultados de proteómica comparativa que se encontraban en una categoría de proceso biológico de el GO.....	60
Tabla suplementaria 3. Proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección e inmersión.....	60
Tabla suplementaria 4. Proteínas con niveles disminuidos en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección e inmersión.....	61
Tabla suplementaria 5. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección.....	62
Tabla suplementaria 6. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión.....	63
Tabla suplementaria 7. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección.....	65
Tabla suplementaria 8. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión.....	67
Tabla suplementaria 9. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección.....	68
Tabla suplementaria 10. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión.....	69
Tabla suplementaria 11. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados tanto en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección como en inyección.....	70
Tabla suplementaria 12. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección.....	71
Tabla suplementaria 13. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión.....	72
Tabla suplementaria 14. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos tanto en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección como en inyección.....	73
Tabla suplementaria 15. Marcadores de infección propuestos.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectros de absorción de la plocianina y pioverdina en PGS y PGS+P _i	22
Figura 2. Curvas de calibración de plocianina y pioverdina en medios PGS y PGS+P _i	23
Figura 3. Cuantificación de plocianina y pioverdina en sobrenadante de cultivos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	24
Figura 4. Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra expuestos a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 por medio de inmersión estática.....	25
Figura 5. Efectos de la infección por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por inmersión estática en el pez cebra.....	26
Figura 6. Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra expuestos a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 por inyección.....	27
Figura 7. Efectos de la infección por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por inyección en el pez cebra.....	28
Figura 8. Reclutamiento de neutrófilos en sitio de inyección con <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	29
Figura 9. Cuantificación de neutrófilos en circulación en peces cebra expuestos a <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por medio de inyección.....	31
Figura 10. Resultados de proteómica comparativa agrupado en subcategorías de de proceso biológica según la GO.....	33
Figura 11. Número de proteínas con niveles aumentados o disminuidos de acuerdo al método de exposición.....	36
Figura 12. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección.....	38
Figura 13. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión.....	39
Figura 14. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inyección.....	40
Figura 15. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas a <i>P. aeruginosa</i> por medio de inmersión.....	41
Figura 16. Marcadores de infección propuestos de acuerdo al método de exposición.....	42
Figura suplementaria 1. Ensayos de inmersión con pez cebra de la línea Tg(BACmpo:mCherry).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Concepto	Abreviatura
Unidades formadoras de colonia	UFC
Cromatografía líquida	LC
Días post-fertilización	dpf
Espectrómetro de masa	MS
Factores inducidos por hipoxia	HIF
Horas post inyección	hpi
Horas post-exposición	hpe
Horas post-fertilización	hpf
Luria-Bertani	LB
Metabolismo	Meta.
Moléculas de histocompatibilidad	MHC
Nematode growth medium	NGM
Preparación de muestras asistida por filtro	FASP
Presentación	Pres.
Procesamiento	Proc.
Receptor de reconocimiento de patrones	PRR
Regulación	Reg.
Revoluciones por minuto	rpm
Desoxicolato de sodio	SDC
Stop-and-go extraction	STAGE
Tampón fosfato salino estéril	PBS
Transcripción	Transc.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos oportunistas más frecuentes en humanos. Típicamente infecta pacientes heridos, quemados, inmunocomprometidos y/o con fibrosis quística.

Para estudiar la patogénesis de esta bacteria se han utilizado un gran número de modelos de hospederos alternativos. Particularmente, el pez cebra (*Danio rerio*) combina las ventajas de los modelos invertebrados y vertebrados, pues posee un sistema inmune similar al encontrado en mamíferos, son transparente y poseen un rápido desarrollo *ex-utero*.

Existen dos principales métodos de exposición del pez cebra a un patógeno bacteriano, la inyección y la inmersión estática. El primero consiste en inyectar las bacterias directamente en el pez y el segundo consiste en co-incubar al pez cebra en una suspensión bacteriana. Aun no está claro si la respuesta del pez cebra expuesto a *P. aeruginosa* por medio de estos dos métodos es similar y si genera los mismos efectos, ni menos aún qué ocurre en peces de 3 días post-fecundación (dpf) infectados con este patógeno, en la cual el sistema inmune innato ya se encuentra maduro, los peces han dejado el corión y abierto la boca.

En este trabajo se comparó la expresión génica global del pez cebra frente a una infección con *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inyección en la arteria caudal y por medio de inmersión estática. Esto se realizó mediante proteómica cuantitativa no isotópica (Q-exactive). Para esto, se compararon larvas de pez cebra de 3 dpf inyectadas con *P. aeruginosa* o larvas co-incubados con una suspensión de esta bacteria.

Del total de proteínas que cambiaron sus niveles de expresión en ambos métodos de exposición a *P. aeruginosa* PAO1 con respecto al control, destacan las categorías de ontología de procesos celulares de inducción de apoptosis (GO:0006917) y procesamiento y presentación de antígenos (GO:0019882). En otros análisis de enriquecimiento de las proteínas en base a la vía metabólica en la cual participan se encontró que las larvas expuestas mediante inmersión tenían sobrerrepresentada la vía respuesta a hipoxia por medio de activación de factores inducidos por hipoxia (P00030) con respecto al control. En contraste, al analizar la ontología de las proteínas que aumentaron exclusivamente sus niveles al comparar entre condiciones, se encontraron enriquecidas las proteínas del proceso celular de inflamación mediada por vías de señalización de quimloquinas y citoquinas (P00031) en los peces expuestos por medio de inyección. En los peces expuestos por medio de inmersión se encontraron enriquecidas las vías de señalización de integrina (P00034) y angiogénesis (P00005).

En este trabajo proponemos la expresión de los genes *mylka*, *chuk*, *cxcl11.6*, *cish* y *ifit11* como posibles nuevos marcadores de una infección de *P. aeruginosa* por medio de inyección; y los productos de los genes *col8a2*, *col14a1a*, *col5a2b*, *vwa1*, *fyna*, *fynb*, *raf1a* y *map2k4a* como posibles marcadores de una infección en el pez cebra por medio de inmersión estática.

Nuestros resultados de proteómica sugieren que ambas metodologías son apropiadas para estudiar la interacción hospedero-patógeno en el pez cebra. Sin embargo, y a pesar de los procesos similares, el método de inyección genera una respuesta inmune por medio inflamación la cual esta ausente en las larvas expuestas por medio de inmersión. En cambio, en estas hay una respuesta relacionada con la migración celular e hipoxia.

Finalmente, demostramos que la técnica de proteómica Q-exactive es una herramienta sólida para realizar estudios de la relación patógeno-hospedero en el pez cebra.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common opportunistic pathogens in humans. Typically infects patients wounded, burned, immunocompromised or with cystic fibrosis.

To study the pathogenesis of *P. aeruginosa*, alternative model hosts have been used. Particularly, zebrafish (*Danio rerio*) combines the advantages of invertebrates and vertebrates models. It has a similar immune system to the one that we can find in mammals, is transparent and develops fast *ex-utero*.

There are two main methods for the exposure of the zebrafish to a bacterial pathogen, injection and static immersion. The former involves the injection of the bacteria directly into the fish and in the latter the zebrafish is incubated in a bacterial suspension. It is still unclear if the response of zebrafish exposed to *P. aeruginosa* by these two methods is similar and there is few information of how is the response of 3 days post-fertilization (dpf) zebrafish larvae infected with this pathogen, when the innate immune system is already mature, the fish have left the corium and have opened their mouth.

In this work we compared the proteomic responses of zebrafish exposed to *P. aeruginosa* PAO1 through injection in the caudal artery and through static immersion. By using non-isotopic quantitative proteomics (Q-Exactive), we compared the proteome of 3 dpf zebrafish larvae incubated in a suspension of *P. aeruginosa* with the proteome of 3 dpf zebrafish larvae injected with this bacteria.

Proteins that changed their expression levels in both methods of exposure to *P. aeruginosa* PAO1 were classified using gene ontology categories that include the

biologic processes of induction of apoptosis (GO: 0006917) and antigen processing and presentation (GO: 0019882). In regard to the metabolic pathway, hypoxia response via HIF activation pathway (P00030) was enriched in the larvae exposed by static immersion. In contrast, when we analyzed the proteins that had their level up-regulated exclusively in each condition, we found that inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031) was enriched in the larvae exposed by injection, while the integrin signaling pathways (P00034) and angiogenesis (P00005) were exclusively enriched in the larvae exposed by immersion.

We propose the expression of the genes *mylka*, *chuk*, *cxcl11.6*, *cish* and *ifit11* as new markers of a response towards an exposure to *P. aeruginosa* by injection and the products of genes *col8a2*, *col14a1a*, *col5a2b*, *vwa1*, *fyna*, *fynb*, *raf1a* and *map2k4a* as markers of a response towards an infection by immersion.

Our results suggest that the response of the zebrafish exposed to *P. aeruginosa* by injection and static immersion are similar from a global perspective and both methods are appropriate to study host-pathogen interactions in this model. However, despite the similar response, the injection method generates an immune response by inflammation, which is absent in the larvae exposed by immersion. In contrast, in the latter condition there is a response related to cell migration and hypoxia.

Finally, we have demonstrated that Q-exactive is a solid proteomic platform for global host-microbe studies in zebrafish.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una γ -proteobacteria Gram-negativa aeróbica no-fermentativa con forma de bacilo. Es capaz de crecer en distintos sustratos desde suelos, pantanos y agua, hasta tejidos animales y vegetales (Hardalo & Edberg 1997). Posee una gran versatilidad metabólica, siendo capaz de crecer anaeróbicamente si hay nitrato presente. Consecuentemente con esto se estima que sobre el 8,4% de sus genes cumplen funciones regulatorias, un porcentaje elevado en comparación con otros genomas bacterianos secuenciados. Esta bacteria posee cerca de 300 sistemas de transporte en la membrana citoplásmica, donde alrededor de dos tercios de estos aparentemente cumplen funciones en el transporte de nutrientes y moléculas pequeñas. A pesar de tener un limitado crecimiento en azúcares y un bajo número de transportadores de estas moléculas, *P. aeruginosa* puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono, principalmente ácidos grasos. (Stover et al. 2000).

1.1. *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista

P. aeruginosa es uno de los patógenos oportunistas más frecuentes en humanos y una de las mayores causas de infecciones nosocomiales. Típicamente infecta pacientes heridos, quemados, inmunocomprometidos y/o con fibrosis quística (Folkesson et al. 2012). Se ha reportado que cerca del 80% de los pacientes con fibrosis quística y entre 25 a 34 años se encuentran infectados con esta bacteria, donde la mayoría de estos son colonizados de manera crónica a pesar de la tener una fuerte respuesta antiinflamatoria y estar expuestos a una terapia antibiótica (LiPuma 2010; Folkesson et al. 2012). Esta bacteria es, además, una de las principales causas

de bacteriemia en pacientes víctimas de quemaduras, pacientes con catéteres o respiradores. Es la causa del 35% de las muertes en pacientes con bacteriemia y del 69% de las muertes en pacientes con neumonía asociada a respiradores artificiales (Bodey & Bolivar 1983; Wunderink & Mendoza 2010).

En muchos casos erradicar infecciones causadas por esta bacteria es prácticamente imposible, dado que es un patógeno naturalmente resistente a múltiples drogas. Esto se debe a que posee enzimas codificadas en el cromosoma capaces de inactivar drogas, como β -lactamasas (Stover et al. 2000; Bert et al. 2002). Su resistencia intrínseca a antibióticos se debe también a la baja permeabilidad de su membrana externa y la presencia de un gran número de bombas de eflujo de antibióticos (Hancock 1998).

P. aeruginosa posee un gran número de factores de virulencia que le permiten causar daño, sobrevivir y/o colonizar al hospedero, entre ellos se encuentran los pigmentos pirocianina y pioverdina; enzimas líticas como elastasas, proteasas extracelulares, fosfolipasas; exotoxina A, ramnolípido, efectores del sistema de secreción tipo III, entre otros. La producción de estos es estrechamente controlada por diversos factores y complejas vías de señalización, entre ellos el medio de crecimiento de la bacteria (Chand et al. 2011).

En trabajos previos en nuestro laboratorio hemos encontrado que los únicos factores de virulencia que aumentan sus niveles de expresión en una condición de carencia de fosfato son la pioverdina y la pirocianina. Particularmente, las pioverdinas son un grupo de sideróforos fluorescentes producidos por distintas especies de *Pseudomonas* cuya función es captar hierro. Este pigmento es necesario para causar daño al hospedero en distintos modelos y es producido cuando hay poco hierro o fosfato en el medio en el cual se encuentra la bacteria. Cumple diversas funciones que

van desde la patogénesis hasta la señalización intracelular (Visca et al. 2007; Cornelis & Dingemans 2013). La piocianina por su parte es una fenacina de color azul producido únicamente por *P. aeruginosa* y cumple múltiples funciones. Participa en la captación de hierro, es tóxica para un gran grupo de organismos procariontes y eucariontes, y es uno de los mayores factores de virulencia contribuyendo tanto en infecciones agudas como crónicas. Es capaz de suprimir la proliferación de linfocitos y dañar los epitelios, en parte, al reprimir algunos inhibidores de proteasas (Jimenez et al. 2012; Cornelis & Dingemans 2013).

1.2. Modelos animales para estudiar la patogénesis bacteriana

Debido a su importancia médica y características como un buen modelo de estudio de un patógeno oportunista, la patogénesis de *P. aeruginosa* ha sido y continua siendo estudiada intensamente. Teniendo en cuenta que naturalmente *P. aeruginosa* es capaz de infectar diferentes hospederos, se han utilizado un gran número de modelos de hospederos alternativos y divergentes desde un punto de vista evolutivo, entre ellos amebas, plantas, nemátodos, insectos y roedores (Mahajan-Miklos et al. 2000; Pukatzki et al. 2002). Lógicamente, cada modelo presenta diferentes ventajas y desventajas. Por una parte, los modelos invertebrados, como *Caenorhabditis elegans*, son más fáciles de modificar y seguir genéticamente que los modelos murinos. Además, el corto ciclo de vida y el reducido tamaño de los modelos invertebrados permite realizar experimentos que requieren un gran número de animales, lo cual es muchas veces imposible de realizar en roedores debido a los altos costos y espacios requeridos. Sin embargo, el principal problema de modelar infecciones humanas en modelos invertebrados es la gran disimilitud entre el sistema inmune de vertebrados e invertebrados. Modelos invertebrados como *Drosophila*

melanogaster y *C. elegans* carecen de inmunidad adaptativa, un verdadero sistema del complemento, o la complejas líneas celulares del sistema inmune características de humanos (Clatworthy et al. 2009).

A pesar de que un gran número de factores de virulencia son necesarios para causar una infección en modelos evolutivamente divergentes, se ha encontrado algunos de estos son necesarios solo en algunos modelos. Un ejemplo de esto es el sistema de secreción tipo III, el cual es necesario para causar infecciones en modelos murinos e insectos, pero no en *C. elegans* (Alan et al. 2001). Debido a ejemplos como este y a las claras diferencias en el sistema inmune entre vertebrados e invertebrados, es necesario utilizar modelos que recapitulen las características de una respuesta humana frente a *P. aeruginosa* con el fin de estudiar mejor la patogénesis de esta bacteria y que a la vez permitan llenar el espacio que existe entre los modelos invertebrados y murinos.

1.3 El pez cebra como modelo de infección bacteriana

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleosteo que ha cobrado importancia como modelo de un hospedero animal para estudiar la patogénesis bacteriana, dado que es un vertebrado que posee ventajas características de los modelos invertebrados. Ha sido utilizado como hospedero alternativo para estudiar la patogénesis de múltiples bacterias, virus y hongos, utilizando diversos estadios del desarrollo del pez cebra y variados métodos de infección (Goody et al. 2014; Kanwal et al. 2014). Al igual que los modelos invertebrados, es relativamente fácil de modificar, se pueden utilizar metodologías de genética clásica y genética reversa (Trede et al. 2004). En este organismo es posible el uso de morfollinos y moléculas pequeñas para regular la expresión génica de manera espacio-temporal (Esengil et al. 2007; Kok et al. 2015).

La alta fecundidad del pez cebra, el rápido desarrollo *ex-utero* y su pequeño tamaño permite realizar ensayos que requieren un gran número de animales, como por ejemplo selección de drogas o mutantes. Además, las larvas y embriones del pez cebra son transparentes, lo que permiten el seguimiento de infecciones *in vivo* y, la fácil utilización y visualización de líneas transgénicas con poblaciones celulares marcadas con proteínas fluorescentes.

Por otro lado, el pez cebra también comparte algunas ventajas de los modelos murinos. La principal ventaja es que posee un sistema inmune sumamente similar al encontrado en mamíferos en diversos aspectos. Se estima que alrededor del 70% de los genes humanos tienen al menos un claro ortólogo en el pez cebra (Howe et al. 2013). Al igual que los mamíferos, el pez cebra expresa receptores de tipo Toll y otros tipos de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) capaces de reconocer patrones conservados en patógenos (Kanwal et al. 2014), posee un sistema del complemento, citoquinas pro-inflamatorias, proteínas de fase aguda, y un sistema inmune innato y adaptativo (Lin et al. 2007; Meijer et al. 2004; Boshra et al. 2006; Clatworthy et al. 2009).

A nivel celular, en el pez cebra se encuentran análogos a casi todos los tipos celulares presentes en la sangre de mamíferos (de Jong & Zon 2005). En el pez cebra se han encontrado líneas celulares que contribuyen al sistema inmune innato que incluyen a las células fagocíticas (como neutrófilos, monocitos y macrófagos), las células que producen y secretan mediadores de inflamación (como los basófilos, mastocitos y eosinófilos) y las células que presentan antígenos al sistema adaptativo (las células dendríticas). Sin embargo, no se han encontrado células que cumplan la función de los "natural killers", de las cuales solo se han encontrado indicadores de su existencia basado a la presencia de genes homólogos a los receptores encontrados

en mamíferos (Iwanami 2014; Kanwal et al. 2014).

Se han observado macrófagos capaces de endocitar microorganismos en peces cebra desde 28 horas post-fertilización (hpf) y neutrófilos funcionales en peces de 32 a 48 horas post-fertilización (Herbomel et al. 1999; Harvie & Huttenlocher 2015).

Con respecto al sistema inmune adaptativo, de las 5 clases de inmunoglobulinas presentes en mamíferos (IgM, IgD, IgG, IgE, e IgA), sólo IgM e IgD están presentes en teleósteos. Sin embargo, estos presentan una inmunoglobulina denominada IgZ, la cual podría cumplir un rol similar a IgA (Iwanami 2014).

Los teleósteos presentan todas las cadenas de los receptores T conocidas en mamíferos, y la mayoría de estos también presentan células T que expresan los marcadores CD8 o CD4. Los linfocitos T del pez cebra reconocen los antígenos presentados en el contexto de los complejos mayores de histocompatibilidad de clase I y II. A pesar de que aun no se han encontrado células T reguladoras *in vivo*, se ha encontrado un gen similar al que codifica para Foxp3 en humanos, el cual es un factor de transcripción clave en la generación de esta línea celular (Iwanami 2014).

Al igual que los mamíferos, los peces mandibulados que incluyen a los teleósteos, poseen sistemas de recombinación de genes para el ensamblaje de los receptores de antígenos (como inmunoglobulinas y receptores de células T) que le permiten reconocer una gran variedad de antígenos (Flajnik & Kasahara 2010).

A diferencia del sistema inmune innato que se encuentra completamente funcional en los primeros días de la embriogénesis, el sistema inmune adaptativo se encuentra funcional a partir de las 4 a 6 semanas post-fertilización (Trede et al. 2004). Esta segregación temporal permite estudiar ambos componentes del sistema inmune de manera diferencial, donde las larvas del pez cebra poseen solo el sistema inmune innato.

1.4. Estudio de la relación patógeno-hospedero en el pez cebra utilizando técnicas ómicas.

Una aproximación para los estudios hospedero-patógeno en los modelos alternativos de infección como el pez cebra son los estudios ómicos. Las técnicas "ómicas", como la proteómica o la transcriptómica, nos permiten entender y analizar procesos desde un punto de vista global y a partir de estos comprender los ajustes moleculares y celulares que suceden durante la infección tanto en la bacteria como en el hospedero.

La proteómica cuantitativa permite identificar y cuantificar las proteínas presentes, y por lo tanto, analizar las diferencias de los niveles de proteínas entre dos o más muestras. Esto se puede realizar utilizando espectrometría de masas la cual permite determinar los péptidos con alta resolución. Q-exactive es una de las herramientas de proteómica más avanzadas, esta basada en un espectrómetro de masas que utiliza un filtro de masa de cuadrupolo asociado a un analizador Orbitrap, lo que permite utilizar una transformada de Fourier mejorada, duplicando la resolución del espectrómetro de masas (Michalski et al. 2011).

De esta forma es posible comprender el programa molecular de respuesta a los patógenos en estos hospederos y los ajustes que también hacen las bacterias para causar daño en el animal. Esto nos permite encontrar tanto factores de virulencia de la bacteria como encontrar posibles marcadores moleculares que nos permitan un seguimiento de la infección. Existen reportes de la utilización de la transcriptómica para analizar la infección bacteriana en larvas del pez cebra utilizando los patógenos *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* (van Soest et al. 2011), *Salmonella enterica* (Stockhammer et al. 2009), *Mycobacterium marinum* y *Staphylococcus*

epidermidis (Veneman et al. 2013). Sin embargo, a nuestro conocimiento, no hay reportes del estudio de una relación patógeno-hospedero utilizando proteómica en larvas del pez cebra. A diferencia de la transcriptómica, la proteómica permite obtener y analizar distintas variantes de *splicing* de los transcritos, y dado que las proteínas se encuentran río abajo del dogma central de la biología molecular con respecto al ARN mensajero los cambios observados en el proteoma probablemente reflejen más fielmente a lo que esta sucediendo en el organismo de estudio.

1.5 Métodos de infección del pez cebra

Los modelos de infección bacteriana en el pez cebra difieren principalmente en el tamaño del inóculo bacteriano, la edad del pez cebra y el método de exposición de este al patógeno.

Existen dos principales métodos de exposición del pez cebra a un patógeno bacteriano, denominados inyección e inmersión estática. La inyección es el método más utilizado y consiste en inyectar las bacterias a través de una pequeña aguja directamente en el pez cebra. La principal ventaja de este método es que dependiendo del sitio de inyección la infección puede ser compartimentada o sistémica. Si las bacterias son inyectadas directamente en la circulación, en lugares como el conducto de Cuvier o la vena caudal, la infección será sistémica. En cambio, si estas son inyectadas en lugares como el rombencéfalo, el músculo de la cola o la vesícula ótica, la infección será local (Benard et al. 2012). Sin embargo, el método de inyección es sumamente invasivo y debido a su dificultad técnica no permite realizar estudios a gran escala con facilidad. Este método ha sido utilizado para estudiar la patogénesis de numerosos patógenos humanos, y particularmente *P. aeruginosa* por medio de una infección sistémica en embriones de pez cebra con 26, 28, 48 y 50 hpf, y en diversos

sitios de inyección como la vena caudal, la vesícula ótica, el conducto de Cuvier o en el valle circulatorio del vitelo (Clatworthy et al. 2009; Brannon et al. 2009; Llamas et al. 2009; Phennicie et al. 2010; Chand et al. 2011; Reen et al. 2013; Ruyra et al. 2014)

(Tabla 1).

Tabla 1. Reportes previos de inyecciones en el sistema circulatorio del pez cebra con *P. aeruginosa* PAO1. Se ilustran los reportes previos de inyecciones con *P. aeruginosa* PAO1 en el sistema circulatorio de acuerdo a las horas post-fertilización del pez cebra (hpf), el sitio de inyección, las horas post-inyección (hpi) y el porcentaje de supervivencia observado.

hpf	sitio de inyección	UFC	hpi (Porcentaje de supervivencia)	Referencia
26	"Blood island"	300	24 (60%), 48(50%)	(Reen et al. 2013)
28-30	Vena caudal	100	48 (90%)	(Llamas et al. 2009)
		650	24 (60%), 48(50%)	
		1300	24 (10%)	
50	Vena caudal	200	48 (95%)	(Brannon et al. 2009)
		800	48 (45%)	
		2400	24 (0%)	
Adultos	Intraperitoneal	$8 \cdot 10^7$	24 (40%), 48(25%)	(Ruyra et al. 2014)

Adicionalmente, se ha utilizado el método de inmersión estática para estudiar la patogénesis bacteriana en el pez cebra, donde embriones del pez cebra son co-incubados con las bacterias, razón por la cual permite realizar estudios a gran escala. Este método es menos invasivo, generalmente causa menos mortalidad y es más similar a lo observado en ambientes naturales, ya que las bacterias son agregadas al medio y no inyectadas en el pez. Se ha utilizado con distintas especies bacterianas entre ellas *Flavobacterium columnare* (Chang & Nie 2008), *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. tarda* (Pressley et al. 2005; van Soest et al. 2011). Existe poca información en el uso de esta técnica para estudiar la patogénesis de *P. aeruginosa*, ya que la mayoría de

los reportes la utiliza para el estudio de la microbiota intestinal de peces gnotobióticos (Rawls et al. 2004; Rawls et al. 2006). Sin embargo, la inmersión estática ha sido desarrollada exitosamente en nuestro laboratorio con el fin de estudiar la patogénesis de esta bacteria en larvas de pez cebra de 3 días post-fertilización (dpf) (Ortiz-Severín 2013).

Hasta el momento y a nuestro conocimiento solo hay un reporte de un estudio comparativo de la respuesta del pez cebra expuesto a un patógeno por medio de estos dos métodos. El estudio fue utilizando técnicas de transcriptómica y se utilizaron peces cebra de 25 hpf, edad a la cual los peces aun no han dejado naturalmente el corión, no han abierto la boca ni poseen el sistema inmune innato completamente desarrollado. Las peces de 25 hpf fueron expuestos a *E. tarda* por medio de estos dos métodos. En este estudio se concluyó que el método de inyección en estas condiciones generaba una fuerte respuesta inflamatoria. En cambio, el método de exposición por medio de inmersión estática generaba una respuesta similar a la respuesta frente a un daño epitelial o de tejidos, o frente a toxinas. Cabe destacar que en este estudio también se hizo un análisis del transcriptoma de embriones del pez cebra de 25 hpf expuestos a *P. aeruginosa* por medio de inmersión estática, pero no se comparó con el método de inyección y no se observó mortalidad (van Soest et al. 2011).

Aun no está claro si la respuesta del pez cebra expuesto a *P. aeruginosa* por medio de estos dos métodos es diferente, ni tampoco si cada uno de estos métodos de infección puede ser un buen modelo para diferentes tipos de infecciones, ni menos aún que ocurre en peces de 3 dpf infectados con este patógeno, donde ya se encuentra maduro el sistema inmune innato, estos ya han dejado el corión y abierto la boca (Rawls et al. 2007). Según nuestro conocimiento no existen estudios que utilicen

el método de inyección de *P. aeruginosa* para estudiar una infección sistémica utilizando peces de 3 dpf.

Elucidar las similitudes y diferencias de la respuesta del pez cebra expuesto a *P. aeruginosa* por medio de estos dos métodos permitirá darle aun mayor robustez a estos para el estudio de la patogénesis de *P. aeruginosa* y determinar si cada una de estas formas de exposición permite modelar de mejor manera distintos tipos de infecciones. Por lo que puede ser un aporte en el conocimiento para poder generar nuevas terapias y formas de tratar las infecciones generadas por esta bacteria.

1.5. Objetivo General:

Comparar las diferencias a nivel proteómico de larvas del pez cebra de 3 dpf expuestas a *P. aeruginosa* mediante inmersión estática e inyección.

1. 6. Objetivos Específicos:

1. Estandarizar los protocolos de inyección e inmersión para la toma de muestras del proteoma de larvas del pez cebra expuestos a *P. aeruginosa* PAO1.
2. Establecer las condiciones a las cuales se realizará la toma de muestras para el estudio de proteómica comparativa, evaluando la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y las curvas de supervivencia de las larvas de pez cebra expuestas a *P. aeruginosa* PAO1.
3. Analizar y determinar las diferencias a nivel proteómico entre las larvas del pez cebra infectadas mediante inyección e inmersión.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Se utilizó la cepa bacteriana *P. aeruginosa* PAO1 para realizar todos los ensayos (Jacobs et al. 2003). Como control de una bacteria no patogénica se utilizó *Escherichia coli* DH5 α (van Soest et al. 2011).

Para realizar todos los experimentos, las bacterias se crecieron en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl a pH 7). El medio LB sólido (LB-agar) se preparó en placas Petri con medio LB y agar 1,5%. Para estos mismos ensayos también se utilizó un derivado del medio Nematode growth medium (NGM) denominado PGS (2,5 g/L de peptona, 3 g/L de NaCl, 1 mM de MgSO₄, 1 mM de CaCl₂, 2% de glicerol a pH 6). Se ha reportado que la virulencia de las bacterias se ve aumentada en una condición de carencia de fosfato (Long et al. 2008; Ortiz-Severín 2013), por lo que para algunos ensayos al medio PGS se le agregó tampón K-Ph, equivalente a 25 mM de fosfato a pH 6, este medio se denominó PGS+P_i.

2.2 Cuantificación de los niveles de piocianina y pioverdina.

Para la medición de la producción de los pigmentos piocianina y pioverdina se utilizó la capacidad de estos para absorber luz a distintas longitudes de onda. Para determinar el máximo de absorbancia se realizó un espectro de absorbancia entre 300 y 500 nm de soluciones de piocianina (12,5 μ g/mL) y pioverdina (90 μ g/mL) puras (Sigma-Aldrich) en los medios PGS y PGS+P_i, en placas de 96 pocillos y utilizando un equipo Synergy 2 (Biotek). Esto se realizó en duplicado y los valores de absorbancia

de los medios PGS y PGS+P_i fueron restados a las absorbancias obtenidas. Para la piocianina se observó un máximo de absorbancia a los 311 nm en los dos medios utilizados. En cambio, para la pioverdina el máximo de absorbancia fue registrado a 383 nm en ambos medios.

Utilizando estos picos de absorbancia se realizó una curva de calibración, midiendo la absorbancia de soluciones estándar en los medios PGS y PGS+P_i. Para piocianina se utilizó un rango de concentraciones desde 0 hasta 15 µg/mL. Para pioverdina el rango de concentraciones utilizado fue desde 0 hasta 100 µg/mL. Se realizaron las mediciones en triplicado. Las curvas de calibración generadas se utilizaron para la cuantificación de estos pigmentos en los sobrenadantes de los cultivos de *P. aeruginosa*.

Para evaluar la producción de piocianina y pioverdina por *P. aeruginosa*, las bacterias fueron crecidas en medio LB a 37°C y 180 rpm durante la noche. Este cultivo fue centrifugado a 8,000 g por 10 minutos y resuspendido en PGS, esto se repitió 3 veces. Esta solución bacteriana se utilizó para inocular un matraz con medio PGS, o PGS+P_i en una proporción 1:100 el cual fue crecido a 37°C y 180 rpm por 18 horas. Luego de transcurridas las 18 horas se le midió la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) y se centrifugó el cultivo a 8,000 g por 10 minutos. Al sobrenadante se le midió la absorbancia a 311 nm y 383 nm. Todas las mediciones de absorbancia se estandarizaron por la DO₆₀₀ de los cultivos. Para determinar si había una diferencia significativa se utilizó un ANOVA de una vía seguido por un post-test utilizando la corrección de Šídák en el software GraphPad Prism versión 6.00 para Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.



2.3. Mantenimiento de larvas de pez cebra.

Se utilizó las línea de peces silvestres Tab5 y la línea de peces Tg(BACmpo:mCherry), la cual posee los neutrófilos marcados con la proteína fluorescente roja mCherry (Renshaw et al. 2006). Los embriones fecundados se incubaron en medio embrionario E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, pH 7) con azul del metileno al 0,1% a 28 °C en un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad hasta las 72 hpf. El medio en el cual se encontraban inmersos los embriones fue cambiado diariamente por medio fresco.

2.4. Infección del pez cebra con *P. aeruginosa* por medio de inmersión estática.

Se realizaron cultivos de noche de *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5α en medio LB. Estos se lavaron 3 veces con medio PGS. Luego, 500 μL se utilizaron como inóculo para 50 mL de PGS o PGS+P_i. Estos cultivos fueron crecidos por 18 horas a 37°C y 180 rpm. Se centrifugaron por 10 min a 6000 rpm y el precipitado celular se resuspendió en medio E3 estéril. Esto se repitió 3 veces. Luego, se midió la DO₆₀₀ ajustándose posteriormente a 1,4. Se tomaron alícuotas de cada suspensión para luego calcular el título bacteriano en LB agar.

Los peces de 72 hpf se lavaron 3 veces con medio E3 estéril. La incubación con bacterias se realizó en triplicado en placas plásticas de 6 pocillos, cada uno de los cuales contenía 10 larvas. Para *P. aeruginosa* a cada pocillo se le agregó un volumen de las suspensiones bacterianas con DO₆₀₀ de 1,4, con el fin de tener una DO₆₀₀ final de 0,7 correspondientes a $\sim 5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), 0,525 correspondientes a $\sim 3,8 \times 10^8$ UFC/mL, o 0,35 correspondientes a $\sim 2,5 \times 10^8$ UFC/mL en un volumen final de 8 mL. Para *E. coli* se utilizó solo la condición equivalente a $\sim 5 \times 10^8$ UFC/mL. Se utilizó E3 estéril como control. En placas de LB-agar

se determinó y corroboró el título bacteriano (Tabla suplementaria 1). La incubación se realizó por 30 horas a 20°C. Todo esto se realizó según lo reportado previamente en el laboratorio, con ligeras variaciones (Ortiz-Severín 2013).

2.5. Infección del pez cebra con *P. aeruginosa* por medio de inyección y visualización de inflamación.

Se realizaron cultivos de noche de *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5α en medio LB. Estos se lavaron 3 veces con medio PGS. Luego, 500 µL se utilizaron como inóculo para 50 mL de PGS o PGS+Pi. Para *E. coli* sólo se utilizó PGS. Estos cultivos fueron crecidos por 18 horas a 37°C y 180 rpm. Se centrifugaron por 10 min a 6000 rpm y el precipitado celular se resuspendió en tampón fosfato salino estéril (PBS; 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HP0₄, 1,8 mM de KH₂P0₄, ph 7,4). Esto se repitió 3 veces. Luego, se midió la DO₆₀₀ ajustándose posteriormente a 5,0. Se tomaron alícuotas de cada suspensión para luego calcular el título en LB agar.

Las larvas de 3 dpf se durmieron con ácido etil éster 3-aminobezoico metanosulfónico (tricaína, Sigma-Aldrich) al 0,01% p/v y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión con tricaína al 0,01% p/v con el fin de inmovilizarlas. Por la duración de la inyección bacteriana las larvas se mantuvieron bajo anestesia con tricaína. Se inyectaron 3-5 nl de la solución bacteriana de DO₆₀₀ 5,0, equivalente a 2000-6000 UFC, en la arteria caudal por encima de la cloaca. Se utilizó medio PBS como control. Para poder corroborar el número de UFC inyectadas, se inyectó el volumen utilizado en PBS estéril y luego se determinó el número de UFC utilizando placas de LB-agar. Los peces inyectados se mantuvieron a 20 °C por 72 horas.

Los capilares a partir de los cuales se fabrican las agujas de inyección están hechos de borosilicato, poseen un diámetro externo de 1,2 mm y un diámetro interno de 0,69 mm.

En el caso de las larvas *Tg(BACmpo:mCherry)* estas se visualizaron bajo una lupa de fluorescencia Olympus MVX10 (Japón) a 2, 4, 7, 22 y 28 horas post inyección (hpi). Para determinar el número de neutrófilos en circulación se durmieron las larvas en tricafina al 1% por 2 minutos y se contó el número de neutrófilos que pasaban por el sitio de inyección a través de la arteria caudal durante un minuto (Deng et al. 2012; Walters et al. 2010). Para determinar si había una diferencia significativa se utilizó un ANOVA de dos vías y un análisis post-test de comparaciones múltiples utilizando la corrección de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 6.00 para Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

2.6. Monitoreo de la infección y curvas de supervivencia

Los peces se inspeccionaron visualmente para contabilizar los eventos de muerte, definidos como el cese total del movimiento cardíaco, y cualquier cambio en el comportamiento o fisiología normal de las larvas utilizando una lupa Motic (China).

Luego de registrar el número de muertes en larvas incubadas por 30 horas para los ensayos de inmersión estática y por 72 horas para los ensayos de inyección, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Estas curvas fueron realizadas con el software GraphPad Prism versión 6.00 para Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

2.7. Selección de condición para estudio de proteómica comparativa.

Para analizar el proteoma del pez cebra se utilizaron 10 larvas infectadas con *P. aeruginosa* PAO1 a 22 horas post-exposición (hpe) para cada método y los controles correspondientes. En el caso de la inmersión se seleccionó la condición donde las larvas fueron expuestas a $\sim 2,5 \times 10^8$ UFC/mL de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en PGS+P_i. Para la inyección se utilizaron larvas inyectadas con 2,000-6,000 UFC de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en PGS. Estas se congelaron en un baño de metanol a -80°C. En el caso de las larvas expuestas por medio de inmersión estática estas se lavaron previamente con E3 estéril con el fin de remover las bacterias del medio. Las muestras fueron enviadas para la determinación del proteoma total mediante Q-exactive a la empresa Bioproximity, LLC (EE.UU)

2.8 Proteómica comparativa.

La proteómica comparativa fue llevada a cabo por la empresa Bioproximity, LLC (EE.UU) por medio de un sistema de cromatografía líquida asociada a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS) utilizando el siguiente protocolo.

La denaturación de proteínas, digestión y la desalación de las muestras fue llevada a cabo utilizando el método de preparación de muestras asistida por filtro (FASP, filter-assisted simple preparation)(Wisniewski et al. 2009)). Las muestras fueron resuspendidas en una solución de 1% desoxicolato de sodio (SDC), 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM DTT, sonicadas brevemente y luego incubadas a 40°C con agitación (100 rpm) por 20 min. Las muestras se centrifugaron para clarificar el sobrenadante y este se transfirió a un filtro de 30 kDa MWCO (Millipore) y centrifugado a 13000g por 30 min. El resto de la muestra se resuspendió en 1% SDC, 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, y luego fue alquilada en iodoacetamida 15 mM. La concentración de SDC

fue reducida al 0,1%. Las muestras fueron digeridas utilizando tripsina (en una relación enzima-sustrato de 1:100) durante la noche a 30°C y con agitación (1000 rpm). Los péptidos digeridos fueron recolectados por centrifugación. Alrededor de 20 microgramos de los péptidos fueron desalinizados utilizando el método de "reversed phase stop-and-go extraction (STAGE) tips" (Rappsilber et al. 2007). Los péptidos fueron eluidos utilizando acetonitrilo al 80%, ácido acético al 0.5% y liofilizados en un SpeedVac (Thermo Savant) durante 1 hora. Cada digestión fue analizada por medio de UHPLC-MS/MS utilizando un sistema Easy-nLC 1000 UHPLC (Thermo). La fase móvil A fue 97,5% agua milipura, 2% acetonitrilo, 0,5% ácido acético. La fase móvil B fue 99,5% acetonitrilo, 0,5% ácido acético. El gradiente de 240 min de la cromatografía líquida (LC) corrió desde 0% B a 35% B durante 210 min, luego a 80% B por los restantes 30 min. Las muestras fueron cargadas directamente en la columna. La columna tenía 50 cm x 75 µm de diámetro interno en un sistema de "2 micron C18 media" (Thermo Easy Spray PepMap). La LC fue conectada a un sistema de espectrómetro de masa cuadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Fisher) por medio de un sistema de ionización por nano-electrospray mediante un calentador de columna integrado (Thermo Easy Spray source). La columna fue calentada a 50°C. Se aplicó un voltaje de electrospray de 2,2 kV. El espectrómetro de masa (MS) fue programado para adquirir el espectro de masas de los 20 iones superiores en el rango completo desde 400 a 1200 m/z. La exclusión dinámica se estableció a 15s, se excluyeron los iones con una carga, y el ancho de aislamiento se estableció a 1,6 Da, la resolución total del MS a 70000 y la resolución del MS/MS a 17500. La colisión de energía normalizada se estableció en 25, el control de ganancia automático en 2×10^5 , el máximo de llenado del MS a 20 ms y del MS/MS a 60 ms. Los archivos mzML entregados fueron convertidos a MGF utilizando el Peak Picker HiRes tool, parte del

framework OpenMS. Todas las búsquedas fueron realizadas en el servicio web de Amazon Web “Services-based cluster compute instances” utilizando la interfaz Proteome Cluster interface. Todas las búsquedas requerían un tolerancia del precursor de masa de 10 ppm, una tolerancia de masa de los fragmentos de 0,02 Da, un corte triptico estricto, hasta 2 cortes faltantes, modificación en la cisteína producto de la alquilación, modificación variable de la metionina y valores esperados de las proteínas (E-value) de 0,0001 o menor. Los archivos MGF files fueron buscados utilizando las librerías de secuencias más recientes en la base de datos UniProtKB, utilizando los algoritmos de puntuación nativa y el k-score, y por medio del algoritmo de búsqueda de espectrometría de masa OMSSA (Craig & Beavis 2004; MacLean et al. 2006; Geer et al. 2004). Los resultados fueron analizados y los sets de proteínas no redundantes fueron determinados utilizando Proteome Cluster basado en reglas previamente publicadas (Slotta et al. 2010). Las características isotópicas basadas en MS1 fueron detectadas y los picos de área fueron calculador utilizando la herramienta FeatureFinderCentroid parte del framework de OpenMS framework. Las proteínas encontradas requirieron tener 1 o más péptidos únicos en las muestras analizadas y un E-value de 0,0001 o menor.

2.9 Análisis de proteómica comparativa

En primer lugar, se compararon los niveles de las proteínas de las larvas inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inyección con los niveles de estas en larvas inyectadas con PBS estéril. Adicionalmente, se comparó el nivel de las proteínas detectadas en larvas expuestas a *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inmersión estática con el de larvas inmersas en E3 estéril. Se consideró como significativa la variación de una proteína cuando su tasa de cambio fuera superior a

+1,5 o inferior a -1,5. Se determinaron las proteínas con niveles de expresión aumentados o disminuidos en las larvas inoculadas por medio de inyección o inmersión.

Mediante el uso del software Panther (Mi, Muruganujan & Thomas 2013; Mi, Muruganujan, Casagrande, et al. 2013) las proteínas con una variación significativa fueron agrupadas y categorizadas de acuerdo a su función biológica, según la ontología de los genes que las codifican en la base de datos de Panther (<http://pantherdb.org>).

Se determinaron las proteínas que exclusivamente aumentaron sus niveles en las larvas inyectadas con respecto su control y las proteínas que exclusivamente aumentaron sus niveles en las larvas expuestas por medio de inmersión con respecto su control y aquellas que aumentaron sus niveles en ambas condiciones. Se realizó lo mismo para las proteínas que disminuyeron sus niveles.

Para analizar las proteínas con los niveles cambiados en distintas condiciones se utilizó la herramienta de análisis de sobrerepresentación de acuerdo a la función biológica asociada a la Ontología (Proceso biológico, Función molecular y Compartimento celular) del gen, en la base de datos Panther o la vía (*Pathway*) en la cual participan. Se utilizó como base de datos el conjunto de todos los genes de *Danio rerio*, y se seleccionaron aquellas categorías con un valor P menor o igual a 0,005.

RESULTADOS

3.1. Cuantificación de piocianina y pioverdina mediante espectrofotometría.

Con el fin de determinar y estandarizar las condiciones para realizar el estudio de proteómica y corroborar algunas de las diferencias en la virulencia de *P. aeruginosa* al ser crecida en ausencia o presencia de fosfato inorgánico (Pi), se buscó confirmar que los niveles de piocianina y pioverdina aumentan en escasez de Pi en el medio, lo cual había sido previamente observado en nuestro laboratorio (Ortiz-Severín 2013). Para esto se realizó un espectro de absorbancia de estos compuestos puros en medio PGS (\downarrow Pi) y PGS+Pi (\uparrow Pi) a pH 6,0. Para ambos pigmentos el máximo de absorbancia no cambió con la adición de Pi al medio. El máximo de absorbancia obtenido para la pioverdina fue de 383 nm (Figura 1), valor similar al doble pico a 366 y 384 nm (a pH 5,0) y el pico único 396 nm (a pH 7,0) reportados previamente (Xiao & Kisaalita 1995). De la misma forma, el pico de absorbancia de la piocianina fue de 311 nm (Figura 1), similar a los 318 nm reportados previamente (Cheluvappa 2014).

Mediante estos picos de absorbancia y soluciones a distintas concentraciones de los pigmentos se generó una curva de calibración para cada pigmento en los dos medios utilizados. Las pendientes observadas fueron similares en ambos medios para el mismo compuesto. Para la pioverdina la ecuación de la recta generada fue $Abs.=0,004216*Conc.[\mu g/mL]$ ($P<0,0001$) en ambos medios. Para la piocianina las ecuaciones fueron $Abs.=0,038800*Conc.[\mu g/mL]$ ($P<0,0001$) en medio PGS (\uparrow Pi), $Abs.=0,03796*Conc.[\mu g/mL]$ ($P<0,0001$) en medio PGS(\downarrow Pi) (Figura 2).

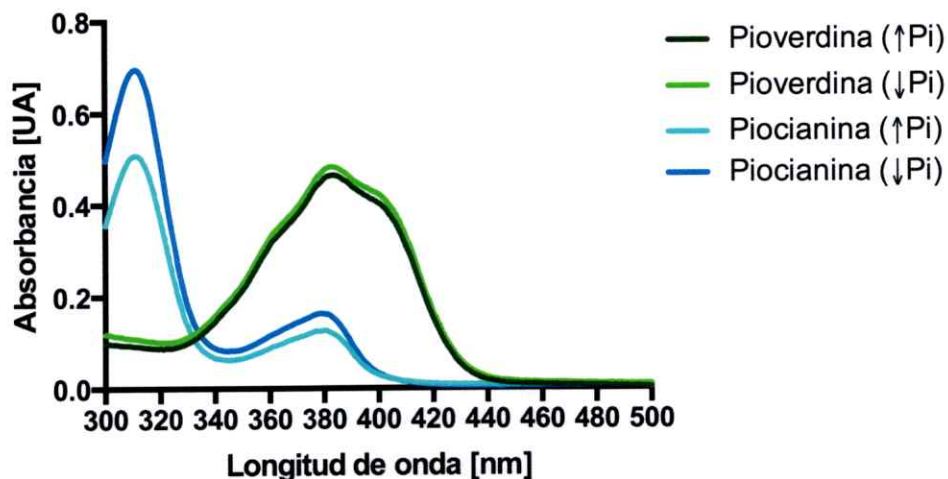


Figura 1. Espectros de absorción de piocianina y pioverdina en los medios PGS y PGS+Pi. Barrido espectrofotométrico entre las longitudes de onda de 300 a 500 nm para las soluciones de piocianina y pioverdina, a 12,5 µg/mL y 90 µg/mL respectivamente, en medio PGS (↓Pi) y medio PGS+Pi (↑Pi).

Con las curvas de calibración generadas se cuantificaron los niveles de piocianina y pioverdina en sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 crecidos por 18 horas en medio PGS(↓Pi) o PGS(↑Pi). Estos valores fueron normalizados por la DO₆₀₀ de cada cultivo (Figura 3). Mediante un ANOVA de una vía se determinó que existe una diferencia significativa en la producción de estos pigmentos si hay o no Pi en el medio ($P \leq 0,05$ para la piocianina y $P \leq 0,01$ para la pioverdina). Se confirma de esta forma que la ausencia de Pi en el medio eleva los niveles de piocianina y pioverdina producidos, lo que permite utilizar condiciones con diferente virulencia bacteriana.

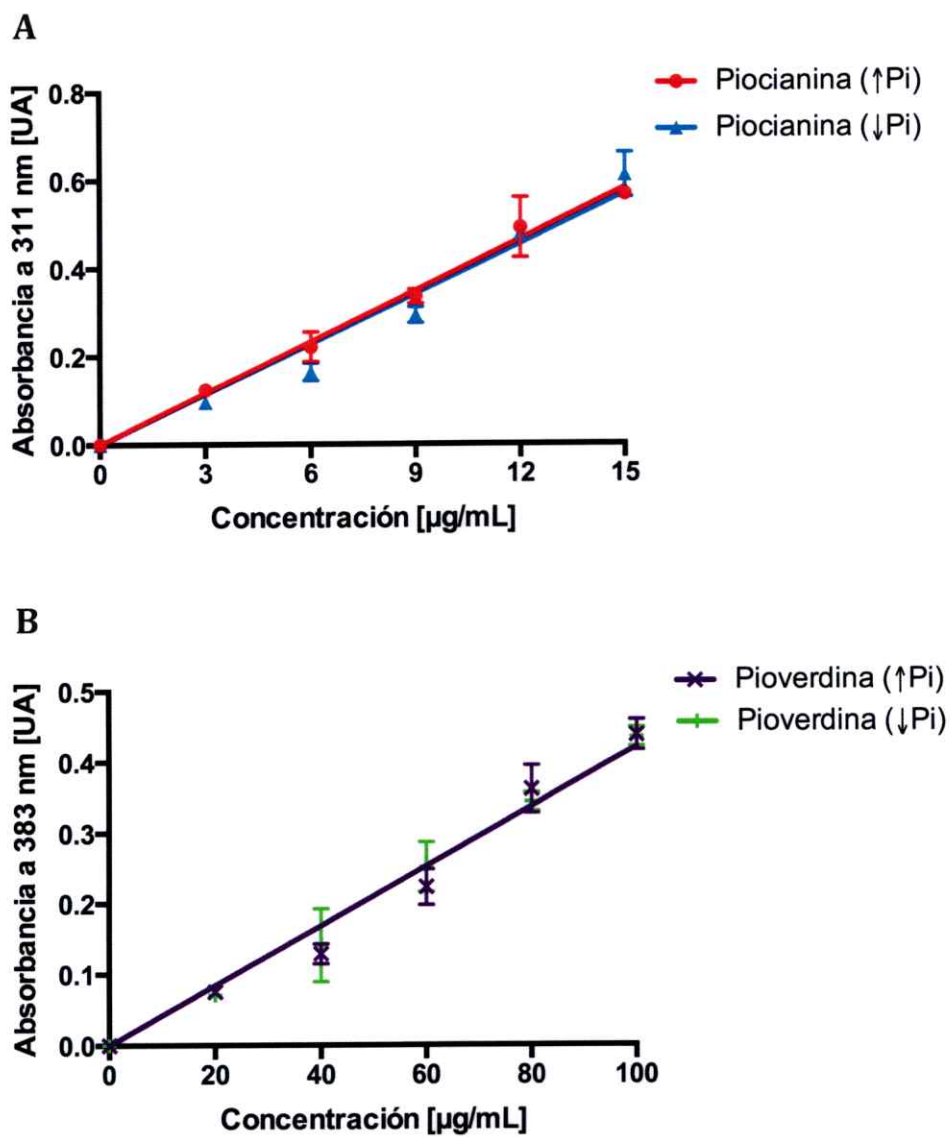


Figura 2. Curvas de calibración de plocianina y ploverdina en medios PGS y PGS+P_i. (A) Curva de calibración de plocianina en medio PGS (↓P_i) y medio PGS+P_i (↑P_i) a 311 nm, se utilizaron concentraciones desde 0 a 15 µg/mL. (B) Curva de calibración de ploverdina medio PGS (↓P_i) y medio PGS+P_i (↑P_i) a 383 nm, se utilizaron concentraciones desde 0 a 100 µg/mL.

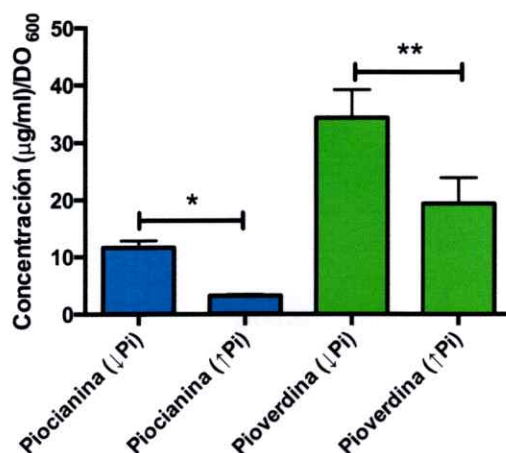


Figura 3. Cuantificación de picrocianina y picroverdina en sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* PAO1 fue crecida en medio PGS (↓Pi) o medio PGS+Pi (↑Pi) por 18 horas. Se cuantificaron los niveles de picrocianina y picroverdina en el sobrenadante y estos valores se normalizaron por la DO₆₀₀. * corresponde a P≤0,05. ** corresponde a P≤0,01. Se utilizó un n de 3. Se señalan las barras con su respectiva desviación estándar.

3.2. Ensayos de infección de *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inmersión estática.

Larvas del pez cebra de 3 dpf fueron co-incubadas con distintas concentraciones de *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5α en medio E3 durante 30 horas a 20°C. Las bacterias fueron crecidas en los medios de bajo fosfato PGS (↓Pi) o alto fosfato PGS+Pi (↑Pi). Las suspensiones bacterianas fueron tituladas en placas de LB-agar (Tabla suplementaria 1). Para evaluar la supervivencia se contabilizó el número de larvas muertas en cada hora y se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 4). Se puede observar que la letalidad de *P. aeruginosa* aumentó cuando estas fueron crecidas en ausencia de Pi y que esta se correlaciona directamente a la concentración de bacterias a la que fueron expuestas las larvas. Para evaluar que el efecto observado no se deba solamente a la exposición de las larvas a una alta concentración bacteriana se utilizó *E. coli* DH5α como control, y

consecuente con esto, *E. coli* DH5 α no causó muerte de peces al ser crecida en medio PGS(\downarrow Pi) o PGS(\uparrow Pi) y utilizada en altas concentraciones.

En las horas previas a la muerte de las larvas expuestas a *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en ambos medios, se observó una posible necrosis en distintas partes de las larvas, como la cabeza y la cola. Algunas de estas tenían una torsión o deformidad en la cola (Figura 5). Estos resultados concuerdan con los observados anteriormente (Ortiz-Severín 2013) y ratifican que la concentración de fosfato en el medio es un factor que altera la virulencia bacteriana.

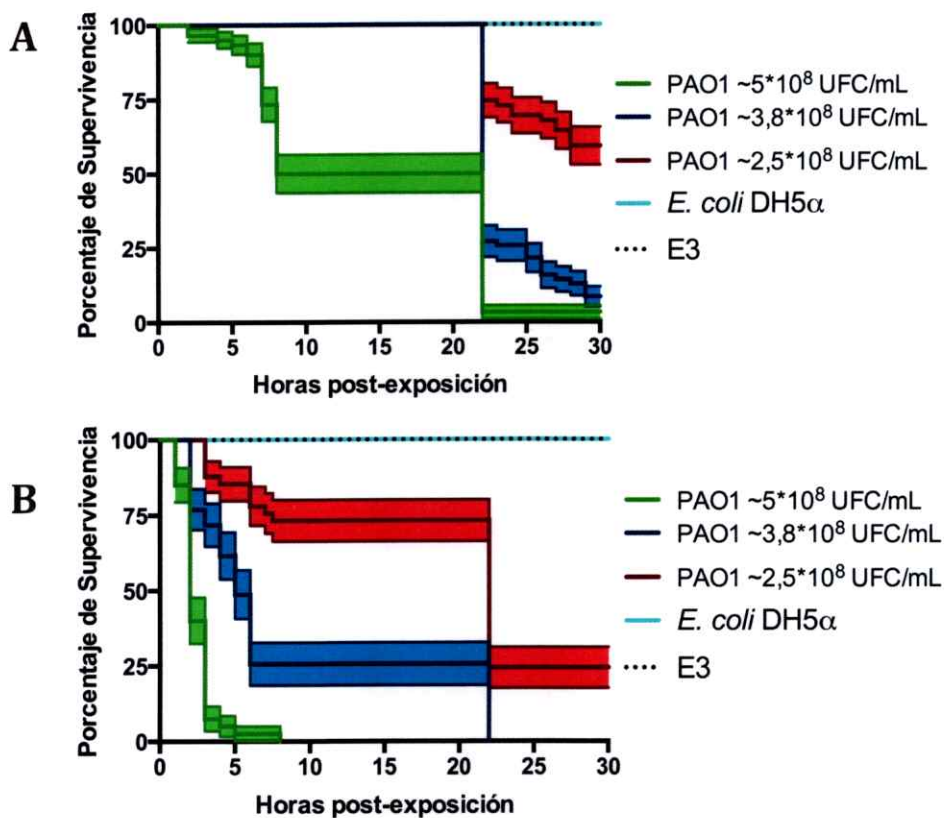


Figura 4. Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra expuestas a *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inmersión estática. Larvas de pez cebra de 3 dpf fueron co-incubadas en E3 por 30 horas con distintas concentraciones de *P. aeruginosa* PAO1, $\sim 5 \times 10^8$ UFC/mL (verde), $\sim 3,8 \times 10^8$ UFC/mL (azul), $\sim 2,5 \times 10^8$ UFC/mL (rojo), $\sim 5 \times 10^8$ UFC/mL de *E. coli* DH5 α (celeste), o incubadas en medio E3 estéril (línea punteada negra). (A) La incubación se llevó a cabo con bacterias crecidas en medio PGS(\uparrow Pi). (B) La incubación se llevó a cabo con bacterias crecidas en medio PGS(\downarrow Pi). Se utilizó un n de 40. El ancho de las curvas corresponde a error estándar.

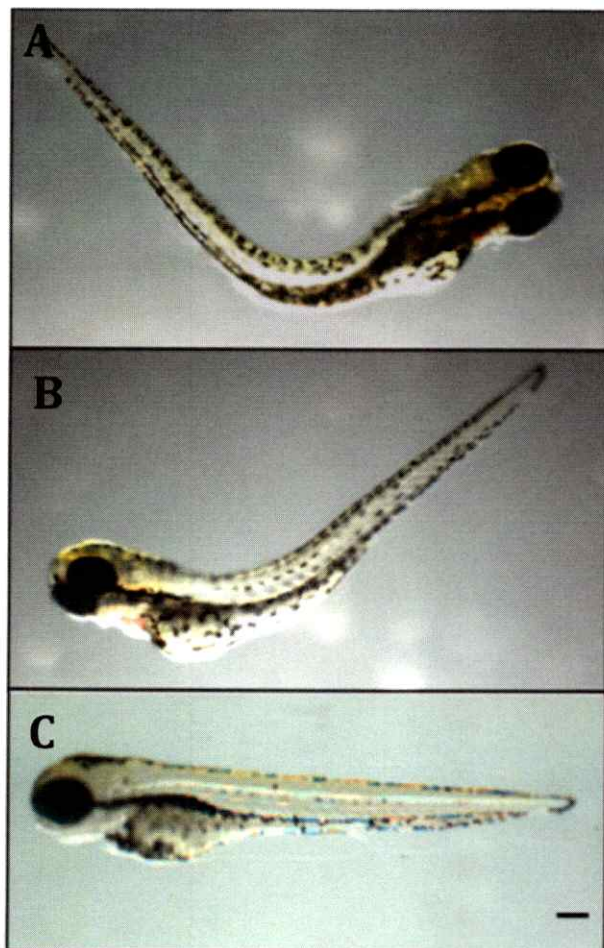


Figura 5. Efectos de la infección por *P. aeruginosa* PAO1 por inmersión estática sobre larvas de pez cebra. (A y B) Larvas de 3 dpf co-incubadas con $\sim 5 \times 10^8$ UFC/mL de *P. aeruginosa* PAO1 durante 3 horas. Corresponden a dos individuos distintos. (C) Larva de 3 dpf en medio control. Las fotos se tomaron en campo claro con 16X de aumento. Escala A-C: 100 μ m.

3.3. Ensayos de infección de *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inyección en la arteria caudal.

Con vistas a establecer un protocolo de infección por inyección en el pez cebra para estudiar la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, larvas de pez cebra de 3 dpf fueron inyectadas en la arteria caudal por encima de la cloaca con un rango de 2000-6000 UFC de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en medio PGS(\downarrow Pi) o PGS(\uparrow Pi), 2000-6000 UFC de *E. coli* DH5 α crecida en medio PGS(\downarrow Pi) o con PBS estéril. Se monitoreó la supervivencia de las larvas durante 72 horas y se contabilizó el número de larvas

mueras durante este período (Figura 6). Se observó una letalidad cercana al 50% en las larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en medio PGS (\downarrow Pi) lo que no ocurrió con PGS (\uparrow Pi). Se observó un bloqueo de la circulación en la arteria en peces inyectados con *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* DH5 α y en peces inyectados con PBS estéril, sin embargo, en los peces inyectados con medio control esto se revertía a las pocas horas y en las larvas inyectadas con bacterias esto se podía mantener incluso hasta las 28 horas post-inyección (hpi). En las larvas inyectadas con *P. aeruginosa* crecida en medio PGS (\downarrow Pi) se observó un claro daño en la cola del pez en momentos previos a la muerte de las larvas (Figura 7). Resultados similares fueron observados en este estudio y por Ortiz-Severín (2013) en los ensayos de inmersión estática.

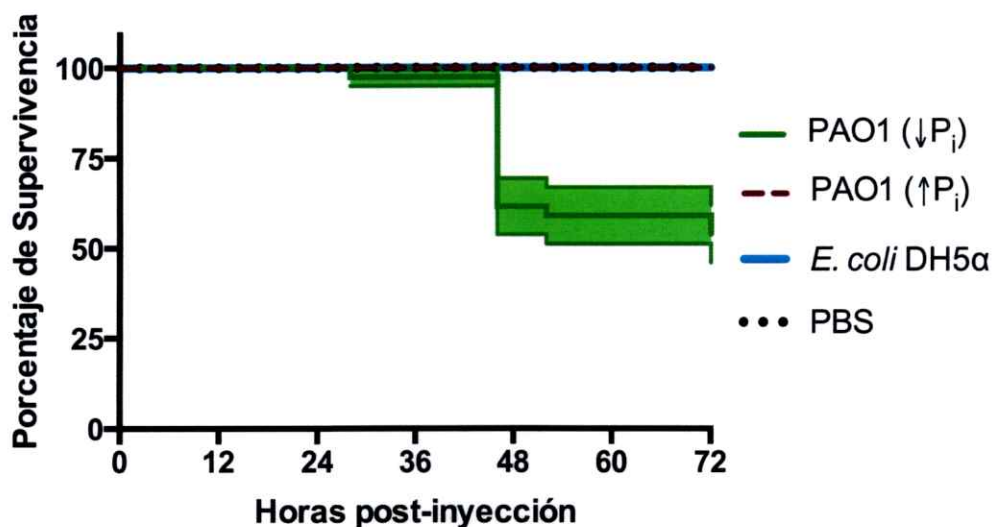


Figura 6. Curvas de supervivencia de larvas de pez cebra expuestas a *P. aeruginosa* PAO1 por inyección. Curva de supervivencia de larvas de pez cebra de 3 dpf inyectadas en la arteria caudal por encima de la cloaca con 2000-6000 UFC de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en medio PGS (\downarrow Pi) (verde) o PGS (\uparrow Pi) (línea punteada roja), 2000-6000 UFC de *E. coli* DH5 α crecida en PGS(\downarrow Pi) (azul) o PBS estéril (línea punteada negra). Se utilizó un n de 40. El ancho de las curvas corresponde a error estándar.

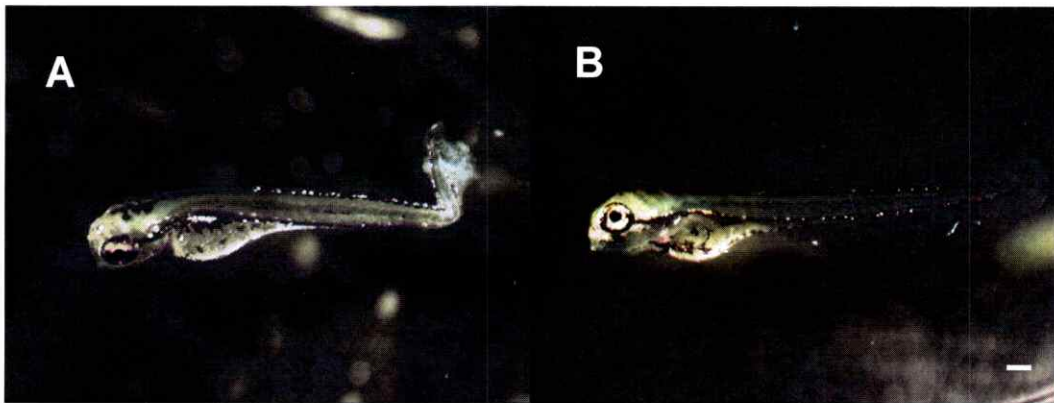


Figura 7. Efectos de la infección por *P. aeruginosa* PAO1 por inyección en el pez cebra. (A) Larvas de 3 dpf inyectadas con 2000-6000 UFC/mL de *P. aeruginosa* PAO1 crecida en PGS(↓Pi) a 28 hpi. (B) Larva de 3 dpf inyectada con PBS estéril control a 28 hpi. Las fotos se tomaron en campo claro con 16X de aumento. Escala A-B: 100 μ m.

No se observó muerte de peces inyectados con *E. coli* ni con PBS, y dado que solo se observó muerte de larvas después de 48 hpi inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 crecida en medio PGS (↓Pi), fue necesario determinar si existía algún cambio o respuesta en las larvas en las primeras 30 hpi con el fin de comparar ambos métodos. Para esto se trabajó con la línea de peces transgénicos *Tg(BACmpo:mCherry)* la cual posee la proteína fluorescente mCherry bajo el control del promotor de la mieloperoxidasa (mpx), es decir, una línea transgénica que posee los neutrófilos marcados con la proteína fluorescente roja (Renshaw et al. 2006).

Se observó una claro reclutamiento de neutrófilos en el sitio de inyección en los peces inyectados con *P. aeruginosa* PAO1 hasta las 28 hpi, pero en aquellos inyectados solo con PBS estéril sólo se observó este reclutamiento de neutrófilos en las primeras hpi (figura 8). No se observó una diferencia en el reclutamiento de neutrófilos con respecto al control al utilizar la línea *Tg(BACmpo:mCherry)* expuesta a *P. aeruginosa* por medio de inmersión estática (Figura suplementaria 1).

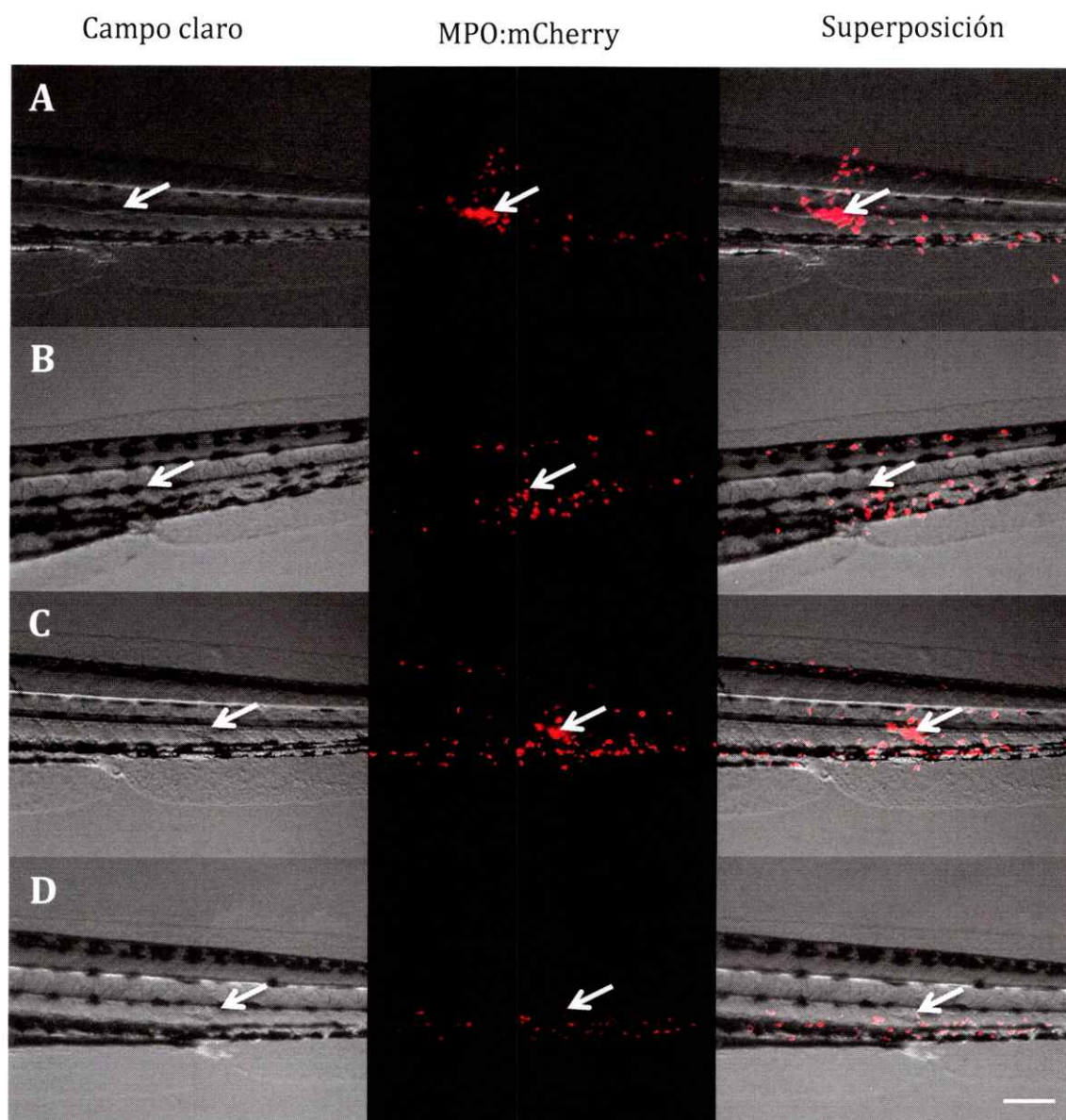


Figura 8. Reclutamiento de neutrófilos en sitio de inyección con *P. aeruginosa* PAO1. Visualización del reclutamiento de neutrófilos fluorescentes en larvas de pez cebra *Tg(BACmpo:mCherry)* de 3 dpf que fueron inyectadas en la arteria caudal con 2000-6000 UFC de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en medio PGS (\downarrow Pi). Se muestra la foto tomada en campo claro (columna de la izquierda), con filtro de fluorescencia rojo (columna del medio) y la superposición de estas dos (columna de la derecha). (A) Larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 a 6 hpi. (B) Larvas inyectadas con PBS estéril a 6 hpi. (C) Larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 a 28 hpi. (D) Larvas inyectadas con PBS estéril a 28 hpi. Las fotografías fueron tomadas utilizando un aumento de 50X. El sitio de inyección es señalado con las flechas blancas. Escala A-D: 100 μ m.

Para determinar si las larvas presentaban algún signo de una inflamación sistémica se contó el número de neutrófilos presentes en la circulación, específicamente el número de neutrófilos que pasaban por el sitio de inyección en un minuto (Figura 9) (Deng et al. 2012; Walters et al. 2010). Por medio de un ANOVA de dos vías con un post-test de comparaciones múltiples de Tukey se determinó que hay una diferencia significativa al comparar el número de neutrófilos en circulación a 22 y 28 hpi en las larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 crecida en medio PGS (\downarrow PI) con respecto al control, pero también a las 22 y 28 hpi al ser inyectadas con *E. coli* DH5 α . Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre *P. aeruginosa* crecida en PGS (\downarrow PI) y *E. coli* en ninguna condición. Por lo tanto, las larvas de pez cebra generan una respuesta inflamatoria que aumenta los neutrófilos en circulación al ser expuestas a una bacteria por medio de una inyección en la arteria caudal, y este fenómeno no es exclusivo de *P. aeruginosa*, ni de una condición en la cual se observe muerte de larvas.

En todas las inyecciones con bacterias se observa un aumento del número de neutrófilos en circulación a las 22 y 28 hpi, pero en las larvas inyectadas con medio PBS a las 22 hpi, se observa un descenso en el número de neutrófilos lo que sugiere que en este tiempo los efectos de la inflamación propio de una inyección, debido al daño de tejido, se reducen.

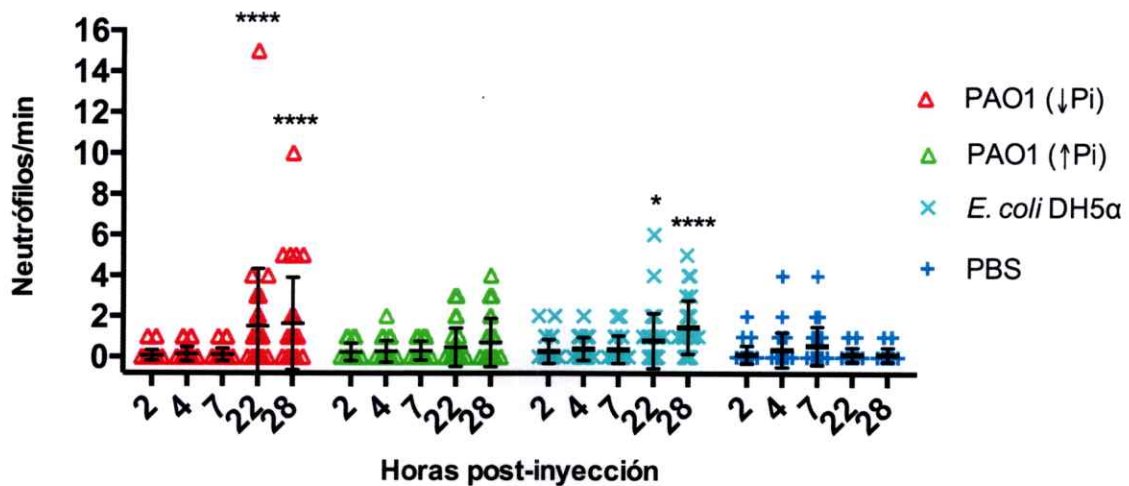


Figura 9. Cuantificación de neutrófilos en circulación en peces cebra expuestos a *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inyección. Larvas de pez cebr *Tg(BACmpo:mCherry)* de 3 dpf fueron inyectadas en la arteria caudal con 2000-6000 UFC de *P. aeruginosa* PAO1 crecida en medio PGS (↓Pi) o medio PGS (↑Pi), *E. coli* DH5α o con PBS estéril. Se contó el número de neutrófilos que pasaban por el sitio de inyección a través de la arteria caudal por minuto a las 2, 4, 7, 22 y 28 hpi. Cada símbolo corresponde a una larva. Se señalan las diferencias significativas con respecto a las larvas inyectadas con PBS. * equivale a $P \leq 0,05$, y **** a $P \leq 0,0001$. Se señala el promedio y la desviación estándar. Se utilizó un n de 30.

3.4. Estudios de proteómica comparativa

Para realizar los estudios de proteómica comparativa se buscó determinar las condiciones en las cuales las larvas de pez cebr expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección e inmersión eran similares y en las cuales aun no había muerte de larvas. Se seleccionaron larvas a las 22 hpi expuestas a *P. aeruginosa* crecida en medio PGS (↓Pi) debido a que en este tiempo las larvas presentaban un aumento significativo de los neutrófilos en circulación y en esta condición se observaba muerte de las larvas a las 48 horas. Se buscó y seleccionó la condición en la inmersión estática que más se asemejara a las condiciones de inyección, es decir, en la cual a las 22 hpe se observara un bajo porcentaje de muerte de larvas, pero el cual incrementara en las horas posteriores. Se seleccionó, entonces, larvas expuestas a *P. aeruginosa* crecidas en medio PGS(↑Pi) en una concentración de $\sim 1,75 \cdot 10^8$ UFC/mL.

Con el objetivo de realizar la proteómica cuantitativa y eliminar los efectos se que pudiesen generar producto de la inmersión e inyección, como por ejemplo el daño generado por la aguja, se les analizó el proteoma a larvas controles que fueron incubadas en E3 o inyectadas con PBS según fue el caso.

Un total de 38488 proteínas de pez cebra fueron detectadas en nuestros experimentos de proteómica cuantitativa en las cuatro muestras.

Al comparar el proteoma de las larvas inyectadas con *P. aeruginosa* con respecto a las larvas inyectadas con PBS se encontraron 32774 proteínas, de estas 12677 aumentaron sus niveles significativamente (factor de cambio igual o mayor a 1,5) y 13289 tenían disminuyeron sus niveles significativamente (factor de cambio menor o igual a -1,5). Al comparar el proteoma de las larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* con respecto a las inmersas en medio E3 se encontraron 31499 proteínas totales, de estas 13607 aumentaron significativamente y 13136 tenían disminuyeron significativamente. Se analizaron las proteínas que poseían un factor de cambio significativo y se agruparon de acuerdo a su categoría asociada a un proceso biológico en la ontología de genes (GO) (Figura 10, Tablas suplementarias 3 y 4).

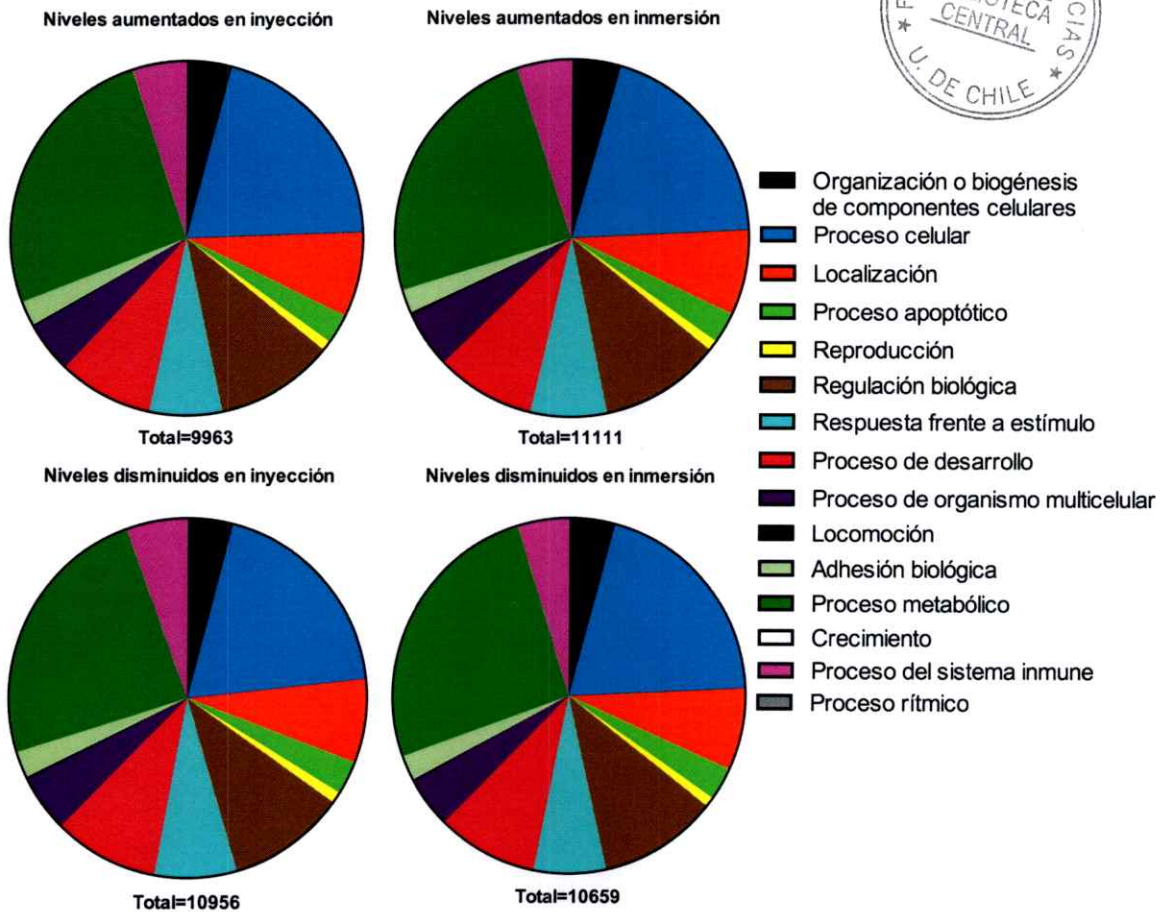


Figura 10. Resultados de proteómica comparativa agrupado en subcategorías de proceso biológico según la GO. Se seleccionaron las proteínas que aumentaron sus niveles (con una razón de cambio mayor o igual a 1,5) y aquellas que disminuyeron sus niveles (con una razón de cambio menor o igual a -1,5) en las larvas inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 por medio de inyección o inmersión estática con respecto a las larvas control inyectadas con PBS estéril o inmersas en E3 estéril respectivamente. Las proteínas se agruparon de acuerdo a la categoría proceso biológico de la ontología de genes. El total señalado corresponde al número total de identificaciones en la base de datos en todas las categorías de acuerdo al proceso biológico

La distribución de las proteínas en las categorías GO es similar tanto en las proteínas con niveles aumentados como con niveles disminuidos, ya sea en larvas expuestas a bacterias por medio de inyección como por inmersión. Las categorías más representadas tanto en las proteínas con niveles aumentados como disminuidos son “proceso metabólico (GO:0008152)” y “proceso celular (GO:0009987)” (con alrededor del 25% y 20% respectivamente en todos los análisis). La categoría

“proceso del sistema inmune (GO:0002376)” solo corresponde a alrededor del 5% de las proteínas con niveles cambiados, y de estas la mayoría corresponde a las subcategorías de “respuesta inmune (GO:0006955)” con alrededor del 40% y “procesamiento y presentación de antígenos (GO:0019882)” con alrededor del 49%, donde tan solo entre el 10 y 15% correspondió a “activación de macrófagos (GO:0042116)”. La categoría “respuesta frente a estímulo”, sólo representó cerca del 6% de las proteínas.

3.4.1. Análisis de enriquecimiento de proteínas aumentadas o disminuidas en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por inyección o inmersión con respecto al control.

Para determinar las categorías de GO que estaban sobrerrepresentadas o subrepresentadas por sobre el azar se realizó un análisis de enriquecimiento. Esto se hizo tanto para las proteínas que aumentaron o disminuyeron sus niveles tanto en inyección como en inmersión con respecto al control. Se seleccionaron los grupos de la ontología de los genes de acuerdo al proceso biológico (Tablas suplementarias 5, 6, 7, 8) y de acuerdo a la vía (*Pathway*) en la que participan (Tabla 2).

Las categorías GO “inducción de apoptosis (GO:0006917)” y “procesamiento y presentación de antígenos vía moléculas de histocompatibilidad (MHC) de clase II (GO:0002504)” o “procesamiento y presentación de antígenos (GO:0019882)” se encontraron sobrerrepresentadas tanto en las proteínas aumentadas como disminuidas en larvas expuestas por los dos métodos de exposición, indicando una regulación de dichos procesos en ambas condiciones. Las categorías sobrerrepresentadas en estos grupos son similares y se aprecia que tanto en las

proteínas con niveles aumentados como disminuidos aparecen sobrerrepresentados distintos procesos metabólicos, de morfogénesis y de organización celular.

Al analizar las proteínas con niveles aumentados en larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* de acuerdo a la vía, se encontró sobrerrepresentada la categoría "respuesta a hipoxia vía activación de factores inducidos por hipoxia (HIF) (P00818)", y en las proteínas con niveles disminuidos esta enriquecida la categoría "vía de señalización de integrina (P00034)". En cambio, al analizar las proteínas con niveles disminuidos en larvas inyectadas con *P. aeruginosa* con respecto a su control se encontraron enriquecidas las categorías de "activación de células B (P00010)" y "vía de señalización de endotelinas (P00019)". No hubo vías enriquecidas ($P \leq 0,05$) al analizar las proteínas que aumentaron sus niveles en esta condición.

3.4.2 Análisis de enriquecimiento de proteínas aumentadas o disminuidas exclusivamente en una condición.

Para analizar las diferencias de la respuesta del pez cebra frente a una exposición a *P. aeruginosa* por medio de inyección e inmersión estática se determinaron las proteínas con niveles aumentados exclusivamente en las larvas inyectadas o en larvas expuestas mediante inmersión en comparación a sus controles respectivos, aquellas que se encontraban disminuidas exclusivamente en una de estas condiciones, y finalmente aquellas que se encontraban cambiadas en ambas condiciones (Figura 11). Estas proteínas se agruparon y analizaron de acuerdo al proceso biológico (GO) y de acuerdo a la vía a la cual pertenecen.

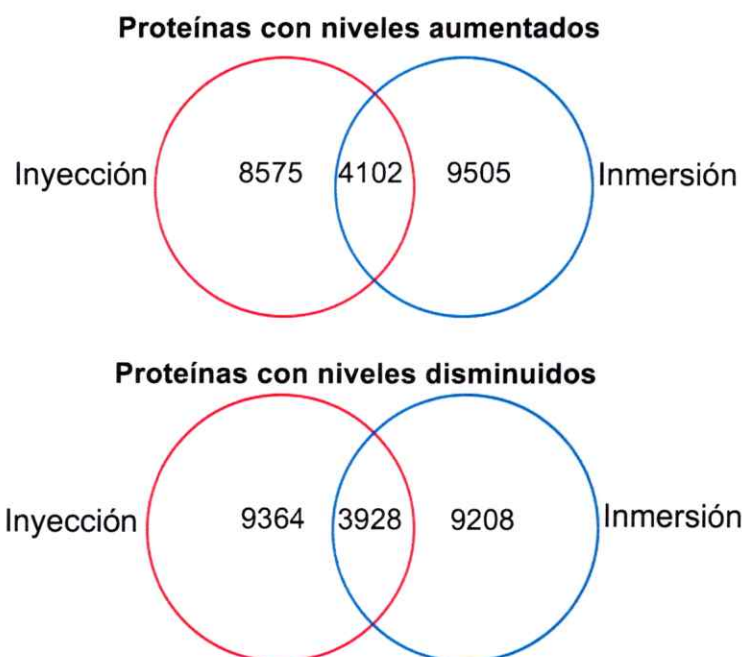


Figura 11. Número de proteínas con niveles aumentados o disminuidos de acuerdo al método de exposición. Se señalan el número de proteínas con sus niveles aumentados o disminuidos exclusivamente en las larvas inoculadas por medio de inyección o inmersión estática, y el número de proteínas con sus niveles cambiados en ambas condiciones.

Al agrupar estas proteínas de acuerdo a la vía en la cual participan (Tabla 2), en las proteínas que aumentan sus niveles exclusivamente en las larvas inyectadas con respecto a su control están enriquecidas las categorías “guía de axón por medio de netrina” (P00009), “regulación del citoesqueleto mediante una Rho GTPasa (P00016)” e “inflamación mediada por vías de señalización quimioquina y citoquina (P00031)”. En cambio, en las proteínas que aumentan sus niveles exclusivamente en larvas expuestas por medio de inmersión están sobrerrepresentadas las categorías “vía de señalización de integrina (P00034)” y “angiogénesis (P00005)”. Al analizar las proteínas que disminuyeron su nivel exclusivamente en una u otra condición no se encontró ninguna categoría enriquecida significativamente ($P \leq 0,05$).

Tabla 2. Análisis de enriquecimiento de grupos de proteínas con niveles cambiados en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión o inyección de acuerdo a vía. Análisis de enriquecimiento de las proteínas que cambian sus niveles de expresión de acuerdo a la vía en la cual participan. Se muestran las proteínas que cambian su expresión al menos 1,5 veces o -1,5 veces al comparar larvas co-incubadas o inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a sus respectivos controles. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a vía	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Proteínas con niveles aumentados en las larvas expuestas mediante inmersión				
Respuesta a hipoxia vía activación de HIF	21	8,15	2,58	1,90E-02
No-clasificado	4982	5111,1	0,97	0,00
Proteínas con niveles disminuidos en las larvas expuestas mediante inmersión				
Vía de señalización de integrina	64	40,03	1,6	4,41E-02
No-clasificado	4829	4936,67	0,98	0,00
Proteínas con niveles disminuidos en las larvas expuestas mediante inyección				
Activación de células B	34	16,34	2,08	1,38E-02
Vía de señalización de endotelinas	41	22,61	1,81	4,96E-02
No-clasificado	4924	5052,37	0,97	0,00
Proteínas con niveles aumentados exclusivamente en las larvas expuestas mediante inyección				
Guía de axón por medio de netrina	21	6,95	3,02	2,03E-03
Regulación del citoesqueleto mediante una Rho GTPasa	32	16,13	1,98	4,83E-02
Inflamación mediada por vías de señalización de quimioquinas y citoquinas	58	34,34	1,69	2,11E-02
No-clasificado	3042	3137,15	0,97	0,00
Proteínas con niveles aumentados exclusivamente en las larvas expuestas mediante inmersión				
Vía de señalización de integrina	50	28,91	1,73	3,49E-02
Angiogénesis	53	31,28	1,69	3,73E-02
No-clasificado	3466	3565,22	0,97	0,00

En cuanto la agrupación por proceso biológico (Figuras 12, 13, 14 y 15; Tablas suplementarias 9, 10, 11, 12, 13 y 14), la categoría “inducción de apoptosis (GO:0006917)” apareció sobrerrepresentada en aquellas proteínas con niveles aumentados y disminuidos en ambas condiciones. La categoría “procesamiento de antígeno y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II (GO:0002504)” apareció sobrerrepresentada en el grupo de proteínas con niveles disminuidos en ambas condiciones, y también en aquellas disminuidas exclusivamente en larvas inyectadas, pero no en el grupo de proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas por medio de inmersión.

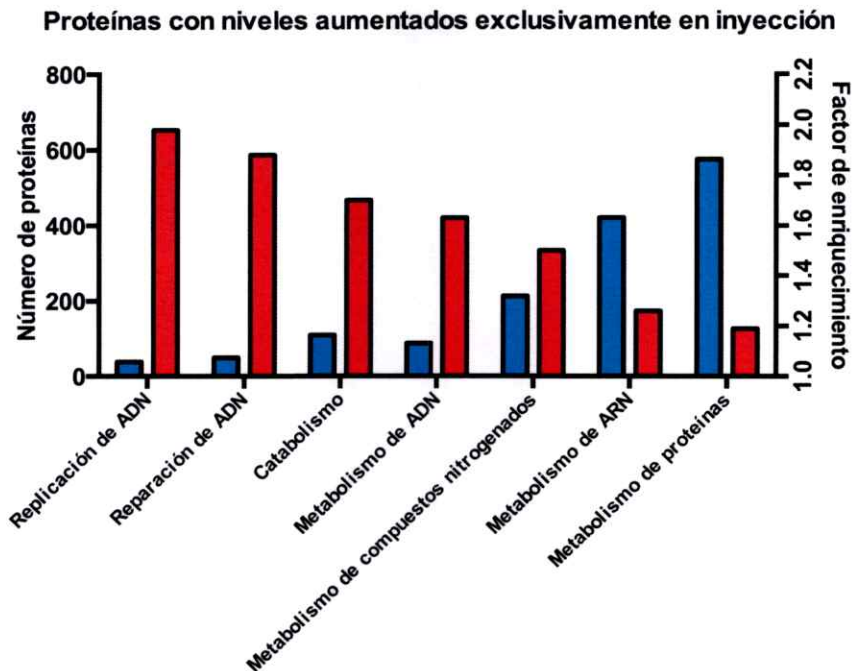


Figura 12. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes (GO) en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección. Análisis de los grupos de proteínas sobrerrepresentados o subrepresentados de acuerdo al proceso biológico asociado. Se muestran las proteínas que aumentaron su expresión al menos 1,5 veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril y que sólo se encontraron aumentadas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$. Barras azules indican número de proteínas. Barras rojas indican factor de enriquecimiento. Se indica solo una selección de los grupos funcionales de mayor relevancia.

Proteínas con niveles aumentados exclusivamente en inmersión

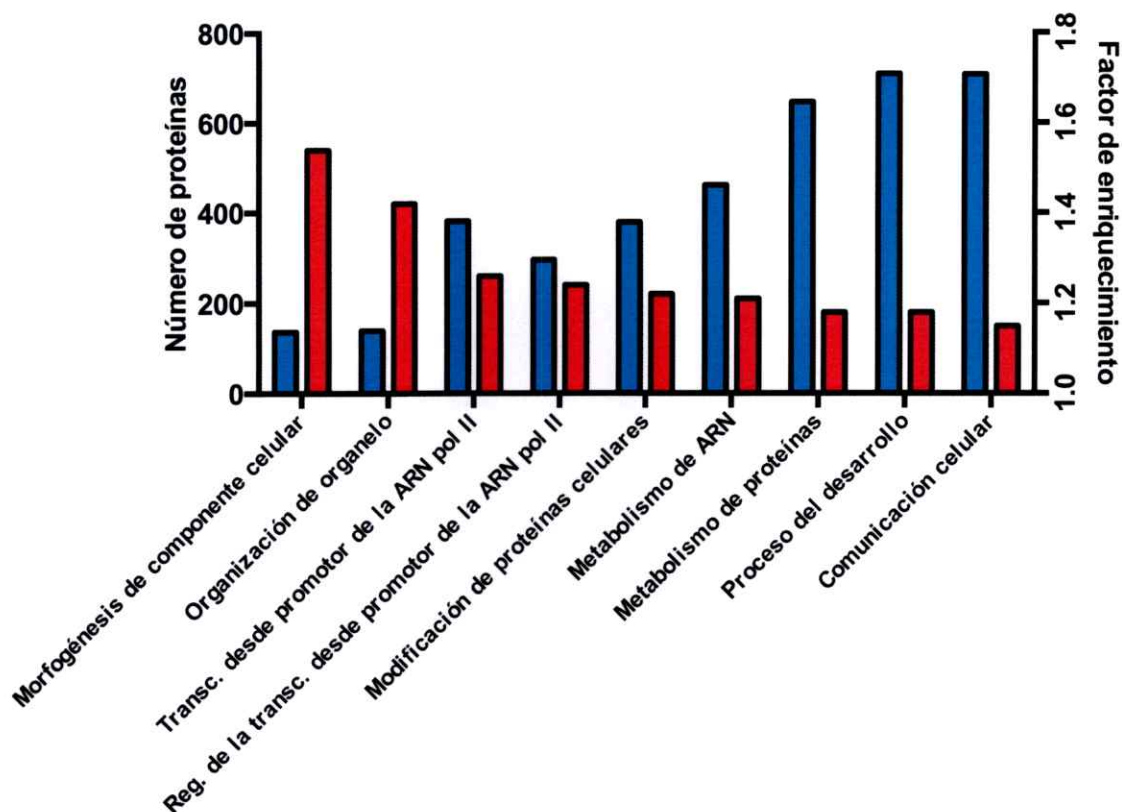


Figura 13. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes (GO) en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión. Análisis de los grupos de proteínas sobrerrepresentados o subrepresentados de acuerdo al proceso biológico asociado. Se muestran las proteínas que aumentaron su expresión al menos 1,5 veces al comparar larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a incubadas en medio E3 estéril y que sólo se encontraron aumentadas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$. Barras azules indican número de proteínas. Barras rojas indican factor de enriquecimiento. Se indica sólo una selección de los grupos funcionales de mayor relevancia. Abreviaturas: Transc. por transcripción, Reg. por regulación.

Proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en inyección

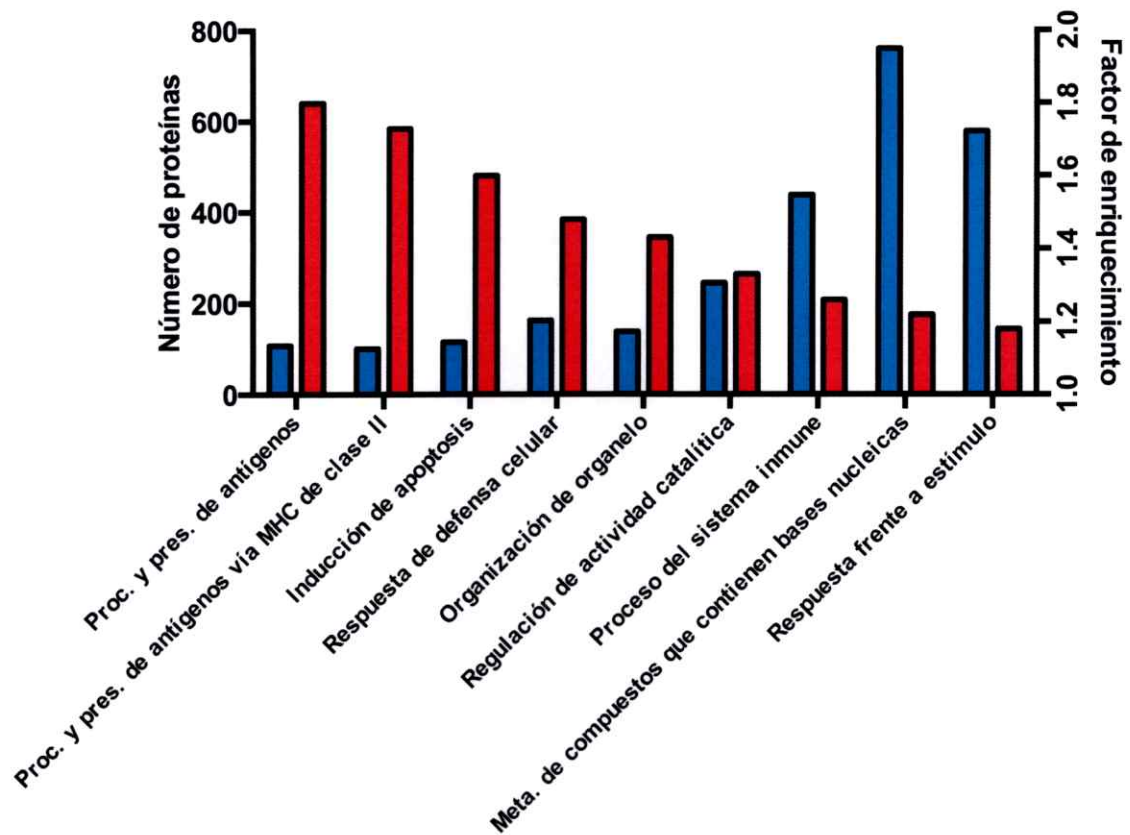


Figura 14. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección. Análisis de los grupos de proteínas sobrerrepresentados o subrepresentados de acuerdo al proceso biológico asociado. Se muestran las proteínas que disminuyeron su expresión al menos 1,5 veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril y que sólo se encontraron disminuidas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$. Barras azules indican número de proteínas. Barras rojas indican factor de enriquecimiento. Se indica sólo una selección de los grupos funcionales de mayor relevancia. Abreviaturas: Proc. por procesamiento, pres. por presentación, Meta. por metabolismo.

Proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en inmersión

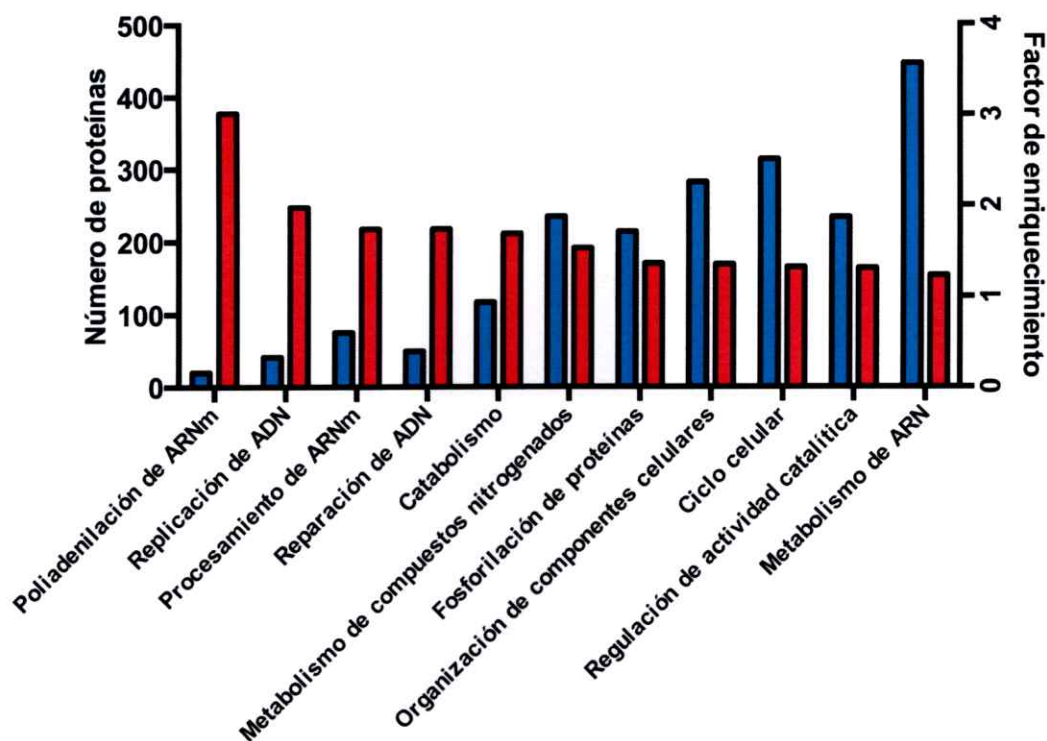


Figura 15. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión. Análisis de los grupos de proteínas sobrerrepresentados o subrepresentados de acuerdo al proceso biológico asociado. Se muestran las proteínas que disminuyeron su expresión al menos 1,5 veces al comparar larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a incubadas en medio E3 estéril y que sólo se encontraron disminuidas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$. Barras azules indican número de proteínas. Barras rojas indican factor de enriquecimiento. Se indica sólo una selección de los grupos funcionales de mayor relevancia.

Con vistas a sugerir posibles marcadores moleculares que se expresen exclusivamente en las condiciones de inyección o inmersión estática, se buscaron proteínas indicadoras que cumplieran con las siguientes condiciones: (1) que pertenezcan a vías enriquecidas exclusivas de cada método de infección, (2) que tengan una función biológica descrita y relacionada con procesos de infección y (3) que los niveles de cambio de las proteínas fueran contrastantes en ambas condiciones (Figura 16, Tabla suplementaria 15).

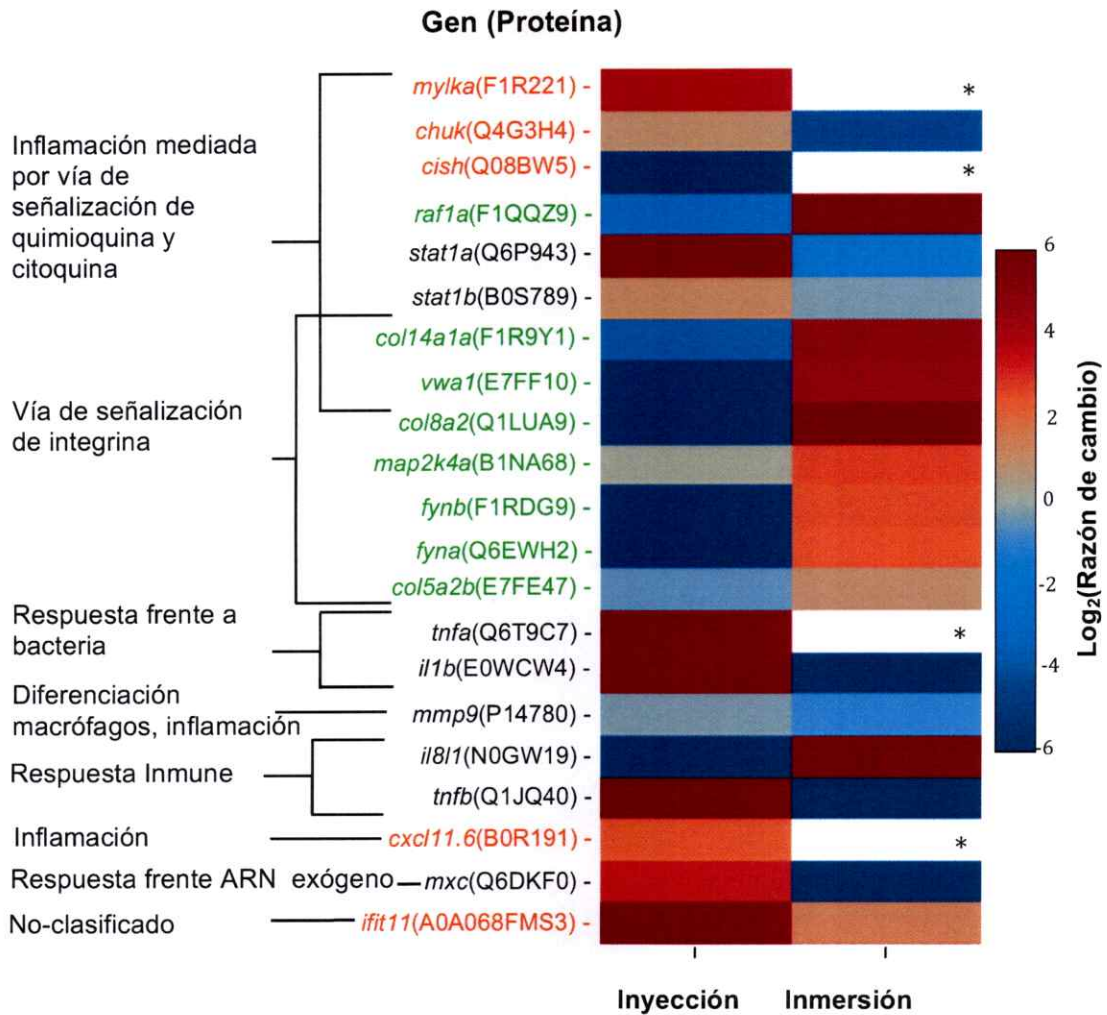


Figura 16. Marcadores moleculares de infección propuestos de acuerdo al método de exposición. Se señala el logaritmo en base 2 de la razón de cambio para cada proteína en las larvas expuestas por inmersión o inyección con respecto a su control. Se indica el nombre del gen acompañado por la identificación de la proteína. Para cada grupo de genes se señala la categoría de acuerdo a la ontología del gen más pertinente. Ésta fue determinada de acuerdo a la información del gen o del homólogo en humano. En naranja se señalan los marcadores propuestos de exposición por medio de inyección, en verde los marcadores propuestos de exposición por medio de inmersión y en negro marcadores previamente descritos. * en las casillas blancas indica que la proteína no fue encontrada ni en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* ni en las larvas control.

DISCUSIÓN

Entender la relación patógeno-hospedero es crucial para comprender las infecciones bacterianas. Un patógeno es incapaz de causar una enfermedad en ausencia de un huésped, y más aún la relación que se genera entre ambos es modificada de acuerdo a las condiciones intrínsecas tanto del patógeno como del hospedero influenciadas por el ambiente. La capacidad de causar daño de parte de un patógeno a un hospedero depende en parte de los factores de virulencia generados por este y la capacidad del hospedero de responder frente al patógeno.

En este trabajo se comprobó que cuando *P. aeruginosa* es crecida en ausencia de fosfato inorgánico se vuelven relativamente más virulentas y tienen una mayor capacidad de causar daño a un hospedero como es el pez cebra, lo cual ya había sido observado en diversos trabajos (Zaborin et al. 2012; Ortiz-Severín 2013; Long et al. 2008). Esto está probablemente relacionado con que al crecer en un medio deficiente en fosfato existe una mayor necesidad de captar nutrientes desde el medio, y por ejemplo se secretan factores de virulencia cuya función es captar metales. Este fenómeno fue evidenciado a dos niveles, primero, se observó que aumentan significativamente los niveles de piocianina y pioverdina secretados por las bacterias al medio, y como estos son factores de virulencia el aumento de dichos factores es un indicador que la condición utilizada aumenta la virulencia bacteriana. Por otro lado, cuando las larvas de pez cebra fueron expuestas por medio de inmersión estática a *P. aeruginosa* crecidas en carencia de fosfato se observó un claro aumento de la mortalidad. Solo observamos mortalidad de larvas expuestas por medio de inmersión estática al utilizar una baja temperatura (20°C) (Ortiz-Severín 2013), lo cual vuelve al

pez cebra más susceptible a una infección por *P. aeruginosa* que lo puede llevar a la muerte, siendo esto un ejemplo de cómo la condición en la cual se encuentra el hospedero afecta la relación con el patógeno. Más aun, cuando el pez cebra fue expuesto a esta bacteria por medio de una inyección solo se observó mortalidad en esta condición, es decir, *P. aeruginosa* crecida en presencia de fosfato no es lo suficientemente virulenta para causar mortalidad por medio de inyección en la arteria caudal en las condiciones utilizadas, comprobándose *in vivo* que la carencia de fosfato inorgánico aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1. El hecho de no observarse muerte al exponer larvas de pez cebra a *E. coli* crecida en medio carente de fosfato indica que para haber un aumento de la virulencia tienen que existir las condiciones intrínsecas en la bacteria y no basta con modificar el hospedero o el medio de cultivo y que los fenotipos observados no se deben simplemente a una exposición de las larvas a un alto número de bacterias.

Las larvas de pez cebra de 3 dpf fueron relativamente resistentes a una exposición a *P. aeruginosa*. Esto se puede deber a una resistencia intrínseca a este tipo de infección, dado que *P. aeruginosa* no es un patógeno de peces ni un patógeno que comúnmente ingrese al flujo sanguíneo. Por otro lado, las larvas de 3 dpf son más resistentes a una infección con *P. aeruginosa* por medio de inyección en comparación con peces de 28 hpf o 50 hpf, donde si se ha observado muerte del 100% de los peces previas a las 48 hpi utilizando menores inóculos bacterianos, 1700 y 2400 respectivamente (Clatworthy et al. 2009; Brannon et al. 2009). Esto se debe a las diferencias en el desarrollo del sistema inmune del pez en larvas de 28, 50 y 72 hpf.

Cuando las larvas de pez cebra fueron infectadas por medio de una inyección con *P. aeruginosa* crecida en medio PGS (\downarrow Pi) se observó un bloqueo en la circulación sanguínea, daño de los tejidos, torsión en la punta de la cola que luego se

expandió hacia el resto de la larva y un aumento de los neutrófilos en circulación. Sin embargo, también se observó un aumento de neutrófilos en circulación al inyectar *E. coli*, por lo que este fenómeno no es exclusivo de una condición en la cual se observe muerte de larvas ni dependiente de la patogenicidad de la bacteria y por lo tanto, es posible que cepas bacterianas no virulentas generen un aumento de los neutrófilos en circulación ya que es necesario para las eliminar estas bacterias circulantes. Es de señalar que la cepa utilizada de *E. coli* aunque no es virulenta si es capaz de producir lipopolisacárido (LPS) un conocido agente inflamatorio en el pez cebra (Watzke et al. 2007). En otros estudios que utilizaron larvas del pez cebra de menores edades e inyecciones en otras zonas del cuerpo del pez (Clatworthy et al. 2009; Llamas et al. 2009; Brannon et al. 2009) también se observó un bloqueo de la circulación, indicando que este fenotipo no es exclusivo de la condición utilizada. Al igual que lo encontrado en reportes previos, este bloqueo de la circulación podría deberse a una aglomeración tanto de bacterias como de células del sistema circulatorio (Brannon et al. 2009). Se observó también un fuerte reclutamiento de neutrófilos en la zona de inyección que se mantuvo en más tiempo que en los controles de inyección. Esto sugiere que la respuesta de la larva frente a una inyección con este patógeno es probablemente por medio de una respuesta inflamatoria e inmune y que se genera un importante cambio en la presión sanguínea y daño en la zona de inyección. Esto se correlaciona con la sobrerrepresentación del grupo de proteínas agrupadas en la categoría "inflamación mediada por vías de señalización quimioquina y citoquina" en el grupo de proteínas que cambian su expresión únicamente en larvas inyectadas. Por otro lado, el cambio de la presión sanguínea y los efectos del bloqueo de la circulación observado se correlaciona con la sobrerrepresentación de la categoría "vía de señalización de endotelinas" en las proteínas que bajan sus niveles en larvas expuestas por medio de



este método, debido a que este grupo de proteínas se encargan de aumentar la presión sanguínea al contraer los vasos sanguíneos. Sorprendentemente, en este último grupo de proteínas también está sobrerrepresentada la categoría de "activación de células B", en esta edad del pez no existen células B funcionales, por lo que esto puede ser un efecto de regulación de las células precursoras de este grupo celular al estar expuestos a un patógeno. La ausencia del reclutamiento de neutrófilos o un cambio en el patrón de distribución de estos en los peces expuestos a *P. aeruginosa* por inmersión estática sugiere que la respuesta generada no es principalmente inmune, similar a lo encontrado en peces expuestos a *E. tarda*, donde se reportó que la respuesta fue parecida a la que se observa frente a un daño de tejidos o frente a toxinas (van Soest et al. 2011). Interesantemente, en las proteínas con niveles aumentados en las larvas expuestas por este método se encuentran las de la vía de "respuesta a hipoxia vía activación de HIF", lo que sugiere que las larvas sufren de una carencia de oxígeno disponible en la solución en la que están co-incubadas con *P. aeruginosa* lo cual probablemente se deba a la combinación del consumo de oxígeno y la generación de compuestos que limitan el oxígeno disponible en el medio por parte de las bacterias. Adicionalmente, el aumento de proteínas de la categoría "angiogénesis" se puede explicar producto de un efecto común y bien estudiado de la respuesta frente a hipoxia es la inducción de la angiogénesis (Krock et al. 2011). La sobrerrepresentación de la categoría "vía de señalización de integrina" tanto en las proteínas que disminuyeron sus niveles en peces expuestos por medio de inmersión como en el grupo de proteínas que aumentaron sus niveles de expresión exclusivamente en esta condición, se puede deber a un incremento en la migración celular, ya que estas proteínas están involucradas en la adhesión célula a célula, especialmente en los epitelios, lo cual puede ser explicado por la necesidad de que las

células del sistema inmune migran a las membranas externas para poder responder frente a las bacterias que están en el exterior. La infección por medio de inmersión estática generó una torsión en las larvas, las cuales se curvaban notoriamente en horas previas a la muerte, posiblemente por algún efecto de las bacterias en la musculatura del pez. Se observó también un rápido daño en los tejidos en distintas zonas del pez, indicador de una posible necrosis.

Si bien se observan respuestas celulares diferentes y se encuentran enriquecidas vías exclusivas dependiendo del método de exposición, existen procesos biológicos como "procesamiento y presentación de antígenos vía moléculas de histocompatibilidad de clase II" y la "inducción de apoptosis" que son comunes en ambos métodos de exposición. Esto sugiere de que a pesar de que existen diferencias en las respuestas hay muchos componentes globales de la defensa contra patógenos que son similares independiente del medio de entrada de este.

Interesantemente, aparece enriquecida la categoría de "presentación y procesamiento de antígenos" en una edad larval a en la cual no se ha encontrado un sistema de inmunidad adaptativa funcional, pero en la cual si existen células presentadoras de antígeno. Es importante destacar que se encontró un bajo número de proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas por medio de inmersión e inyección (4 y 1 respectivamente) categorizadas como "defensa frente a bacteria". Esto se puede deber a que al realizar un estudio de proteómica de larvas completas se genera un problema de dinámica de rangos, donde las proteínas que solamente aumentan sus niveles en los microambientes donde se encuentra la bacteria se encuentran en muy bajos niveles con respecto al total de proteínas de la larva, por lo que no pueden ser detectadas. A futuro es recomendable poder analizar la proteómica

de solo algunas porciones del pez y no toda la larva para conocer mejor los cambios locales en el lugar de la infección.

Aún falta mucha información para poder entender cabalmente en qué se diferencia (o asemeja) la respuesta del pez cebrá frente a una exposición por estos dos métodos. Sin embargo, este trabajo sugiere que a pesar de ser sumamente similares las respuestas desde un punto de vista proteómico, el método de inyección genera una respuesta de tipo inflamatoria e inmune con componentes que están ausentes en la respuesta frente a una exposición por medio de inmersión estática.

Dentro de los marcadores moleculares de respuesta inmune previamente descritos en experimentos de inyección utilizando *Salmonella typhimurium* (Stockhammer et al. 2009) o *E. tarda* (van Soest et al. 2011), se encuentran la interleuquina 1-beta (E0WCW4), el factor de necrosis tumoral beta (Q1JQ40), la proteína MxC que une GTP y es inducida por interferón (Q6DKF0) y los factores de activación transcripcional stat1b (Q6P943) y stat1a (B0S789), los cuales tuvieron sus niveles aumentados solamente en peces inyectados con *P. aeruginosa*. Por otro lado la interleuquina 8 tipo 1 (N0GW19) y la metaloproteasa de matriz 9 (P14780) que habían sido descritos como marcadores de respuesta inmune frente a una inyección con *S. typhimurium* no se encontraron aumentados significativamente en larvas expuestas por inyección, y solamente el primero de estos se encontró en larvas expuestas por medio de inmersión. En cambio, la metaloproteasa de matriz 9 se encontró disminuida en larvas expuestas por medio de inmersión. Esto indica que solo algunos factores son conservados entre las respuestas a distintos patógenos por medio de inyección. Cabe destacar que es posible que estas diferencias se deban en parte al tiempo post-exposición al cual se realizó el estudio y a la edad del pez.

La interleuquina beta y el factor de necrosis tumoral (tnfa) el cual es producido por los macrófagos en el pez cebra (Nguyen Chi et al. 2015), habían sido reportados como marcadores de la respuesta de larvas de 50 hpf expuestas a *P. aeruginosa* PA14 en el valle circulatorio del vitelo por medio de q-PCR (Clatworthy et al. 2009) y ambos también aumentaron sus niveles en peces inyectados en este trabajo, pero no en peces expuestos por medio de inmersión. Esto sugiere que estos resultados observados a nivel de transcrito se correlacionan a nivel de proteínas y que al parecer estos marcadores moleculares pudiesen utilizarse también en peces de 3 dpf inyectados con *P. aeruginosa* PAO1.

En este trabajo se encontraron nuevos posibles marcadores moleculares exclusivos de la respuesta del pez cebra frente a una infección con *P. aeruginosa* por medio de inyección en la arteria caudal e inmersión estática debido a su función y niveles de expresión. Proponemos como marcadores el producto del gen *mylka*, homólogo de la quinasa de la cadena liviana de la miosina en humanos, el cual se ha descrito como un importante factor en el riesgo de tener daño agudo al pulmón en humanos (Gao et al. 2006). También el producto del gen *chuk* el cual se ha descrito en ratones como importante en la respuesta de macrófagos frente a LPS en peritonitis (Kanaan et al. 2012) y la maduración de las células dendríticas (Mancino et al. 2013); y el producto del gen *cxcl11.6*, homólogo del gen *cxcl11* en humanos, involucrado en la quimiotaxis de células T activadas por interleuquinas, en el pez cebra esta quimioquina es importante en el reclutamiento de macrófagos en una infección con micobacteria (Torraca et al. 2015). Por su parte, el producto del gen *cish* es una proteína inducida por citoquinas cuyo homólogo en humanos esta involucrado en la regulación negativa de las citoquinas. Esta proteína no fue encontrada en larvas expuestas por medio de inyección, pero sí en los controles lo que sugiere que su

disminución puede ser importante en la respuesta inmune del pez. La expresión de este gen ya se había encontrado disminuida en peces frente a una infección bacteriana (Yao et al. 2015). Otro posible marcador molecular de infecciones por inyección son el producto del gen *ifit11*, homólogo del gen *ifit5* en humanos, el cual en salmones ha sido descrito como importante en la respuesta frente una inyección viral intramuscular (Chang et al. 2014). Sin embargo, sus niveles aumentaron 121 veces en larvas inyectadas con *P. aeruginosa* con respecto al control lo cual sugiere que también tiene un rol en la respuesta frente a patógenos bacterianos.

En cuanto a los marcadores moleculares de infecciones por inmersión, proponemos los productos de los genes *col8a2*, *col14a1a*, *col5a2b*, *vwa1*, *fyna*, *fynb*, *raf1a* y *map2k4a* que se encontraron aumentados exclusivamente en las larvas expuestas por medio de inmersión y disminuidos en las larvas expuestas por medio de inyección. Los genes *col8a2*, *col14a1a* y *col5a2b* son homólogos de los genes que codifican colágeno tanto en ratones como en humanos y debido a que en el método de inmersión estática las bacterias probablemente generan daño a la piel y las membranas externas la función de estos genes puede ser importante para la defensa del pez. El gen *col8a2* está involucrado en la migración celular y la mantención de los vasos sanguíneos. Los ratones mutantes del gen *col14a1a* tienen un defecto donde la piel se despega (Bader et al. 2013), y por lo tanto está involucrado en la integridad de la piel y de las membranas. El gen *col5a2b* es homólogo del gen *col5a2*, el cual está involucrado en la reparación de heridas y se ha reportado como importante en la respuesta de macrófagos frente a una infección de *Porphyromonas gingivallis in vitro* (Richard et al. 2013). El homólogo del gen *vwa1* en humanos puede estar involucrado en ensamblaje de la matriz extracelular y la respuesta frente al dolor. El gen *map2k4a* es homólogo al gen *map2k4* en humanos. La proteína quinasa MAP2K4 está

involucrada en la vía de MKK/JNK y es importante en la homeostasis linfoidea periférica. Esta involucrada en la respuesta de fibroblastos gingivales humanos frente a *P. gingivalis in vitro* (Herath et al. 2013). El gen *fyn*, homólogo de *fyna* y *fynb*, codifica una quinasa involucrada en el control del ciclo celular, el crecimiento, guía del axón, la señalización por medio de integrinas, la respuesta inmune y la migración celular. En ratones *fyn* es expresado en células T, y está involucrado en la señalización de los receptores de células T y la producción de la interleuquina 4 (Mamchak et al. 2008). RAF1 es el producto del gen homólogo a *raf1a* en humanos, es una proteína quinasa involucrada en distintas cascadas de señales. Dentro de estos procesos los procesos que regula, se encuentra la apoptosis, angiogénesis y migración celular. Particularmente en el pez cebra sus niveles disminuyen frente a una respuesta viral (Encinas et al. 2013).

En base a los resultados obtenidos es posible afirmar que las larvas de pez cebra de 3 dpf son un buen modelo para estudiar la patogénesis de *P. aeruginosa* por varias razones. Este trabajo entrega información sobre la respuesta del pez cebra a frente a un patógeno bacteriano a una edad donde el sistema inmune se encuentra más desarrollado, lo que permite conocer y estudiar de mejor manera tanto la función del sistema inmune como la patogénesis de *P. aeruginosa*.

Nuestros resultados sugieren que para estudiar la respuesta del sistema inmune del pez cebra frente a *P. aeruginosa* es preferible utilizar el método de exposición por inyección, dado que por medio de este método el pez genera una respuesta inflamatoria con componentes ausentes en la respuesta frente a una exposición por medio de inmersión. Sin embargo, debido a la poca variabilidad del inóculo y la simpleza del estudio, para realizar experimentos de virulencia bacteriana y

de factores de virulencia es preferible utilizar el método de exposición por inmersión estática.

Finalmente este trabajo valida el uso de la proteómica cuantitativa no isotópica (Q-exactive) para el estudio de la interacción hospedero-patógeno en el pez cebra y abre las puertas para el uso de esta metodología de espectrometría de masas de alta resolución para futuros experimentos donde se necesite conocer simultáneamente en una muestra compleja tanto las proteínas que se están expresando en el patógeno como en el hospedero.

CONCLUSIONES

En base a los resultados de este trabajo se puede concluir que:

1. Las larvas de pez cebra de 3 dpf son un buen modelo para estudiar la patogénesis bacteriana por medio de los métodos de inyección e inmersión estática.
2. La respuesta del pez cebra al ser expuesto a *P. aeruginosa* por estos dos métodos es similar desde un punto de vista global, pero algunos procesos de esta respuesta difieren dependiendo del método de exposición.
3. La respuesta del pez cebra al ser expuesto por inyección tiene componentes inmunes e inflamatorios ausentes en las larvas expuestas por inmersión.
4. Las larvas de pez cebra expuestas por medio de inmersión poseen una respuesta frente a hipoxia, posiblemente debido a un consumo o baja de la disponibilidad de oxígeno en el medio debido a las bacterias.
5. Los productos de los genes *mylka*, *chuk*, *cxcl11.6*, *cish* y *ifit11* son posibles marcadores de una infección de *P. aeruginosa* por medio de inyección y productos de los genes *col8a2*, *col14a1a*, *col5a2b*, *vwa1*, *fyna*, *fynb*, *raf1a* y *map2k4a* son posibles marcadores de una infección por medio de inmersión.

BIBLIOGRAFÍA

- Alan, I., Neely, A.N. & Frank, D.W., 2001. Type III secretion/intoxication system important in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burns. *Infection and Immunity*, 27, pp.129–130.
- Bader, H.L. et al., 2013. Zebrafish collagen XIV is transiently expressed in epithelia and is required for proper function of certain basement membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), pp.6777–6787.
- Benard, E.L. et al., 2012. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (61), pp.1–8.
- Bert, F., Branger, C. & Lambert-Zechovsky, N., 2002. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50(1), pp.11–18.
- Bodey, G. & Bolivar, R., 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Review of Infectious diseases*, 5, pp.279–313.
- Boshra, H., Li, J. & Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2), pp.239–262.
- Brannon, M.K. et al., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cellular Microbiology*, 11(5), pp.755–768.
- Chand, N.S. et al., 2011. The sensor kinase KinB regulates virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Bacteriology*, 193(12), pp.2989–2999.
- Chang, C.-J. et al., 2014. Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFN γ expression plasmid. *Vaccine*, 32(36), pp.4695–4702.
- Chang, M.X. & Nie, P., 2008. RNAi suppression of zebrafish peptidoglycan recognition protein 6 (zfPGRP6) mediated differentially expressed genes involved in Toll-like receptor signaling pathway and caused increased susceptibility to *Flavobacterium columnare*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(3-4), pp.295–301.
- Cheluvappa, R., 2014. Standardized chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *MethodsX*, 1, pp.67–73.
- Clatworthy, A.E. et al., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infection and immunity*, 77(4), pp.1293–303.
- Cornelis, P. & Dingemans, J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(November), p.75.
- Craig, R. & Beavis, R.C., 2004. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics*, 20(9), pp.1466–1467.
- Deng, Q., Harvie, E. a. & Huttenlocher, A., 2012. Distinct signaling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury. *Cellular Microbiology*, 14(4), pp.517–528.
- Encinas, P. et al., 2013. Identification of Multipath Genes Differentially Expressed in Pathway-Targeted Microarrays in Zebrafish Infected and Surviving Spring Viremia

- Carp Virus (SVCV) Suggest Preventive Drug Candidates. *PLoS ONE*, 8(9), pp.1–19.
- Esengil, H. et al., 2007. Small-molecule regulation of zebrafish gene expression. *Nature chemical biology*, 3(3), pp.154–155.
- Flajnik, M.F. & Kasahara, M., 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), pp.47–59.
- Folkesson, A. et al., 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature reviews. Microbiology*, 10(12), pp.841–51.
- Gao, L. et al., 2006. Novel polymorphisms in the myosin light chain kinase gene confer risk for acute lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(4), pp.487–495.
- Geer, L.Y. et al., 2004. Open Mass Spectrometry Search Algorithm research articles. *Journal of Proteome Research*, pp.958–964.
- Goody, M.F., Sullivan, C. & Kim, C.H., 2014. Studying the immune response to human viral infections using zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(1), pp.84–95.
- Hancock, R.E., 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27 Suppl 1, pp.S93–S99.
- Hardalo, C. & Edberg, S.C., 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical reviews in microbiology*, 23(1), pp.47–75.
- Harvie, E. a. & Huttenlocher, a., 2015. Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(October), pp.1–15.
- Herath, T.D.K. et al., 2013. Tetra- and Penta-Acylated Lipid A Structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS Differentially Activate TLR4-Mediated NF- κ B Signal Transduction Cascade and Immuno-Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts. *PLoS ONE*, 8(3).
- Herbomel, P., Thisse, B. & Thisse, C., 1999. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, 126(17), pp.3735–3745.
- Howe, K. et al., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), pp.498–503.
- Iwanami, N., 2014. Zebrafish as a model for understanding the evolution of the vertebrate immune system and human primary immunodeficiency. *Experimental Hematology*, 42(8), pp.697–706.
- Jacobs, M. a et al., 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp.14339–14344.
- Jimenez, P.N. et al., 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 76(1), pp.46–65.
- De Jong, J.L.O. & Zon, L.I., 2005. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annual review of genetics*, 39, pp.481–501.
- Kanaan, Z. et al., 2012. Macrophage genetic reprogramming during chronic peritonitis is augmented by LPS pretreatment. *Journal of Surgical Research*, 175(2), pp.289–297.

- Kanwal, Z. et al., 2014. Comparative studies of Toll-like receptor signalling using zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(1), pp.35–52.
- Kok, F.O. et al., 2015. Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. *Developmental Cell*, 32(1), pp.97–108.
- Krock, B.L., Skuli, N. & Simon, M.C., 2011. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes & Cancer*, 2(12), pp.1117–1133.
- Lin, B. et al., 2007. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals. *Molecular Immunology*, 44(4), pp.295–301.
- LiPuma, J., 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), pp.299–323.
- Llamas, M. a. et al., 2009. A novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 5(9).
- Long, J. et al., 2008. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery*, 144(2), pp.189–197.
- MacLean, B. et al., 2006. General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine. *Bioinformatics*, 22(22), pp.2830–2832.
- Mahajan-Miklos, S., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M., 2000. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Molecular Microbiology*, 37(5), pp.981–988.
- Mamchak, A. a et al., 2008. Normal development and activation but altered cytokine production of Fyn-deficient CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(8), pp.5374–5385.
- Mancino, A. et al., 2013. I kappa B kinase alpha (IKK α) activity is required for functional maturation of dendritic cells and acquired immunity to infection. *The EMBO journal*, 32(6), pp.816–28.
- Meijer, A.H. et al., 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular Immunology*, 40(11), pp.773–783.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., et al., 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature protocols*, 8(8), pp.1551–66.
- Mi, H., Muruganujan, A. & Thomas, P.D., 2013. PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp.377–386.
- Michalski, A. et al., 2011. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(9), p.M111.011015.
- Nguyen Chi, M. et al., 2015. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *eLife*, 4.
- Ortiz-Severín, J., 2013. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Universidad de Chile. , pp.1–98.
- Phennicie, R.T. et al., 2010. Specific resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection in zebrafish is mediated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infection and Immunity*, 78(11), pp.4542–4550.

- Pressley, M.E. et al., 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(6), pp.501–513.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H. & Mekalanos, J.J., 2002. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp.3159–3164.
- Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y., 2007. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protocols*, 2(8), pp.1896–1906.
- Rawls, J.F. et al., 2007. In vivo imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp.7622–7627.
- Rawls, J.F. et al., 2006. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, 127(2), pp.423–433.
- Rawls, J.F., Samuel, B.S. & Gordon, J.I., 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), pp.4596–4601.
- Reen, F.J. et al., 2013. A Non-Classical LysR-Type Transcriptional Regulator PA2206 Is Required for an Effective Oxidative Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(1).
- Renshaw, S. a et al., 2006. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 108(13), pp.3976–3978.
- Richard, G. et al., 2013. Partial Restoration of Macrophage Alteration from Diet-Induced Obesity in Response to *Porphyromonas gingivalis* Infection. *PLoS ONE*, 8(7).
- Ruyra, A. et al., 2014. Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. *Vaccine*, 32(31), pp.3955–3962.
- Slotta, D.J., McFarland, M. a. & Markey, S.P., 2010. MassSieve: Panning MS/MS peptide data for proteins. *Proteomics*, 10(16), pp.3035–3039.
- Van Soest, J.J. et al., 2011. Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*. *BMC immunology*, 12(1), p.58.
- Stockhammer, O.W. et al., 2009. Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to *Salmonella* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), pp.5641–5653.
- Stover, C.K. et al., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), pp.959–64.
- Torraca, V. et al., 2015. The CXCR3-CXCL11 signaling axis mediates macrophage recruitment and dissemination of mycobacterial infection. *Disease Models & Mechanisms*, 8(3), pp.253–269.
- Trede, N.S. et al., 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 20(4), pp.367–379.
- Veneman, W.J. et al., 2013. A zebrafish high throughput screening system used for *Staphylococcus epidermidis* infection marker discovery. *BMC genomics*, 14(1), p.255.

- Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), pp.22–30.
- Walters, K.B. et al., 2010. Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood*, 116(15), pp.2803–2811.
- Watzke, J., Schirmer, K. & Scholz, S., 2007. Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish immunology*, 23(4), pp.901–905.
- Wisniewski, J.R. et al., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Meth*, 6(5), pp.359–362.
- Wunderink, R. & Mendoza, D., 2010. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Unit. In *Infectious Disease in Critical Care*.
- Xiao, R. & Kisaalita, W.S., 1995. Purification of Pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 by Copper-Chelate Purification of Pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 by Copper-Chelate Chromatography. , 61(11).
- Yao, J. et al., 2015. Identification, phylogeny and expression analysis of suppressors of cytokine signaling in channel catfish. *Molecular immunology*, 64(2), pp.276–284.
- Zaborin, A. et al., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* overrides the virulence inducing effect of opioids when it senses an abundance of phosphate. *PLoS ONE*, 7(4).

ANEXO

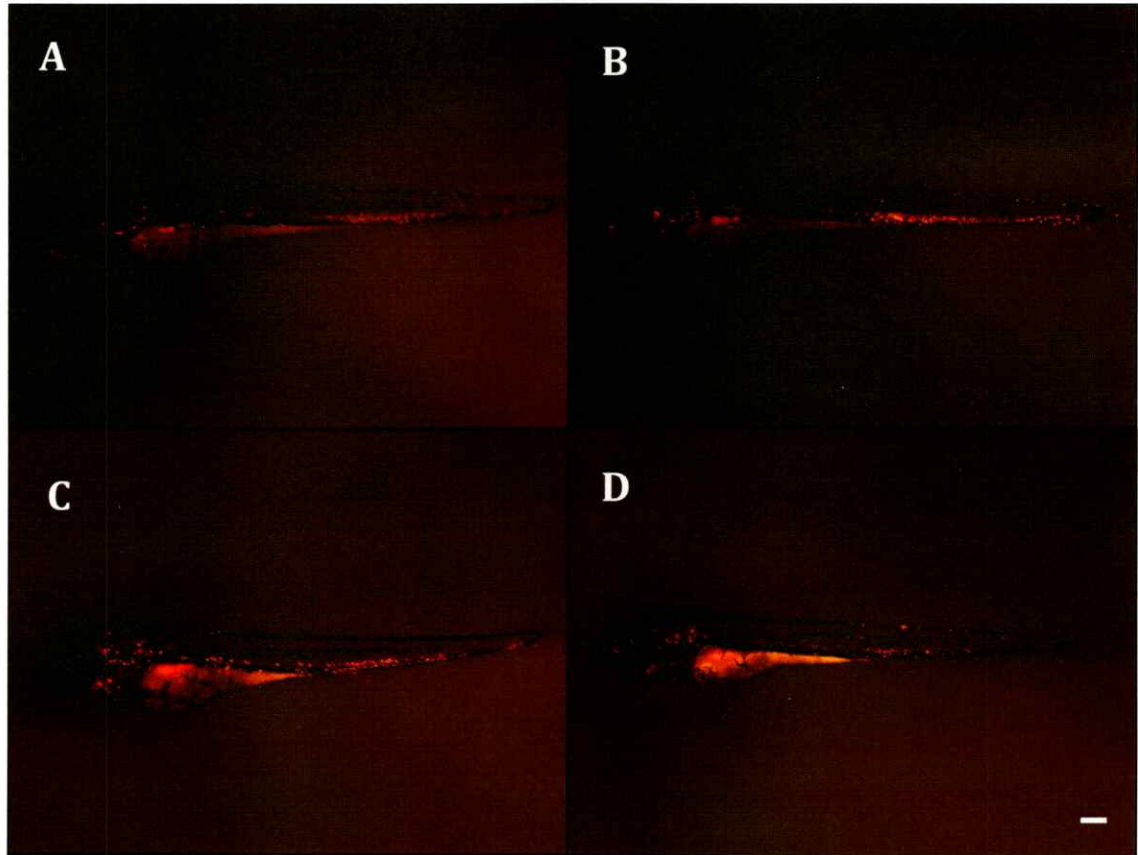


Figura suplementaria 1. Ensayos de inmersión con pez cebra de la línea Tg(BACmpo:mCherry). Larvas de pez cebra de 3 dpf inmersos en $\sim 2,5 \times 10^8$ UFC/mL de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas en medio PGS (\uparrow Pi) o en medio E3 estéril. (A) 6hpe con *P. aeruginosa*. (B) 6hpe con medio E3 estéril. (C) 22hpe con *P. aeruginosa*. (D) 22hpe con medio E3 estéril. Fotografías tomadas con una magnificación de 16X y filtro de fluorescencia rojo. Escala A-D: 100 μ m.

Tabla suplementaria 1. Conteo de unidades formadoras de colonia de las suspensiones bacterianas utilizadas en los ensayos de inmersión. Se muestra el promedio de las unidades formadoras de colonia por mililitro obtenidos para las distintas condiciones con su respectiva desviación estándar. N/A significa no aplicable, dado que esa condición no se utilizó.

		UFC/mL*10 ⁸		
Cepa	Medio	DO ₆₀₀ = 0,7	DO ₆₀₀ = 0,525	DO ₆₀₀ = 0,35
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PGS(\downarrow Pi)	5,67 \pm 1,16	4,3 \pm 0,866	2,83 \pm 0,577
	PGS(\uparrow Pi)	5,48 \pm 1,05	4,1 \pm 0,787	2,75 \pm 0,526
<i>E. coli</i> DH5 α	PGS(\downarrow Pi)	5,75 \pm 1,26	N/A	N/A
	PGS(\uparrow Pi)	5,1 \pm 0,742	N/A	N/A

Tabla Suplementaria 2. Resultados de proteómica comparativa que se encontraban en una categoría de proceso biológico de el GO. Número de proteínas clasificadas de acuerdo al proceso biológico de el GO para cada condición estudiada.

Proteínas con niveles cambiados por condición	Clasificadas	No-clasificadas
Aumentados en inyección	5262	7415
Aumentados en inmersión	5743	7864
Disminuidos en inyección	5677	7615
Disminuidos en inmersión	5547	7589

Tabla suplementaria 3. Proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección e inmersión. Proteínas con niveles aumentados 1,5 o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril o larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas incubadas en medio E3 estéril. Las proteínas se agruparon de acuerdo a su categoría bajo el GO proceso biológico, proceso del sistema inmune o respuesta frente al estímulo. Se señala el número de proteínas por sub-categoría y el porcentaje que estas representan del total de proteínas representadas en la categoría a la cual pertenecen.

Proteínas con niveles aumentados con respecto al control				
	Inyección		Inmersión	
	Proteínas	%	Proteínas	%
Proceso biológico				
Organización de los componentes celulares o biogénesis	406	4,10	490	4,40
Proceso celular	2029	20,40	2201	19,80
Localización	773	7,80	855	7,70
Proceso apoptótico	268	2,70	313	2,80
Reproducción	93	0,90	106	1,00
Regulación biológica	1083	10,90	1225	11,00
Respuesta frente a estímulo	662	6,60	779	7,00
Proceso de desarrollo	866	8,70	1009	9,10
Proceso de organismo multicelular	465	4,70	571	5,10
Locomoción	13	0,10	24	0,20
Adhesión biológica	230	2,30	240	2,20
Proceso metabólico	2579	25,90	2731	24,60
Crecimiento	2	0,00	2	0,00
Proceso del sistema inmune	494	5,00	565	5,10
Proceso del sistema inmune				
Activación de macrófagos	28	11,80	45	15,10
Procesamiento y presentación de antígenos	112	47,10	123	41,10
Respuesta inmune	98	41,20	131	43,80
Respuesta frente a estímulo				

Respuesta frente a sustancia tóxica	11	1,90	13	1,90
Respuesta frente a estrés	141	24,40	173	25,20
Respuesta frente a estímulo biológico	3	0,50	4	0,60
Respuesta frente a feromona	20	3,50	22	3,20
Respuesta frente a estímulo externo	97	16,80	105	15,30
Respuesta frente a estímulo abiótico	6	1,00	8	1,20
Respuesta de defensa celular	175	30,30	196	28,60
Comportamiento	4	0,70	3	0,40
Defensa frente a bacteria	1	0,20	4	0,60
Respuesta inmune	98	17,00	131	19,10
Respuesta frente a estímulo endógeno	22	3,80	27	3,90

Tabla suplementaria 4. Proteínas con niveles disminuidos en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección e inmersión. Proteínas con niveles disminuidos 1,5 o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril o larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas incubadas en medio E3 estéril. Las proteínas se agruparon de acuerdo a su categoría bajo el GO proceso biológico, proceso del sistema inmune o respuesta frente al estímulo. Se señala el número de proteínas por sub-categoría y el porcentaje que estas representan del total de proteínas representadas en la categoría a la cual pertenecen.

Proteínas con niveles disminuidos con respecto al control				
Categorías de acuerdo a la ontología del gen	Inyección		Inmersión	
	Proteínas	%	Proteínas	%
Proceso biológico				
Organización o biogénesis de componentes celulares	441	4,00	444	4,20
Proceso celular	2103	19,20	2140	20,10
Localización	829	7,60	798	7,50
Proceso apoptótico	327	3,00	315	3,00
Reproducción	113	1,00	96	0,90
Regulación biológica	1171	10,70	1165	10,90
Respuesta frente a estímulo	809	7,40	707	6,60
Proceso del desarrollo	1039	9,50	981	9,20
Proceso de organismo multicelular	560	5,10	492	4,60
Locomoción	23	0,20	16	0,20
Adhesión biológica	264	2,40	249	2,30
Proceso metabólico	2668	24,40	2750	25,80
Crecimiento	1	0,00	1	0,00
Proceso del sistema inmune	607	5,50	505	4,70
Proceso rítmico	1	0,00	0	0,00
Proceso del sistema inmune				
Activación de macrófagos	40	11,90	37	13,90

Procesamiento y presentación de antígenos	163	48,70	130	48,70
Respuesta inmune	132	39,40	100	37,50
Respuesta frente a estímulo				
Respuesta frente a sustancia tóxica	14	1,90	13	2,10
Respuesta frente a estrés	178	24,30	166	26,50
Respuesta frente a estímulo biológico	3	0,40	3	0,50
Respuesta frente a feromona	22	3,00	16	2,60
Respuesta frente a estímulo externo	112	15,30	103	16,40
Respuesta frente a estímulo abiótico	13	1,80	12	1,90
Respuesta de defensa celular	240	32,70	200	31,90
Comportamiento	1	0,10	3	0,50
Defensa frente a bacteria	2	0,30	0	0,00
Respuesta inmune	132	18,00	100	15,90
Respuesta frente a estímulo endógeno	16	2,20	11	1,80

Tabla suplementaria 5. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico. Las proteínas presentan un aumento de 1,5 veces o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Catabolismo	161	95,67	1,68	1,03E-07
Metabolismo de compuesto nitrogenado	326	211,46	1,54	1,04E-11
Mitosis	132	89,44	1,48	2,78E-03
Inducción de apoptosis	141	95,87	1,47	1,70E-03
Procesamiento y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II	110	76,99	1,43	4,55E-02
Proceso biosintético	188	136,34	1,38	2,69E-03
Regulación de función molecular	328	249,64	1,31	1,44E-04
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	1085	830,69	1,31	2,44E-18
Organización o	406	312,73	1,3	2,24E-05

biogénesis de componente celular				
Regulación de actividad catalítica	319	246,11	1,3	6,17E-04
Adhesión biológica	230	178,46	1,29	2,02E-02
Organización de componente celular	363	288,45	1,26	1,63E-03
Metabolismo	2579	2061,06	1,25	2,73E-45
Metabolismo primario	2139	1713,26	1,25	1,19E-32
Transporte mediado por vesículas	326	262,92	1,24	1,38E-02
Metabolismo de ARN	615	500,53	1,23	2,23E-05
Metabolismo de proteínas	859	720,71	1,19	7,55E-06
Proceso de modificación de proteína celular	482	407,15	1,18	1,97E-02
Transcripción desde promotor de la ARN polimerasa II	471	398,43	1,18	2,69E-02
Proceso celular	2029	1725,5	1,18	1,77E-16
Transcripción ADN-dependiente	486	414	1,17	3,77E-02
Regulación biológica	1083	963,08	1,12	2,96E-03
No-clasificado	1556	2082,84	0,75	0,00
Regulación del ciclo celular	37	64,75	0,57	2,59E-02

Tabla suplementaria 6. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan un aumento de 1,5 veces o más veces al comparar larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a incubadas en medio E3 estéril. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Morfogénesis de anatomía estructural	241	161,48	1,49	3,95E-07
Morfogénesis de componente celular	189	127,29	1,48	3,01E-05
Inducción de apoptosis	155	104,64	1,48	4,35E-04
Biogénesis de componente celular	108	74,29	1,45	2,81E-02
Organización o biogénesis de	490	341,31	1,44	6,68E-13

componente celular				
Procesamiento y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II	120	84,03	1,43	2,50E-02
Procesamiento y presentación de antígeno	123	86,74	1,42	2,75E-02
Mitosis	138	97,62	1,41	1,27E-02
Organización de componentes celulares	445	314,82	1,41	1,27E-10
Organización de organelo	195	140,87	1,38	1,54E-03
Movimiento de componente celular	179	131,81	1,36	9,67E-03
Regulación de función molecular	354	272,46	1,3	1,50E-04
Regulación de actividad catalítica	347	268,61	1,29	3,18E-04
Transcripción ADN-dependiente	556	451,84	1,23	9,19E-05
Transcripción desde promotor de la ARN polimerasa II	534	434,85	1,23	2,00E-04
Metabolismo de compuestos que contiene bases nucleicas	1112	906,62	1,23	5,99E-11
Regulación del metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	494	406,54	1,22	1,51E-03
Metabolismo	2731	2249,46	1,21	6,81E-36
Metabolismo de compuesto fosfatados	371	307,11	1,21	3,27E-02
Metabolismo primario	2258	1869,87	1,21	6,64E-25
Proceso de modificación de proteína celular	536	444,37	1,21	1,31E-03
Metabolismo de ARN	655	546,28	1,2	2,32E-04
Regulación de transcripción desde promotores de la ARN polimerasa II	411	343,13	1,2	2,83E-02

Metabolismo de proteínas	929	786,59	1,18	1,11E-05
Proceso de sistema	472	402,01	1,17	4,85E-02
Proceso celular	2201	1883,23	1,17	1,42E-16
Proceso de desarrollo	1009	864,95	1,17	2,32E-05
Regulación biológica	1225	1051,12	1,17	7,11E-07
Proceso de organismo multicelular	571	493,06	1,16	3,85E-02
Comunicación celular	1017	880,8	1,15	1,18E-04
Localización	855	750,57	1,14	6,96E-03
Transporte	811	718,87	1,13	3,52E-02
No-clasificado	1738	2273,24	0,76	0,00

Tabla suplementaria 7. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan una disminución de 1,5 veces o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Procesamiento y presentación de antígeno	163	85,75	1,9	9,93E-12
Procesamiento y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II	156	83,06	1,88	8,59E-11
Inducción de apoptosis	184	103,43	1,78	7,33E-11
Organización de cromatina	87	54,4	1,6	5,65E-03
Secreción de neurotransmisor	85	54,85	1,55	1,95E-02
Respuesta de defensa celular	240	159,18	1,51	1,79E-07
Organización de organelo	197	139,26	1,41	3,75E-04
Adhesión celular	258	184,7	1,4	2,72E-05
Adhesión biológica	264	192,54	1,37	8,29E-05
Regulación de actividad catalítica	359	265,53	1,35	2,79E-06
Regulación de función	363	269,33	1,35	3,18E-06

molecular				
Morfogénesis de componente celular	168	125,82	1,34	3,57E-02
Organización de componente celular	415	311,2	1,33	9,45E-07
Organización o biogénesis de componente celular	441	337,39	1,31	3,11E-06
Desarrollo del sistema nervioso	318	243,36	1,31	3,49E-04
Desarrollo del ectodermo	267	207,99	1,28	7,61E-03
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	1144	896,2	1,28	3,43E-16
Muerte celular	333	272,02	1,22	2,90E-02
Muerte	334	273,14	1,22	3,06E-02
Proceso apoptótico	327	267,76	1,22	3,90E-02
Proceso del sistema inmune	607	499,26	1,22	1,14E-04
Proceso del desarrollo	1039	855,01	1,22	3,66E-09
Transcripción ADN-dependiente	541	446,65	1,21	7,51E-04
Transcripción desde promotor de la ARN polimerasa II	520	429,86	1,21	1,34E-03
Regulación del metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	485	401,87	1,21	3,49E-03
Metabolismo	2668	2223,61	1,2	6,62E-31
Desarrollo de sistema	470	392,47	1,2	9,47E-03
Metabolismo primario	2200	1848,38	1,19	1,19E-20
Metabolismo de ARN	639	540,01	1,18	1,49E-03
Respuesta frente a estímulo	809	703,66	1,15	3,74E-03
Proceso celular	2103	1861,59	1,13	1,68E-09
Comunicación celular	982	870,68	1,13	6,38E-03
Regulación celular	1171	1039,04	1,13	9,55E-04
No-clasificado	1725	2247,11	0,77	0,00

Tabla suplementaria 8. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan una disminución de 1,5 veces o más veces al comparar larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a incubadas en medio E3 estéril. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Organización de cromatina	87	53,16	1,64	2,51E-03
Metabolismo de DNA	132	83,78	1,58	1,23E-04
Inducción de apoptosis	157	101,07	1,55	2,56E-05
Procesamiento y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II	126	81,16	1,55	4,41E-04
Procesamiento y presentación de antígeno	130	83,78	1,55	3,16E-04
Procesamiento de ARNm	96	62,56	1,53	1,02E-02
Catabolismo	154	100,85	1,53	8,88E-05
Metabolismo de compuesto nitrogenado	329	222,91	1,48	1,41E-09
Regulación de función molecular	355	263,16	1,35	4,14E-06
Organización o biogénesis de componente celular	444	329,67	1,35	7,59E-08
Regulación de actividad catalítica	348	259,44	1,34	9,93E-06
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	1174	875,68	1,34	6,72E-24
Organización de componente celular	407	304,07	1,34	8,68E-07
Adhesión celular	241	180,47	1,34	1,56E-03
Adhesión célula a célula	173	129,72	1,33	3,04E-02
Adhesión biológica	249	188,13	1,32	2,00E-03
Organización de organelo	180	136,07	1,32	3,34E-02
Metabolismo de	389	296,63	1,31	1,62E-05

compuesto fosfatados				
Fosforilación de proteínas	299	229,69	1,3	9,39E-04
Metabolismo primario	2291	1806,05	1,27	3,59E-40
Metabolismo	2750	2172,69	1,27	2,20E-53
Ciclo celular	432	344,32	1,25	3,04E-04
Metabolismo de ARN	653	527,64	1,24	3,36E-06
Proceso de modificación de proteína celular	521	429,2	1,21	9,02E-04
Metabolismo de proteínas	911	759,74	1,2	1,02E-06
Proceso celular	2140	1818,96	1,18	1,60E-17
Proceso de desarrollo	981	835,43	1,17	1,07E-05
Regulación biológica	1165	1015,25	1,15	3,83E-05
No-clasificado	1608	2195,66	0,73	0,00

Tabla suplementaria 9. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan un aumento de 1,5 veces o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril, y sólo se encontraron aumentadas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Replicación de ADN	38	19,18	1,98	2,01E-02
Reparación de ADN	49	26	1,88	7,44E-03
Catabolismo	109	64,09	1,7	3,38E-05
Metabolismo de ADN	87	53,24	1,63	2,50E-03
Metabolismo de compuesto nitrogenado	213	141,66	1,5	1,44E-06
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	732	556,48	1,32	7,44E-13
Metabolismo de ARN	421	335,3	1,26	2,44E-04
Metabolismo	1721	1380,7	1,25	4,70E-29
Metabolismo primario	1421	1147,71	1,24	6,16E-20
Metabolismo de proteínas	576	482,8	1,19	1,01E-03
Proceso celular	1350	1155,91	1,17	7,56E-10
No-clasificado	1041	1395,29	0,75	0,00

Tabla suplementaria 10. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados exclusivamente en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan un aumento de 1,5 veces o más veces al comparar larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a incubadas en medio E3 estéril, y sólo se encontraron aumentadas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Morfogénesis de componente celular	137	88,79	1,54	2,04E-04
Morfogénesis de estructura anatómica	171	112,64	1,52	2,67E-05
Organización o biogénesis de componente celular	344	238,08	1,44	3,41E-09
Organización de organelo	140	98,27	1,42	7,49E-03
Organización de componente celular	312	219,6	1,42	1,79E-07
Transcripción ADN dependiente	400	315,18	1,27	1,96E-04
Transcripción desde promotor de la ARN polimerasa II	382	303,33	1,26	7,06E-04
Regulación del metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	352	283,58	1,24	5,53E-03
Regulación de la transcripción desde promotor de la ARN polimerasa II	296	239,35	1,24	3,12E-02
Proceso de modificación de proteína celular	379	309,96	1,22	9,05E-03
Metabolismo de ARN	461	381,06	1,21	3,42E-03
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	759	632,41	1,2	1,05E-05
Metabolismo	1873	1569,1	1,19	2,44E-20
Metabolismo primario	1540	1304,32	1,18	5,66E-13
Metabolismo de proteínas	646	548,68	1,18	1,47E-03
Regulación biológica	862	733,2	1,18	3,05E-05

Proceso del desarrollo	709	603,34	1,18	5,93E-04
Localización	609	523,56	1,16	1,04E-02
Proceso celular	1522	1313,64	1,16	5,19E-10
Comunicación celular	708	614,4	1,15	6,68E-03
Regulación de proceso biológico	624	545,36	1,14	4,41E-02
No-clasificado	1223	1585,69	0,77	0,00

Tabla suplementaria 11. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles aumentados tanto en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección como en inmersión. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan un aumento de 1,5 veces o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril y larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas incubadas en medio E3 estéril. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Inducción de apoptosis	54	31,65	1,71	3,50E-02
Metabolismo de compuesto nitrogenado	113	69,8	1,62	1,54E-04
Adhesión biológica	91	58,91	1,54	1,01E-02
Adhesión celular	87	56,51	1,54	1,65E-02
Regulación de función molecular	121	82,41	1,47	5,59E-03
Regulación de actividad catalítica	117	81,24	1,44	1,66E-02
Organización o biogénesis de componente celular	146	103,23	1,41	5,16E-03
Organización de componente celular	133	95,22	1,4	2,04E-02
Metabolismo de compuestos que contienen bases nucleicas	353	274,21	1,29	6,86E-05
Metabolismo primario	718	565,55	1,27	2,51E-12
Metabolismo	858	680,36	1,26	8,08E-16
Proceso celular	679	569,59	1,19	4,40E-06
No-clasificado	515	687,55	0,75	0,00

Tabla suplementaria 12. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan una disminución de 1,5 veces o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril, y sólo se encontraron disminuidas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Procesamiento y presentación de antígeno	107	59,53	1,8	3,21E-06
Procesamiento y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II	100	57,66	1,73	4,72E-05
Inducción de apoptosis	115	71,8	1,6	2,81E-04
Respuesta de defensa celular	163	110,5	1,48	2,71E-04
Organización de organelo	138	96,67	1,43	7,74E-03
Organización de componente celular	290	216,03	1,34	9,93E-05
Regulación de actividad catalítica	245	184,33	1,33	1,53E-03
Regulación de función molecular	248	186,97	1,33	1,55E-03
Organización o biogénesis de componente celular	307	234,22	1,31	3,27E-04
Proceso del sistema inmune	437	346,59	1,26	1,12E-04
Metabolismo de compuestos que contiene bases nucleicas	759	622,15	1,22	7,20E-07
Respuesta frente a estímulo	578	488,49	1,18	2,85E-03
Proceso del desarrollo	700	593,55	1,18	4,25E-04
Metabolismo	1817	1543,64	1,18	1,16E-16
Metabolismo primario	1486	1283,15	1,16	1,17E-09
Localización	592	515,06	1,15	4,25E-02
Proceso celular	1456	1292,32	1,13	4,53E-06
No-clasificado	1214	1559,96	0,78	0,00

Tabla suplementaria 13. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos exclusivamente en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inmersión. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan una disminución de 1,5 veces o más veces al comparar larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a incubadas en medio E3 estéril, y sólo se encontraron disminuidas en esta condición. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Poliadenilación de ARNm	20	6,61	3,02	4,35E-03
Procesamiento del 3' de ARNm	22	7,97	2,76	6,67E-03
Replicación de ADN	41	20,74	1,98	1,15E-02
Procesamiento de ARN	75	42,98	1,74	1,17E-03
Reparación de ARN	49	28,1	1,74	4,57E-02
Metabolismo de ADN	99	57,56	1,72	7,73E-05
Catabolismo	117	69,29	1,69	1,77E-05
Metabolismo de compuesto nitrogenado	235	153,15	1,53	4,43E-08
Mitosis	97	64,78	1,5	2,11E-02
Organización o biogénesis de componente celular	310	226,49	1,37	6,74E-06
Fosforilación de proteína	214	157,81	1,36	1,73E-03
Organización de componente celular	282	208,91	1,35	9,01E-05
Regulación de función molecular	240	180,8	1,33	2,03E-03
Metabolismo de compuesto fosfatado	270	203,8	1,32	6,47E-04
Ciclo celular	313	236,56	1,32	1,14E-04
Regulación de actividad catalítica	234	178,25	1,31	5,24E-03
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	789	601,63	1,31	1,36E-13
Metabolismo	1899	1492,72	1,27	2,29E-38
Metabolismo primario	1577	1240,83	1,27	5,75E-28
Metabolismo de proteína	643	521,97	1,23	3,76E-06
Metabolismo de ARN	446	362,51	1,23	9,51E-04

Modificación de proteína celular	360	294,88	1,22	1,54E-02
Proceso celular	1493	1249,69	1,19	1,61E-14
Regulación biológica	793	697,51	1,14	9,76E-03
No-clasificado	1097	1508,5	0,73	0,00

Tabla suplementaria 14. Análisis de enriquecimiento de grupos de ontología de genes en proteínas con niveles disminuidos tanto en larvas expuestas a *P. aeruginosa* por medio de inyección como en inmersión. Análisis de grupos de proteínas sobrerrepresentadas o subrepresentadas agrupadas de acuerdo al proceso biológico asociado. Las proteínas presentan una disminución de 1,5 veces o más veces al comparar larvas inyectadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas inyectadas con PBS estéril y larvas co-incubadas con *P. aeruginosa* PAO1 con respecto a larvas incubadas en medio E3 estéril. Se determinó como significativo un $P \leq 0,05$.

Categorías de GO de acuerdo a proceso biológico	Proteínas encontradas	Proteínas Esperadas	Razón de enriquecimiento	Valor P
Procesamiento y presentación de antígeno (péptido o polisacárido) vía MHC de clase II	56	25,4	2,2	1,82E-05
Inducción de apoptosis	69	31,63	2,18	9,00E-07
Procesamiento y presentación de antígeno	56	26,22	2,14	4,94E-05
Adhesión biológica	94	58,88	1,6	2,26E-03
Adhesión celular	90	56,48	1,59	3,72E-03
Respuesta de defensa celular	77	48,68	1,58	1,85E-02
Desarrollo del ectodermo	98	63,6	1,54	5,74E-03
Desarrollo del sistema nervioso	107	74,42	1,44	3,53E-02
Metabolismo de compuesto que contiene bases nucleicas	385	274,05	1,4	4,28E-10
Proceso del desarrollo	339	261,46	1,3	6,51E-05
Metabolismo primario	714	565,23	1,26	9,95E-12
Metabolismo	851	679,97	1,25	1,21E-14
Proceso celular	647	569,26	1,14	1,01E-02
No-clasificado	511	687,16	0,74	0,00

Tabla suplementaria 15. Marcadores de infección propuestos. Se señalan los marcadores de infección propuestos para cada método de infección con sus niveles encontrados en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* por dicho método con respecto al control y algunos marcadores previamente descritos. El infinito indican cuando la proteína se encontró en las larvas expuestas a *P. aeruginosa* pero no en el control, el -infinito indica lo opuesto.

Gen	Proteína	Larvas expuestas por medio de	
		Inyección	Inmersión
Marcadores propuestos de infección por inyección			
<i>mylka</i>	F1R221	16,74796824	No encontrada
<i>chuk</i>	Q4G3H4	1,927898818	-20,0955513
<i>cxcl11.6</i>	B0R191	5,295400422	No encontrada
<i>cish</i>	Q08BW5	-Infinito	No encontrada
<i>ifit11</i>	A0A068FMS3	121,0244671	2,899418887
Marcadores propuestos de infección por inmersión estática			
<i>col8a2</i>	Q1LUA9	- Infinito	Infinito
<i>col14a1a</i>	F1R9Y1	-14,06338906	29,27842098
<i>vwa1</i>	E7FF10	- Infinito	25,44124559
<i>fyna</i>	Q6EWH2	- Infinito	5,357775328
<i>raf1a</i>	F1QQZ9	-8,200269979	Infinito
<i>map2k4a</i>	B1NA68	1,139648296	6,657511998
<i>fynb</i>	F1RDG9	- Infinito	5,900946751
<i>col5a2b</i>	E7FE47	-1,51396964	1,989386025
Marcadores previamente descritos			
<i>tnfa</i>	Q6T9C7	Infinito	No encontrada
<i>il1b</i>	E0WCW4	Infinito	- Infinito
<i>il8l1</i>	N0GW19	-Infinito	Infinito
<i>tnfb</i>	Q1JQ40	Infinito	- Infinito
<i>mxo</i>	Q6DKF0	10.9656106	- Infinito
<i>stat1b</i>	B0S789	2,265503352	-1,2389912
<i>stat1a</i>	Q6P943	Infinito	-4,072107066
<i>mmp9</i>	P14780	-1,236213485	-2,037597527