

Aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a nitrato de galio en cepas de
Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes con fibrosis quística

Vanesa Angarita Zapata

Trabajo de Grado para Optar el Título de Ingeniera Química

Directora

Viviana Sánchez Torres

Doctora en Ingeniería Química

Codirector

Rodolfo García Contreras

Doctor en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A Dios.

Porque en cada paso me ha acompañado siempre, siendo cómplice en cada momento de mi vida ayudándome y dándome siempre valor para seguir mejorando.

A mis padres.

Por su dedicación y esmero en mi educación, su gran ejemplo, su compañía y respaldo además de su amor incondicional.

A mis hermanos.

Por todo el ánimo y apoyo desde lejos, siempre estarán cerca los llevo en mi corazón.

A mis maestros.

Porque con su sabiduría, paciencia y conocimientos impartidos no sólo en la realización de este trabajo sino también en varios momentos de la carrera forman profesionales amantes de la investigación.

A mis familiares y amigos.

Cada uno sabe por qué.

Agradecimientos

A mi directora, la profesora Viviana Sánchez, por haberme brindado la oportunidad de aprender y encontrarme con grandes personas que serán inolvidables, por su paciencia y correcciones y por cada enseñanza.

Al profesor Rodolfo García, quien además de ser un gran maestro es una gran persona, por haberme acogido y brindarme las bases y conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

A la familia García Contreras por acogerme como un miembro más de su familia.

A la doctora Silvia Julieta, por estar muy pendiente de mi salud y bienestar en todo momento.

A la doctora Ana María Fernández por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al estudiante de Pos-Doctorado Yael Gonzales Tinoco, por enseñarme microbiología con historias de luchas medievales.

Al estudiante de Doctorado Esaú López, por ayudarme con experimentos finales.

A las estudiantes de maestría Paulina y Berenice por enseñarme protocolos de laboratorio.

A la familia Castañeda Tamez por acogerme en su hogar.

Al grupo de investigación GIMBA y todo su equipo de trabajo, en especial la técnica Yury López, por permitirme terminar los pendientes en el laboratorio.

A todos los maestros y personal de trabajo de la escuela de Ingeniería química.

A relaciones exteriores de la UIS y la UNAM por facilitar la pasantía de investigación.

A mis amigos y todas aquellas personas que se cruzaron en mi camino en esta etapa de realización del trabajo.

Tabla de contenido

Introducción	12
1. Objetivos	15
1.1 <i>Objetivo General</i>	15
1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	15
2. Estado del arte.....	16
3. Marco teórico	17
3.1 <i>Resistencia bacteriana a los antibióticos</i>	17
3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3.2.1 Factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> :	19
3.2 <i>Uso de galio como antimicrobiano</i>	20
3.2.1 Concentración mínima inhibitoria.	21
4. Metodología	21
4.1. <i>Material biológico utilizado</i>	22
4.2. <i>Medio de cultivo</i>	23
4.3. <i>Materiales, técnicas y diseño experimental</i>	23
4.3.1 Identificación de cepas sensibles y resistentes a nitrato de galio.....	24
4.3.2. Producción de pioverdina y piocianina.....	24

4.3.3 Obtención de mutantes resistentes.	25
4.3.4 Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs).	27
4.4 Medición de galio intracelular.	27
5. Resultados	29
5.1 Pruebas de sensibilidad a nitrato de galio.	29
5.2 Cultivos secuenciales de cepas para obtención de mutantes resistentes.	31
5.3 Diferencias en el crecimiento	33
5.4 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (MICs).	35
5.5 Medición de factores de virulencia: pioverdina y piocianina.	38
5.5.1 Pioverdina.	38
5.5.2 Piocianina.	40
5.6 Concentraciones de galio intracelular.	41
6. Conclusiones	43
Referencias Bibliográficas	45
Apéndices	49

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Cepas de Pseudomonas aeruginosa utilizadas y descripción</i>	22
Tabla 2. <i>Descripción de obtención de mutantes resistentes</i>	31
Tabla 3. <i>MICs en cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.</i>	38

Lista de figuras

<i>Figura 1.</i> Procedimiento pases consecutivos.....	26
<i>Figura 2.</i> Sensibilidad a nitrato de galio en diferentes cepas clínicas y E12, mutante espontánea resistente derivada de la cepa PA14.	30
<i>Figura 3.</i> Velocidades específicas de crecimiento cepas 30R, 58M y mutantes respectivas. .	33
<i>Figura 4.</i> Tiempo de duplicación cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.	34
<i>Figura 5.</i> MICs 50 cepa PA14 parental y mutantes espontáneas.	36
<i>Figura 6.</i> MICs cepa 30R parental y mutantes espontáneas.....	37
<i>Figura 7.</i> MICs cepa 58M parental y mutantes espontáneas.	37
<i>Figura 8.</i> Producción de pioverdina cepas 30R, 58M parentales y mutantes espontáneas con y sin galio.....	39
<i>Figura 9.</i> Producción de piocianina cepas 30R, 58M parentales y mutantes espontáneas con y sin galio.....	40
<i>Figura 11.</i> Galio intracelular cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.	42
<i>Figura 12.</i> Galio intracelular cepas 30R, 58M y mutantes respectivas	42

Lista de Apéndices

Apéndice A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
Apéndice B. Lista de prioridades de patógenos globales para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.	50
Apéndice C. Medios de cultivo.....	50
Apéndice D. Descripción tratamiento de cepas para obtención de mutantes.	51
Apéndice E. Tablas de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.	55
Apéndice F. Cepas preservadas sometidas a galio con crecimiento de 24 h.	56
Apéndice G. Datos para curva de calibración para mediciones de galio en AAS.	58

Resumen

TÍTULO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A NITRATO DE GALIO EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA *

AUTOR: VANESA ANGARITA ZAPATA **

PALABRAS CLAVE: Mutantes en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia, nitrato de galio, factores de virulencia, técnicas espectrofotométricas.

DESCRIPCIÓN:

La resistencia a galio en las cepas clínicas de referencia PAO1 y PA14 de *Pseudomonas aeruginosa* puede emerger fácilmente. Este trabajo tiene la finalidad de estudiar la resistencia al galio en cepas clínicas de recién aislamiento provenientes de pacientes con fibrosis quística y además determinar qué tan rápido se hacen resistentes, así como los mecanismos de resistencia implicados. Se seleccionaron posibles cepas mutantes resistentes a galio a partir cultivos de 10 aislados clínicos y de la cepa PA14 como control sometidos a diferentes concentraciones de galio para evaluar la susceptibilidad al mismo y el número de generaciones necesarias hasta la obtención de cepas resistentes. Se hicieron cultivos secuenciales de las cepas en las que se observó la aparición de resistencia al galio y se aislaron posibles mutantes espontáneos resistentes. Finalmente se evaluó la producción de pioverdina; piocianina y contenido de galio intracelular por medio de técnicas espectrofotométricas y de absorción atómica para obtener información de los mecanismos por medio de los cuales las cepas se vuelven resistentes al galio.

La obtención de resistencia a galio en cepas clínicas y de laboratorio de *Pseudomonas aeruginosa* se dio de manera espontánea, el número de generaciones promedio antes de presentar resistencia galio se encuentra entre 3 a 5 y es diferente para cada cepa, la producción tanto de pioverdina como piocianina puede estar relacionada con el mecanismo de resistencia de las mutantes obtenidas.

La internalización de galio es mayor en las cepas parentales que en mutantes lo que hace evidente la resistencia a galio por parte de estas cepas clínicas.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingeniería Físicoquímica. Escuela de Ingeniería Química. Directora: PhD

Viviana Sánchez Torres. Codirector: PhD Rodolfo García Contreras.

Abstract

TITLE: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GALLIUM NITRATE RESISTANT MUTANTS IN *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS *

AUTHOR: VANESA ANGARITA ZAPATA**

KEYWORDS: *Pseudomonas aeruginosa* mutant strains, resistance, gallium nitrate, virulence factors, spectrophotometric techniques.

DESCRIPTION:

Gallium resistance in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains of reference PA01 and PA14 can easily emerge. The purpose of this work is to study gallium resistance in recently clinical strains isolated from patients with cystic fibrosis and to determine how fast they become resistant, as well as the resistance mechanisms involved. Possible mutant strains gallium-resistant were selected from cultures of 10 clinical isolates and strain PA14 as a control by subjecting them to different concentrations of gallium to evaluate the susceptibility and the number of generations until resistant strains were obtained. Sequential cultures of the strains were made when appearance of gallium resistance was observed, and possible resistant spontaneous mutants were isolated. Finally, the production of pyoverdine, pyocyanin and intracellular gallium content were evaluated by spectrophotometric and atomic absorption techniques to obtain information about the strains mechanisms of resistant to gallium. Gallium resistance in clinical and laboratory strains *Pseudomonas aeruginosa* occurred spontaneously, the number of average generations before presenting gallium resistance is different for each strain, the production of both pyoverdine and pyocyanin may be related to the mechanism of resistance obtained. Internalization of gallium is greater in the parental strains than in mutants, which makes evident the resistance to gallium of these clinical strains.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: PhD Viviana Sánchez Torres. Codirector: PhD Rodolfo García Contreras.

Introducción

Una de las características en el estudio de la ingeniería química es su flexibilidad y amplio rango en diferentes campos de investigación, gracias a esto, el presente trabajo combina conceptos de ingeniería, microbiología médica y bioprocesos para estudiar la resistencia antimicrobiana a galio de uno de los patógenos oportunistas existentes más problemáticos al día de hoy, *Pseudomonas aeruginosa*, una de las bacterias infecciosas causante de alta tasa de mortalidad, resistente a múltiples antibióticos y con necesidad de nuevas alternativas eficientes que faciliten el tratamiento a pacientes afectados (García-Contreras et al., 2018).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria de fácil adaptación a diferentes fármacos antibacterianos, la producción de diversos factores de virulencia los cuales ayudan en su crecimiento también podrían estar ligados a la aparición de resistencia a nuevos antimicrobianos (García-Contreras, 2013). Lo anterior indica que es necesario un estudio a cerca del comportamiento y los mecanismos por medio de los cuales se genera resistencia a nuevos antimicrobianos y con ello la búsqueda de nuevos tratamientos para diversas cepas multirresistentes.

El hierro es primordial en el crecimiento de estas bacterias patógenas y el galio (Ga^{3+}) es un metal mimético del hierro, con la diferencia crucial de que no es óxido reducible, el cual interfiere con el crecimiento de *P. aeruginosa* inhibiéndola y generando efectos bactericidas y bacteriostáticos (Kaneko Y, 2007). El galio ha sido caso de estudio de diferentes trabajos y se ha propuesto como una opción para el tratamiento de *P. aeruginosa* al obstaculizar el metabolismo dependiente del hierro (Hijazi, Visca, & Frangipani, 2017), sin embargo, García-Contreras y

colaboradores demostraron que la resistencia frente a la inhibición ejercida por el Ga^{3+} puede emerger rápidamente.

En este trabajo se estudió la resistencia al galio en cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística sometiendo a concentraciones inicialmente bajas de nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) para determinar qué tan sensibles eran y posteriormente someterlas a mayores concentraciones en cultivos secuenciales para generar adaptación al medio con galio y obtener así las posibles mutantes espontáneas con resistencia a este metal. Por tanto se determinó el crecimiento de cada cepa parental en comparación con las mutantes obtenidas de la misma. Se midieron fenotipos asociados tales como producción de factores de virulencia: pioverdina y piocianina tanto en cepas mutantes como en parentales. Se proporciona evidencia de la sobreproducción de pioverdina y piocianina en una de las cepas resistentes al igual que una menor internalización de galio por parte de dos cepas resistentes en comparación con sus cepas parentales, fenotipos que muy probablemente estén ligados a resistencia adquirida de estas posibles mutantes.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Estudiar la generación de resistencia a galio en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2 Objetivos Específicos

- Obtener mutantes resistentes a galio a partir de cepas clínicas y de laboratorio.
- Determinar el número de generaciones necesarias para aislar las resistentes.
- Determinar la producción de pioverdina, piocianina e internalización de galio.

2. Estado del arte

Uno de los problemas más grandes a tratar en la actualidad es la proliferación bacteriana y su resistencia a diferentes clases de antibióticos utilizados causantes de altas tasas de mortalidad (Hijazi et al., 2018).

El hierro al tener gran relevancia en el metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* y en general en toda bacteria patógena es esencial para mantener su crecimiento y así poder generar infección en el paciente. Los sistemas de absorción, la capacidad de adquisición en el medio en donde se encuentre, y el metabolismo del hierro se han convertido en uno de los blancos novedosos de ataque en *P. aeruginosa* (Hijazi, Visca, & Frangipani, 2017).

El estudio de galio (Ga^{3+}) y su capacidad de imitar al hierro interrumpiendo su metabolismo en la bacteria ha sido probado en diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* teniendo éxito como antimicrobiano, con todo lo anterior se ha demostrado que el galio inhibe el crecimiento bacteriano en concentraciones inocuas para el ser humano. Diversos estudios han demostrado que múltiples compuestos con galio tienen gran efecto terapéutico contra diferentes bacterias patógenas e incluso ciertos tipos de cáncer (Chitambar, 2016). En el año 2007, Kaneko y colaboradores encontraron pocas cepas con alta tolerancia a galio en 115 aislados clínicos de pacientes con fibrosis quística siendo 23 de ellos multiresistentes a antibióticos; sin embargo, se demostró en la cepa de referencia PA14 que la resistencia frente a la inhibición ejercida por galio puede surgir fácilmente por cambios en determinados genes como la inactivación de los genes *hitAB* (García-Contreras, 2013).

El galio entra a la célula mediante HitAB y otros transportadores desconocidos, interrumpe los sistemas de consumo de hierro conduciendo al estancamiento celular o la muerte (García-

Contreras et al., 2013). Hijazi y colaboradores explican la entrada de un compuesto de galio a *P. aeruginosa* mediante tres posibles vías: por difusión, a través de proteínas de transporte de hierro HitAB (García-Contreras et al., 2013) o a través de sideróforos como la pioquelina (Frangipani, Bonchi, Minandri, Imperi, & Visca, 2014).

El presente trabajo es relevante ya que aunque existen avances e investigaciones diversas del uso de galio como antibacteriano eficaz y se ha obtenido información acerca del metabolismo de hierro, aún quedan muchas brechas por investigar acerca de sus mecanismos de acción y su interacción con procesos dependientes de hierro, al igual que el desarrollo de mutaciones en las bacterias que inhiben su acción bacteriostática. Además, no existe ningún reporte en la literatura de cepas clínicas resistentes a galio, ya que los pocos estudios realizados a la fecha han sido con las cepas de referencia PAO1 y PA14.

3. Marco teórico

3.1 Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia que presentan las bacterias contra los antibióticos se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. El uso inapropiado de estos es uno de los factores que contribuye al problema de la resistencia; no obstante, el desarrollo de algunos nuevos fármacos antibacterianos se sigue observando el incremento en la aparición de cepas resistentes (Tello A, 2011; MH, 2010).

Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y costo del tratamiento que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie. La presión selectiva (bacterias sometidas a un tratamiento que sobreviven y proliferan) de los antibióticos ejercida al prescribir libremente medicamentos para uso terapéutico ha contribuido al

surgimiento de cepas resistentes, es deseable que esta presión sea la menor posible, lo que se consigue con un menor y más adecuado uso de los antibióticos (Alós, 2015). Sumado a lo anterior, la utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos, el uso de dosis o duración inadecuada y el desconocimiento de la sensibilidad de los microorganismos aislados también aportan a la aparición de resistencia (Cano, 2013).

Se pensaba que el descubrimiento o el diseño de nuevos antibióticos podría resolver el problema, es entonces cuando aparecen medicamentos tales como los macrólidos, glicopéptidos, aminoglucósidos entre otros, con los cuáles se observa una respuesta favorable contra las enfermedades infecciosas (Stell, 2012; Livermore, 2008). Sin embargo, a la par también aparecen nuevos mecanismos de resistencia difíciles de controlar y entonces surgen las bacterias que sobreviven a la presencia de más de un antibiótico, conocidas como multirresistentes (Cuevas, 2010).

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, presente en diversos ambientes y fuentes vivas tales como agua de mar, en el suelo, en plantas y sus raíces, animales y humanos de los cuales se puede aislar (apéndice A). Es una bacteria versátil en su metabolismo, lo que le confiere la capacidad de adaptarse a diversos ambientes incluso con mínimos recursos nutricionales. Sumado a lo anterior, su capacidad de resistencia a diferentes antibióticos dificulta su eliminación en organismos infectados lo que la hace un microorganismo persistente en la naturaleza. Se puede encontrar en gran cantidad de utensilios tanto hospitalarios como de uso

diario tales como piscinas, hidromasajes, jacuzzis, líquidos para lentes de contacto, humidificadores domésticos e incluso en vegetales (Lister, Wolter, & Hanson, 2009).

Uno de los mayores problemas es la contaminación de esta bacteria en hospitales debido a su resistencia a diversos fármacos antimicrobianos, por lo que actualmente es considerada uno de los patógenos oportunistas de mayor prioridad para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos según la OMS, en el apéndice B se encuentra la lista de los principales. *P. aeruginosa* es causante de gran parte de las enfermedades respiratorias nosocomiales, enfermedades de tracto urinario, infecciones en pacientes intubados en unidades de cuidados intensivos, en pacientes inmunocomprometidos o con quemaduras, enfermedades del tracto respiratorio como fibrosis quística, cáncer y muchas otras (López et al., 2018).

Pseudomonas aeruginosa es una de las bacterias más peligrosas existentes debido a su capacidad de desarrollar diferentes formas de resistencia que están siendo estudiadas, es primordial la investigación y avance en nuevos métodos para combatirla, si no se atiende esta necesidad se proyectan cerca de 10 millones de muertes al año para el 2030 debido a infecciones por culpa de esta y otras bacterias multirresistentes (O'Neill, 2014).

3.2.1 Factores de virulencia en *P. aeruginosa*: Pioverdina y Piocianina. La mayoría de los microorganismos, necesitan el hierro para su crecimiento y han desarrollado diversos mecanismos para adquirirlo debido a su limitada disponibilidad en el sitio donde se encuentren.

Uno de estos mecanismos es la síntesis de diversos factores de virulencia, entre ellos compuestos quelantes de hierro denominados sideróforos. Los sideróforos se unen a Fe^{3+} y lo transportan al interior de la célula, en donde el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} y después se almacena. Cada organismo

puede tener múltiples mecanismos alternativos para obtener hierro de medios con escasez de este para mantener su crecimiento y su supervivencia (Crosa, 1997).

Dentro de los factores de virulencia que secreta *Pseudomonas aeruginosa* dos de los más importantes son la pioverdina y la piocianina ya que ayudan al metabolismo de hierro en la bacteria.

Pioverdina es un sideróforo (quelante de hierro) que le permite a *P. aeruginosa* captar hierro del medio donde se encuentre y además regula la virulencia bacteriana, por otra parte, es capaz de secuestrar galio y evitar que entre a la bacteria (Frangipani, bonchi, Minandri, Imperi, & Visca, 2014). Se caracteriza por ser un pigmento fluorescente verdoso que se produce bajo condiciones limitadas de hierro.

Piocianina es un factor de virulencia caracterizado por su color azul verdoso, tiene actividad óxido-reductora, por ejemplo, reduce el hierro para poder ser utilizado por la célula bacteriana y además promueve la generación de estrés oxidativo en células humanas, incluyendo algunas del sistema inmune (Sandri et al., 2018).

3.2 Uso de galio como antimicrobiano

El galio es un elemento metálico del grupo 3A de la tabla periódica, número atómico 31. Muchas investigaciones lo mencionan en aplicaciones y usos para el tratamiento de diversas enfermedades tales como trastornos en la resorción ósea, enfermedades autoinmunes, ciertos tipos de cánceres y enfermedades infecciosas utilizado en forma de nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) formulación aprobada por la FDA. El galio (Ga^{3+}) gracias a su amplia similitud con el hierro (Fe^{3+}) como su radio atómico, núcleo y número de coordinación, es capaz de suplantar al hierro

en el metabolismo de hierro en la bacteria y debido a que éste no es oxido-reducible le imposibilita su crecimiento (Frangipani, bonchi, Minandri, Imperi, & Visca, 2014).

Dada la capacidad del galio para reemplazar al hierro en la célula se puede observar actividad antimicrobiana por parte de este. Se ha demostrado que el galio inhibe el crecimiento en *Pseudomonas aeruginosa*, previene la formación de biopelículas y tiene acción bactericida (García-Contreras, 2013). El ion Fe^{3+} es esencial para el crecimiento de *P. aeruginosa* ya que es necesario en muchas rutas metabólicas participando en la oxido reducción de sustratos de diferentes enzimas involucradas en la síntesis de ADN la respiración y el combate al estrés oxidativo, al unirse Ga^{3+} a sitios Fe^{3+} en estas enzimas, las mismas pierden su actividad y las bacterias quedan inhabilitadas para producir ADN, respirar, defenderse del estrés oxidativo, etc. no se pueden replicar y por tanto llegan incluso hasta muerte celular (Chitambar & Antholine, 2013).

3.2.1 Concentración mínima inhibitoria. La concentración mínima inhibitoria (MIC), es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antimicrobiano, es decir, la concentración más baja que inhibe el crecimiento celular.

Es uno de los métodos más utilizados en los laboratorios de microbiología clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas de referencia, con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. El presente trabajo hace referencia a la mínima concentración de galio en forma de $(\text{Ga}(\text{NO}_3)_3)$ para inhibir el crecimiento en un 50 o 100% respecto a la cepa referencia o parental.

4. Metodología

4.1. Material biológico utilizado

Tabla 1.

Cepas de Pseudomonas aeruginosa utilizadas y descripción

CEPA	DESCRIPCIÓN	ORIGEN
PA14	Cepa de origen clínico aislada de paciente quemado en 1977 y que es utilizada comúnmente como cepa de referencia. (Control <u>no</u> resistente a galio)	Colección Laboratorio Ausbel (Liberati NT, 2016)
E12	Mutante espontánea derivada de PA14 (Control resistente a galio).	Departamento de Microbiología y parasitología, de la Facultad de Medicina de la UNAM (García-Contreras R, 2013)
44M	Cepas clínicas de característica mucoide ¹ aisladas de pacientes con fibrosis quística.	Colección Laboratorio Instituto Nacional de Pediatría (CDMX).
48M		
57M		
58M		
30R	Cepas clínicas de característica rugosa ² aisladas de pacientes con fibrosis quística.	
42R		
49R		
57R		
58R		

¹ Característica común de cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística debida a la sobreproducción del polisacárido de superficie alginato.

² Fenotipo de cepas no sobreproductoras de alginato.

4.2. Medio de cultivo

El cultivo para el crecimiento bacteriano seleccionado se denomina medio mínimo de succinato (MMS), preparado con agua mili-Q, con nutrientes necesarios limitados para el crecimiento. En el apéndice C se muestra la preparación para un litro de medio.

El nitrato de galio fue disuelto con agua Mili-Q, esterilizado con ayuda de microfiltros con poros de 0,22 μm y adicionado al medio de cultivo en concentraciones micromolares (2, 5, 10, 25, 50, 100), para detener el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (Kaneko, Thoendel, Olakanmi, Britigan, & Singh, 2007).

4.3. Materiales, técnicas y diseño experimental

Las cepas fueron tomadas de crioviales mantenidos en un ultracongelador DW86L990 (Shandong, China) a una temperatura de -80°C y puestas en placas con agar de medio LB (Luria Bertani) (Apéndice C) y posteriormente se inocularon pre cultivos en medio líquido (MMS) en matraces de 50 mL con 5 mL de medio, en incubadora con agitación THZ-300C (Zhejiang, China) a 200 rpm y 37°C durante 16 horas.

El crecimiento bacteriano se determinó mediante la medición de la densidad óptica (O.D.); teniendo en cuenta $\text{O.D}=1$, equivalente a aproximadamente 1×10^9 células por mililitro. Se empleó un espectrofotómetro VE-5100UV (Científica Vela Quin, México) a una longitud de onda de 600 nm.

Los experimentos de sensibilidad, resistencia y concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) fueron realizados en tubos de ensayo de vidrio de 10 mL con tapa rosca colocando 2 mL de MMS, bajo condiciones de agitación a 200 rpm y 37°C , cada experimento se explica a continuación.

4.3.1 Identificación de cepas sensibles y resistentes a nitrato de galio. Para el experimento de sensibilidad, se partió de cultivos nuevos con una densidad óptica (O.D) inicial de 0,05 tomando el inóculo de un pre-cultivo, dichos cultivos se sometieron a concentraciones de 2, 5, 10 y 25 μM de nitrato de galio además de controles sin galio.

Las cepas se incubaron en agitación a 200 rpm y 37 °C durante 16 horas y se midió la O.D. Posteriormente se determinó la concentración de pioverdina y piocianina de cada cultivo. Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada cepa con su concentración se hizo por duplicado.

4.3.2. Producción de pioverdina y piocianina

4.3.2.1. Pioverdina: Con el fin de analizar diferencias en la producción de pioverdina en las cepas parentales respecto a sus mutantes; de cada cultivo sometido a galio (mutante) y su respectivo control se tomó 1 mL de muestra en tubos eppendorf y se centrifugaron a 13000 rpm durante dos minutos en microcentrífuga C2400-T-230V (Labnet, Reino Unido). A 800 μL de sobrenadante se adicionaron 400 μL de cloroformo y se agitó en un vórtex durante 2 minutos para posteriormente centrifugar nuevamente a 13000 rpm durante 5 minutos. Tomando la fase acuosa y haciendo una dilución 1:1 con agua destilada se midió la absorbancia a 420 nm. Para los experimentos se tomaron de 3 a 9 repeticiones de cada cultivo y se hizo el cálculo de producción dividiendo los valores de absorbancia por el coeficiente de extinción molar para pioverdina unida a hierro ($1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Dacheng Ren, 2004).

4.3.2.2. Piocianina: Con las cepas anteriormente descritas en el procedimiento para pioverdina se hicieron posteriormente experimentos para determinación de piocianina sometidas a las mismas concentraciones de galio. Partiendo de la fase orgánica (cloroformo) residual se

tomaron 300 μL en otro tubo y se añadió 800 μL de HCl 0,2 N, se agitó en vortex por 2 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Tomando la fase acuosa y diluyéndola 1:1 con agua destilada se midió la absorbancia 520 nm. Los experimentos se hicieron con 3 a 11 repeticiones de cada cultivo y se calculó la producción dividiendo los valores de absorbancia por el coeficiente de extinción molar para piocianina ($2.46 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (D W Essar, 1990).

4.3.3 Obtención de mutantes resistentes. Los experimentos de resistencia fueron realizados en tubos de ensayo de vidrio de 10 mL con tapa rosca colocando las cepas en 2 mL de MMS, bajo condiciones de agitación a 200 rpm y 37 °C midiendo densidad cada 12 a 24 horas a manera de curva de crecimiento. La obtención de mutantes se realizó exponiendo a las cepas sensibles (aquellas que presentan disminución en el crecimiento a concentraciones de 2, 5, 10 y 25 μM de galio) a mayores concentraciones además de incluir un control sin galio.

Los experimentos de resistencia se desarrollaron haciendo pases consecutivos (re-siembra) siguiendo la O.D. a diferentes tiempos, al observar crecimiento bacteriano y tomando como límite O.D. superior a 0,9 se tomó un inóculo de cada cultivo y se pasó a medio nuevo con la misma concentración de galio del cultivo anterior (Figura 1.) Se hicieron pases consecutivos de cada cepa expuesta a concentraciones de 25 y 100 μM de galio, si se observó crecimiento en presencia de galio las cepas se consideraron como posibles mutantes resistentes.

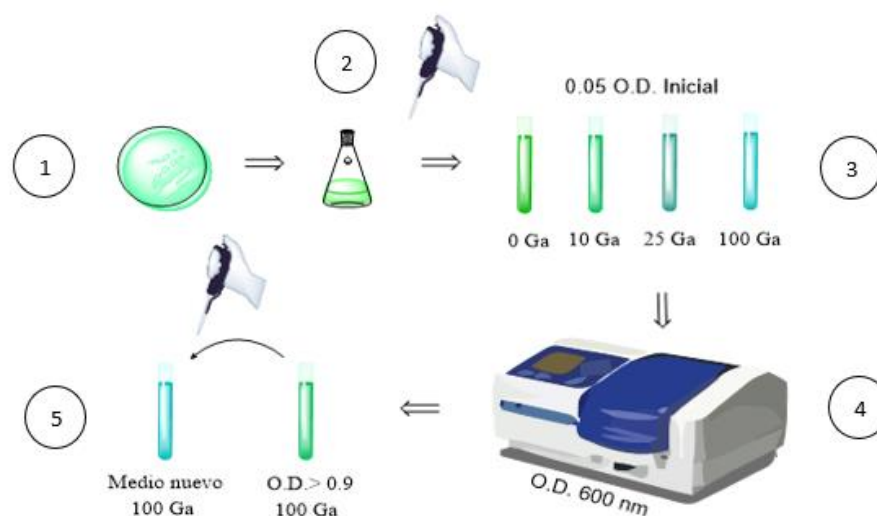


Figura 1. Procedimiento pases consecutivos.

1. Siembra en placa.
2. Precultivo en medio líquido.
3. Exposición a 0, 10, 25 y 100 µM de galio.
4. Medición de O.D.
5. Pase del cultivo al observar crecimiento bacteriano.

Después de 24 h de crecimiento se consideró que las cepas ya estaban adaptadas a las concentraciones de galio. Las posibles mutantes se criopreservaron cultivandolas nuevamente en MMS por 24 horas y posteriormente tomando 800 µL de cada cultivo crecido y colocandolo en criotubos con 400 µL de glicerol 50% los cuales se almacenaron a -80°C en ultracongelación para posteriores experimentos.

Finalmente se hicieron curvas de crecimiento para las posibles mutantes junto con sus cepas control en MMS y concentraciones de 0, 5 y 10 µM de galio para comparar las velocidades de crecimiento y tiempos de duplicación de estas. Los experimentos se realizaron por triplicado y cuádruplicado para cada cepa en diferentes días.

4.3.4 Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs). Las MICs hacen referencia a la mínima concentración de galio en forma de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ para inhibir el crecimiento bacteriano en un 50 o 100% y tomando como control la cepa referencia o parental.

La determinación de las MICs se realizó partiendo de las cepas previamente seleccionadas y puestas en criopreservación. Las posibles mutantes se colocaron de nuevo en placas de agar con medio LB y posteriormente en pre-cultivos con medio líquido (MMS), partiendo de allí fueron expuestas a concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 μM de nitrato de galio durante 16 a 24 horas en agitación a 200 rpm y 37°C iniciando con una densidad óptica de cultivo de 0,05 a 600 nm. Los experimentos se hicieron por triplicado para cada cepa. Después de pasados los tiempos de incubación se midió nuevamente densidad óptica, tomando este valor como una medida del crecimiento bacteriano y se graficó la concentración de galio versus densidad óptica.

4.4 Medición de galio intracelular.

Para la determinación de galio intracelular las cepas originales y sus mutantes fueron cultivadas en MMS en matraces de 100 o 250 mL con volúmenes de 10 y 25 mL respectivamente.

Las concentraciones de galio intracelular se midieron en un espectrofotómetro de absorción atómica de llama 240F SAA (Agilent Technologies, USA) en aquellas mutantes que presentaron una concentración mínima inhibitoria (MIC₁₀₀) superior a 200 μM de Ga.

Las cepas mutantes al igual que las cepas parentales (control sin resistencia) se pusieron a crecer en pre-cultivos de MMS y posteriormente en matraces de 100 mL con 10 mL de MMS sin y con galio 10 μM . Luego de 16 a 24 horas de incubación en agitación a 200 rpm y 37 °C se centrifugaron los cultivos y se separó el sobrenadante de las células bacterianas.

Las pastillas celulares se sometieron a dos lavados, el primero se realizó suspendiéndolas en 10 mL de amortiguador Tris 20 mM pH 8.0 para luego centrifugarlas a 13000 rpm durante 2 minutos. Se separaron de nuevo las pastillas del primer lavado y se sometieron a un segundo lavado con 10 mL de Tris 20 mM pH 8 con ácido etilenglicol tetraacético³ (EGTA) 2 mM, se agitó en vortex por 2 minutos, se centrifugaron y se separaron de nuevo las pastillas.

Una vez separadas las pastillas celulares de los sobrenadantes y lavados, se resuspendieron en 3,5 mL de MMS más 3 mL de ácido nítrico concentrado y se colocaron en tubos de ensayo de vidrio de 10 mL con tapa rosca. Las muestras con ácido se dejaron por 16 horas a 80°C para su digestión. Finalmente se ajustaron los volúmenes de las muestras digeridas con agua pura (Mili-Q H₂O) y los contenidos de galio se determinaron mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica y también por medio de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (García-Contreras et al., 2013; Kaneko et al., 2007).

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica para determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra, consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La técnica de atomización usada para este experimento es la de absorción atómica con flama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de una llama de aire acetileno u óxido nitroso-acetileno (Morral, 2003).

La curva de calibración del equipo de absorción atómica de llama 240Z AA (Agilent, USA), basada en la ley de Beer Lambert se hizo a partir de una muestra patrón de galio de 1000 ppm

³ EGTA es un agente quelante con capacidad de unir y secuestrar gran variedad de cationes metálicos.

(equivalente a 14342.5 μM de galio) elaborando muestras patrón de menor concentración: 0, 3, 5, 7 y 10 ppm, equivalentes a 0, 43, 72, 100 y 143 μM de galio respectivamente.

La espectroscopia De Emisión Atómica De Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES). determina gran cantidad elementos de una muestra en solución gracias a la eliminación de la mayor parte de las interferencias químicas (Sanches I., 1986).

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES. PerkinElmer Optima 8300 ICP-OES (Shelton, C T, USA) (Tejeda Guzmán C, 2018). En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. (Laboratoriotecnicasinstrumentales.es., 2018).

5. Resultados

5.1 Pruebas de sensibilidad a nitrato de galio.

Con el fin de observar los efectos del galio en el crecimiento de diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se comparó la sensibilidad a nitrato de galio de la cepa PA14 colección laboratorio Ausbel (Liberati NT, 2016), la cual se utilizó como un control sin resistencia. la mutante resistente derivada de ésta (García-Contreras et al., 2013) E12 (control con resistencia) y 10 cepas clínicas provenientes de pacientes pediátricos con fibrosis quística.

Las bacterias fueron cultivadas en MMS con una O.D. inicial de 0,05 y el crecimiento se determinó mediante O.D. después de 16 horas de incubación (Figura 2).

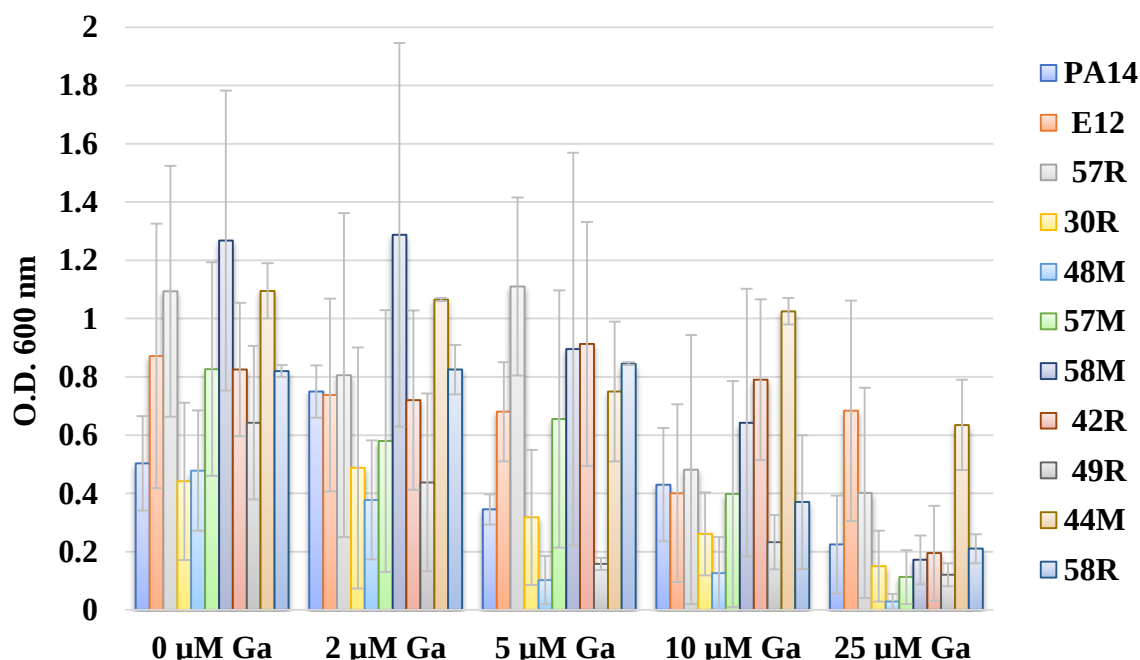


Figura 2. Sensibilidad a nitrato de galio en diferentes cepas clínicas y E12, mutante espontánea resistente derivada de la cepa PA14.

Las cepas que siendo sometidas a las diferentes concentraciones de galio presentan crecimiento similar al de la cepa silvestre (sin galio) se consideran no sensibles como se esperaba en el caso de la mutante E12 para la cual no se evidenció disminución en el crecimiento al ir aumentando la concentración de galio al igual que en la cepa clínica 44M. Para el resto de las cepas, PA14, 57R, 30R, 48M, 57M, 58M, 42R, 49R, y 58R, se puede observar una tendencia a disminuir el crecimiento a medida que aumenta la concentración de galio a la que son expuestas, por lo que se consideran sensibles.

5.2 Cultivos secuenciales de cepas para obtención de mutantes resistentes.

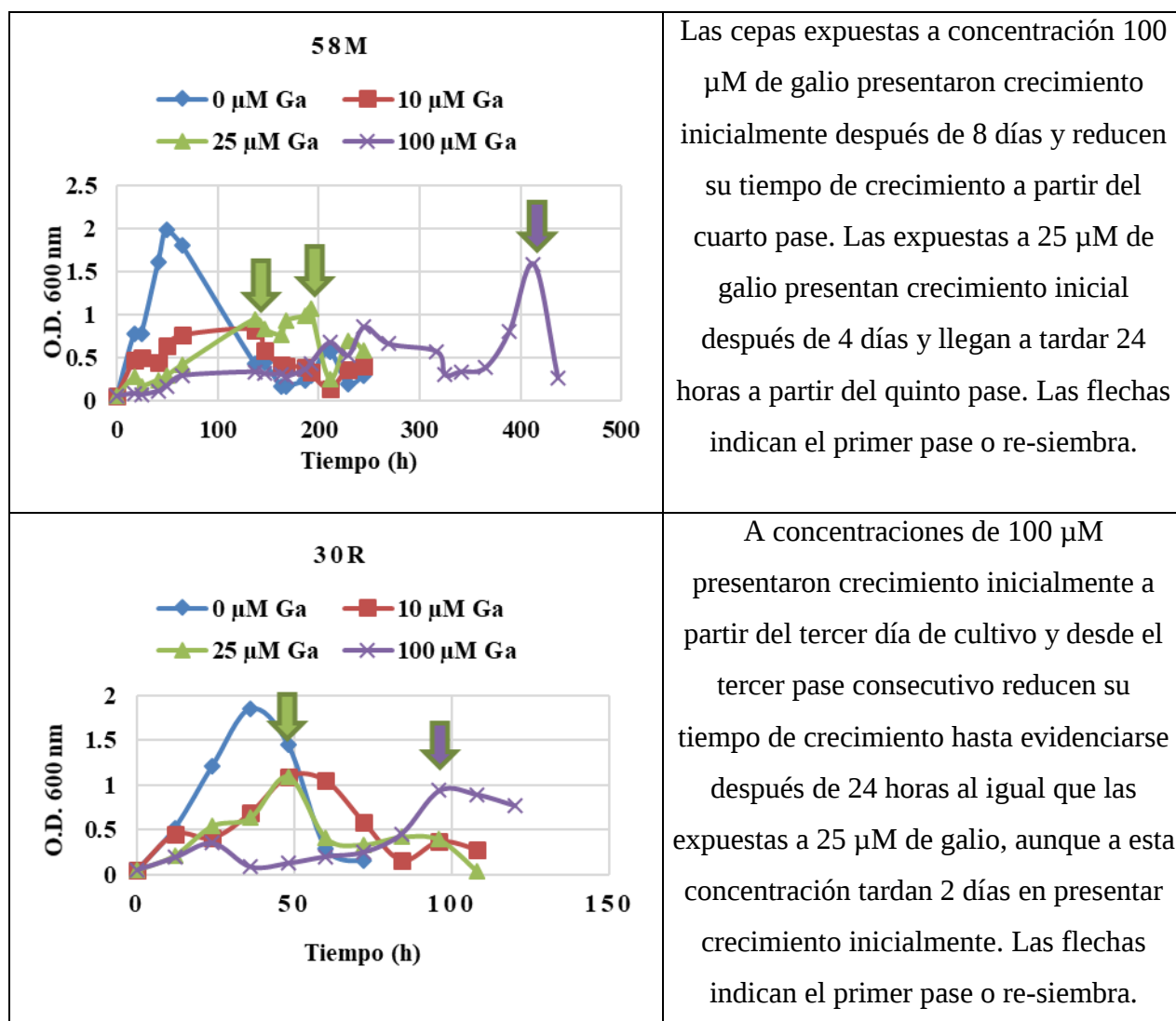
La re-siembra de cultivos generó adaptación de las cepas a su medio logrando obtener algunas mutantes espontáneas resistentes a concentraciones hasta de 100 μM de galio como anteriormente se reportó para la cepa PA14 (García-Contreras R, 2013).

En total se preservaron 57 cepas sometidas a concentraciones de 25 y 100 μM de galio (36 a 25 μM y 21 a 100 μM). Las mutantes con mayores cambios observados fueron derivadas de las cepas 30R, 58M y PA14, las tres expuestas a concentraciones de 100 μM de galio. En la Tabla 2 se muestra su crecimiento con y sin galio, las flechas indican el momento en que inició la re-siembra para los posteriores pases, los experimentos con las demás cepas se encuentran en el apéndice D.

Tabla 2.

Descripción de obtención de mutantes resistentes

Curvas de crecimiento continuas	Descripción de la resistencia
PA14 Tiempo (h)	Al ser expuestas a concentraciones de 100 μM de galio tardaron inicialmente 8 días en presentar crecimiento y desde el tercer pase consecutivo van reduciendo el tiempo que tardan hasta llegar a crecer en 24 horas al igual que las sometidas a 25 μM de galio, aunque éstas tardan inicialmente 2 días en crecer. Las flechas indican el primer pase o re-siembra.



En general las cepas sometidas a concentraciones de 100 μM de galio tardan inicialmente hasta 8 días en presentar crecimiento y con los pases consecutivos van reduciendo el tiempo que tardan hasta llegar a crecer en 24 horas en el caso de algunas cepas. Aquellas expuestas a 25 μM de galio muestran en promedio crecimiento de 3 a 7 días después de cultivadas y en posteriores pases van disminuyendo su tiempo de crecimiento hasta crecer en 24 horas.

5.3 Diferencias en el crecimiento

Una de las maneras de evidenciar las diferencias en el crecimiento bacteriano es a través del cálculo de la velocidad específica de crecimiento y su tiempo de duplicación. En este experimento se utilizó la cepa 30R la cual presentó cortos tiempos de crecimiento inicial y rápida adaptación a nitrato de galio y su mutante espontánea denominada 14' (cepa número 14 en preservarse para resistencia a 100 μM de galio); también se utilizó la cepa 58M la cual tardó en presentar crecimiento inicial y lenta adaptación a nitrato de galio y su mutante espontánea se denomina 18' (cepa número 18 en preservarse para resistencia a 100 μM de galio).

Se comprobó que las mutantes espontáneas presentan mayores valores de velocidad de crecimiento comparadas con sus respectivas cepas parentales sin y con 5 y 10 μM de galio (Figura 3). Los valores mostrados son el promedio de las velocidades de crecimiento de cada una de las cepas y se muestran en el apéndice E.

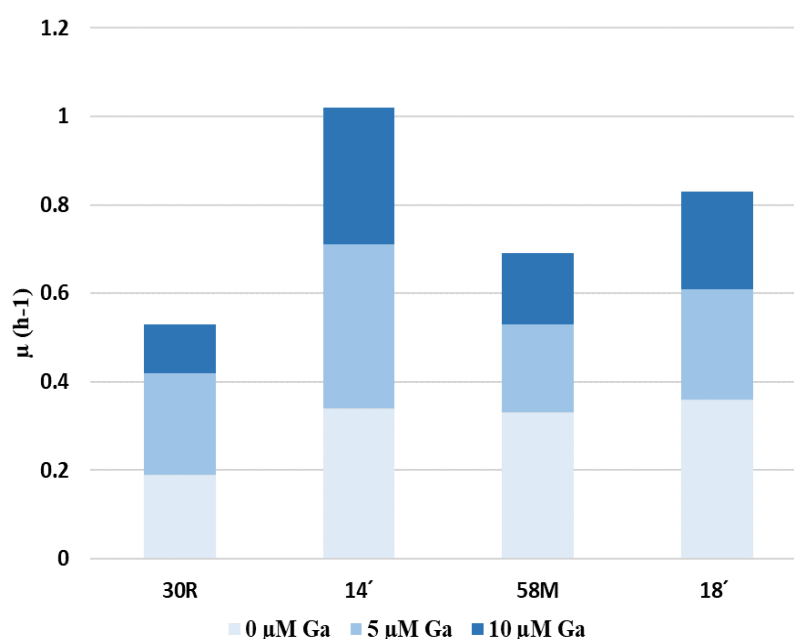


Figura 3. Velocidades específicas de crecimiento cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.

Se realizaron pruebas estadísticas Test – T de una cola observando diferencias significativas para crecimiento con y sin galio entre la cepa 30R y su mutante 14' ($P = 0,009$), lo que ratifica que la mutante presenta mayor velocidad de crecimiento que la cepa parental. Para el caso de la cepa 58M y su mutante la prueba Test – T no muestra diferencias significativas en el crecimiento en ausencia de galio ($P = 0,42$) pero sí para la 58M sin y con $10 \mu\text{M}$ de galio ($P = 0,0003$) al igual que la mutante 18' con y sin galio ($P = 0,001$); sin embargo, aunque la 18' no crece muy rápido en comparación con la 58M, al aumentar la concentración de galio en cada una se observa que la 18' comienza a presentar mayor velocidad de crecimiento.

El tiempo de duplicación se obtuvo partiendo de los valores utilizados en el experimento anteriormente mencionado, obteniéndose los resultados expuestos en la figura 4 y los datos que se muestran son el promedio en los tiempos de duplicación de cada una de las cepas.

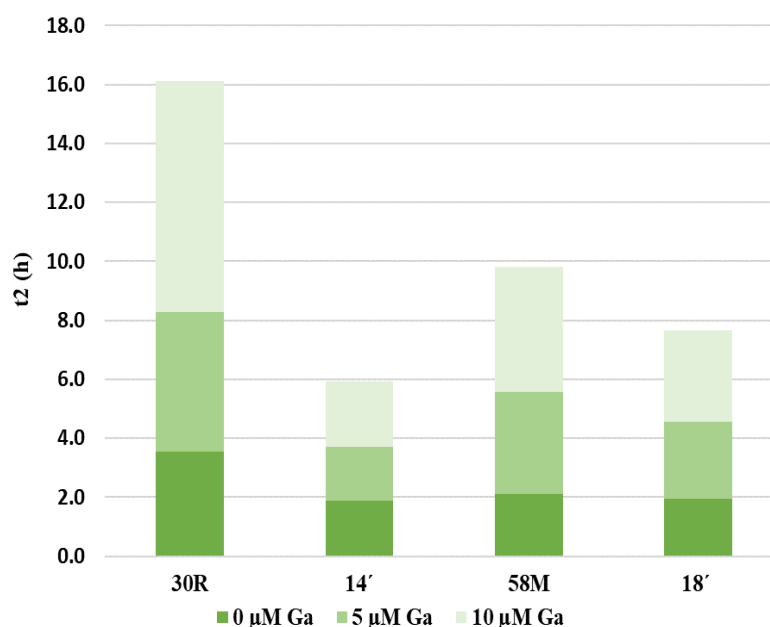


Figura 4. Tiempo de duplicación cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.

En base a los resultados obtenidos de velocidades específicas de crecimiento se ha de esperar que los tiempos de duplicación sean mayores en las cepas parentales que en sus respectivas mutantes sin y con 5 y 10 μM de galio, lo cual se corrobora con la figura 4. Las pruebas estadísticas Test – T de una cola para el caso de la 30R y su mutante 14' dan significativas en ausencia de galio, ($P = 0,04$); comparando la mutante con y sin galio no se encuentran diferencias significativas ($P = 0,21$), lo que lleva a concluir que la concentración de galio no afecta el crecimiento de ésta, mientras que sí lo hace en la cepa parental ya que sí se encuentran diferencias significativas ($P = 0,017$). En el caso de la cepa 58M y su mutante no se evidencian diferencias significativas en ausencia de galio ($P = 0,48$), a pesar de ello se observa que, aunque el galio afecta el tiempo de duplicación tanto para la cepa parental como para la mutante con y sin galio la significancia de la cepa parental es menor que la de la mutante. Los datos presentados son la media de los tiempos de duplicación de cada cultivo, Los promedios de los datos experimentales se encuentran en el apéndice E.

5.4 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (MICs).

Los resultados de concentración mínima inhibitoria (MICs 50) realizados mostraron mejores resultados en las cepas PA14 USA, 30R y 58M y sus respectivas mutantes expuestas a 100 μM de galio. Los experimentos se hicieron por triplicado para cada cepa y los valores tomados para las figuras son la media de los datos de cada una, las mediciones se tomaron a 16 y 24 horas, sin embargo, se evidencia mayor diferencia a las 24 horas. De la cepa PA14 se preservaron 5 gliceroles de cultivos independientes sometidas a 25 μM de galio y 11 expuestas a 100 μM . Los gliceroles de cada experimento (cepa expuesta y preservada) se encuentran en el apéndice F.

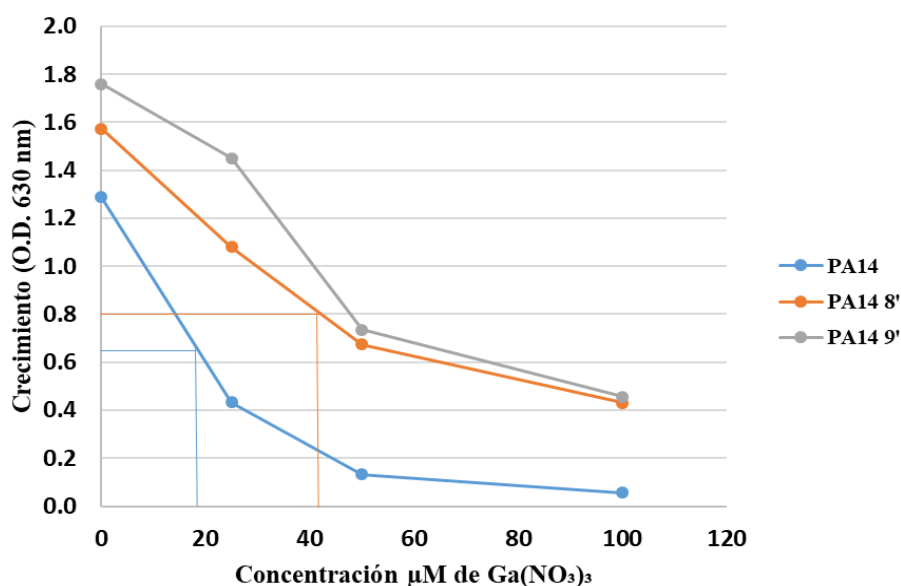


Figura 5. MICs 50 cepa PA14 parental y mutantes espontáneas.

En la figura 5 se muestran MICs₅₀ mayores a 40 μM de galio para dos de las mutantes que son derivadas de la cepa PA14 (MIC₅₀ < 20 μM de galio) y el control de esta, los nombres de las mutantes se designan con los números 8' y 9' (cepas número 8 y 9 en preservarse para resistencia a 100 μM de galio) conservados después de observar crecimiento en 24 horas.

En la figura 6 se muestran tres mutantes derivadas de la cepa 30R con MICs₅₀ mayores a 60 μM de galio comparados con su cepa parental (MIC₅₀ < 20 μM de galio), los nombres de estas se designan con los números 14', 15' y 16' (cepas número 14, 15 y 16 en preservarse para resistencia a 100 μM de galio) que fueron conservadas después de observar crecimiento en 24 horas al ser expuestos a 100 μM de galio.

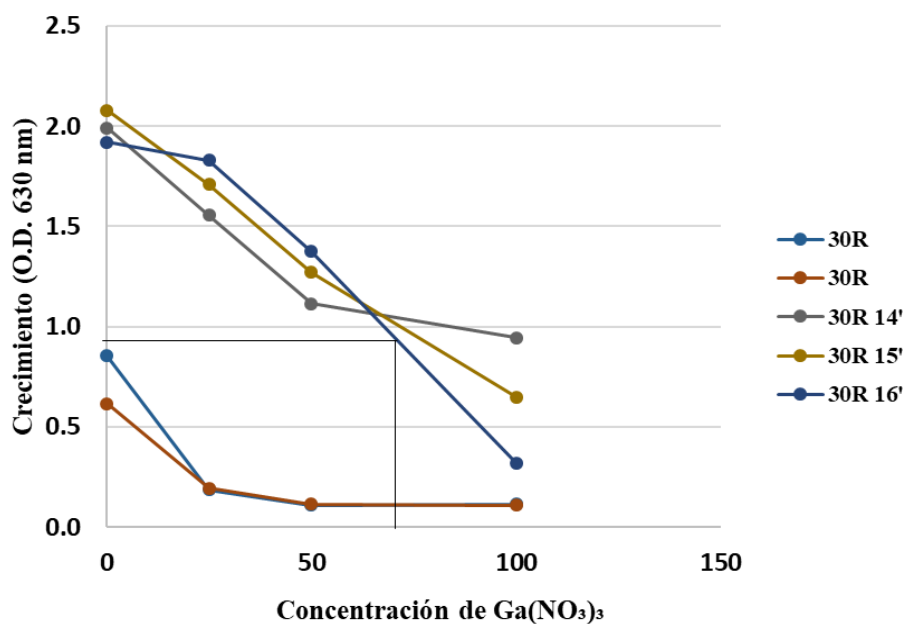


Figura 6. MICs cepa 30R parental y mutantes espontáneas.

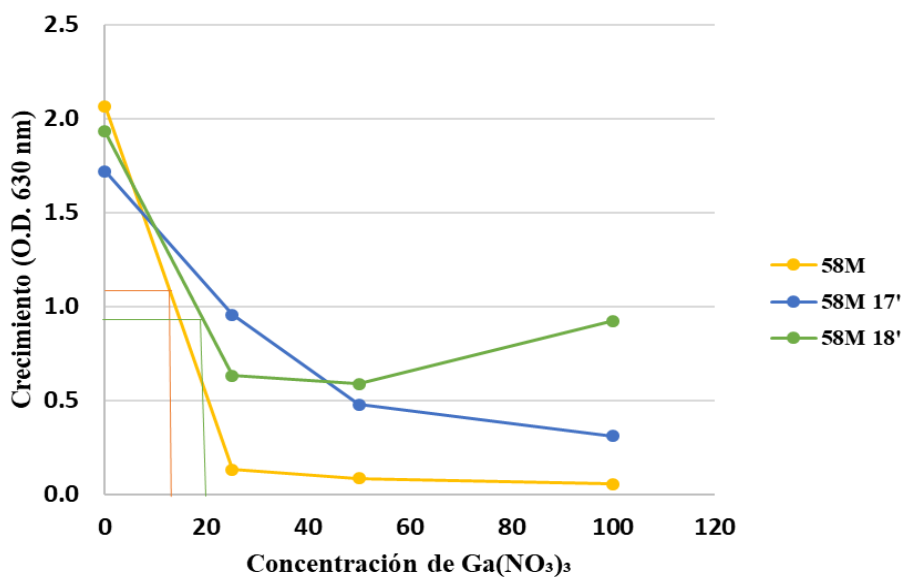


Figura 7. MICs cepa 58M parental y mutantes espontáneas.

En la figura 7 se muestran dos de las mutantes con MICs₅₀ mayores o iguales a 20 μM que son derivados de la cepa 58M (MIC₅₀ < 20 μM de galio), los nombres se designan con los números

17' y 18' (cepas número 17 y 18 en preservarse para resistencia a 100µM de galio) conservadas después de observar crecimiento en 24 horas.

Los MICs para las cepas clínicas 30R, 58M y sus mutantes 14' y 18' se resumen en la tabla 4.

La cepa PA14 se descarta de posteriores experimentos puesto que para esta ya hay un trabajo publicado (García-Contreras et al., 2013).

Tabla 3.

MICs en cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.

Cepa	MIC 50 (µM)	MIC 100 (µM)
30R	<25 (3)	50 (3)
14' (30R Ga^R)	>50(3)	>200 (3)
58M	<5 (3)	50 (3)
18' (58M Ga^R)	>25 (3)	>200 (3)

Los valores mostrados en la tabla 2 son el promedio de las MICs de cada cepa y los valores entre paréntesis son el número de repeticiones de cultivos independientes.

5.5 Medición de factores de virulencia: pioverdina y piocianina.

Una vez identificadas las mutantes y la influencia del galio en las mismas y en sus cepas parentales se procedió a medir dos de los factores de virulencia conocidos en *P. aeruginosa*. Tanto pioverdina como piocianina pueden participar en la obtención de hierro extracelular (Liu, 2018) y un aumento en la producción de estas moléculas podría ser parte de los mecanismos de resistencia.

5.5.1 Pioverdina. Se hicieron experimentos tomando la cepa 30R, 58M y sus mutantes (14' y 18') sometiéndolas a 10µM de galio y sin el mismo (figura 8). Las barras de error representan la desviación estándar.

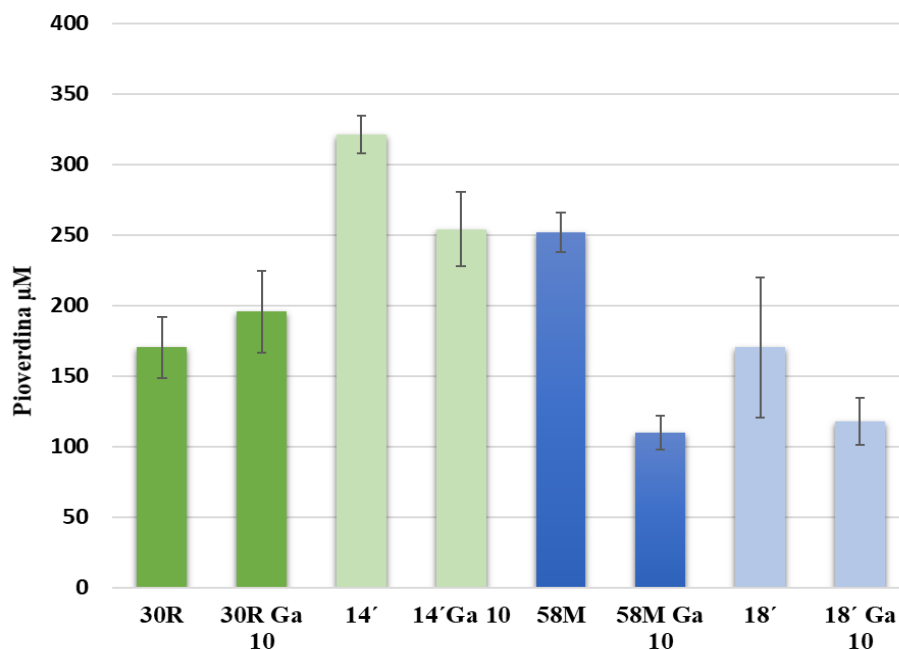


Figura 8. Producción de pioverdina cepas 30R, 58M parentales y mutantes espontáneas con y sin galio.

Podemos observar que en el caso de la cepa 30R y 14' sin galio se evidencia una mayor producción de pioverdina por parte de la mutante, lo que se corrobora con pruebas estadísticas Test – T de una cola ($P = 6,89 \cdot 10^{-6}$), la cual muestra diferencias significativas entre estas dos, sin embargo, no resultan diferencias significativas entre las mismas cepas al adicionarles galio ($P = 0,084$). Lo anterior sugiere que la producción de pioverdina en el caso de la mutante derivada de la 30R probablemente esté relacionada con su resistencia a galio.

De igual forma existen diferencias significativas ($P = 0,024$) para la cepa 58M y su mutante 18' sin adicionar galio, no obstante, se puede observar que 18' produce menos pioverdina que la cepa parental, lo que indica que la resistencia de esta mutante espontánea no se encuentra relacionada con la producción de pioverdina. Al adicionar galio también se encuentran diferencias significativas ($P = 0,0008$) entre la cepa parental y su mutante.

5.5.2 Piocianina. Partiendo de las cepas anteriormente descritas en el procedimiento para pioverdina se determinó la concentración de piocianina teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar ($2.46 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), figura 9.

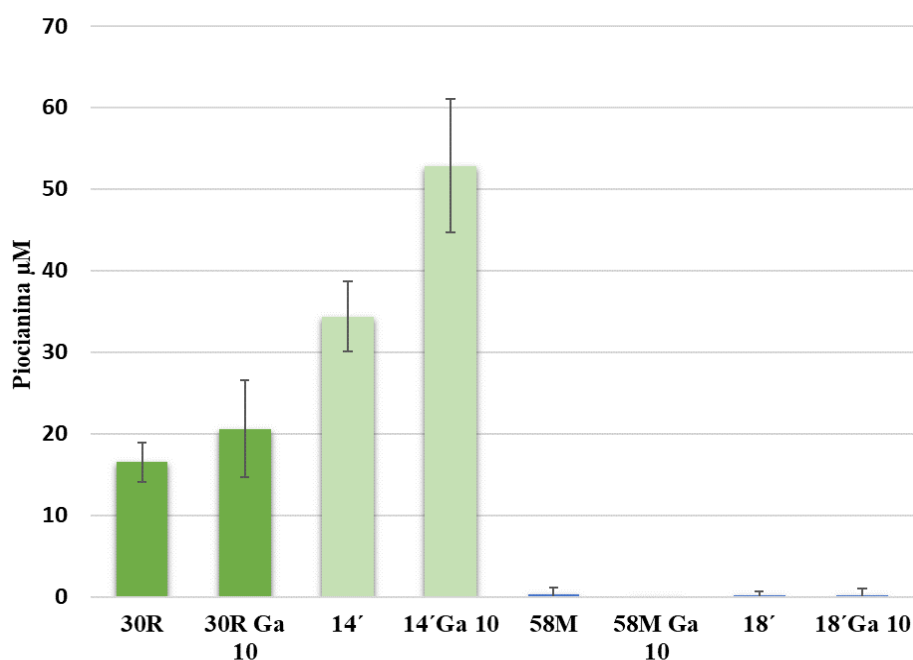


Figura 9. Producción de piocianina cepas 30R, 58M parentales y mutantes espontáneas con y sin galio.

Se evidencia en el caso de la cepa 30R y 14' sin galio una mayor producción de piocianina por parte de la mutante, lo que se corrobora con pruebas estadísticas Test – T de una cola ($P = 0,002$) la cual muestra diferencias significativas entre estas dos, al igual que adicionando galio la producción de piocianina aumenta significativamente en la mutante ($P = 0,04$). En base a esto se puede suponer que la producción de piocianina en el caso de la mutante derivada de la 30R probablemente esté relacionada con su resistencia a galio.

A diferencia del caso anterior para la cepa 58M y su mutante 18' sin adicionar galio no existen diferencias significativas, se puede observar que tanto 58M como 18' producen muy

poca piocianina, lo que indica que la resistencia de esta mutante espontánea no se encuentra relacionada con la producción de piocianina. De igual forma al adicionar galio a las cepas 50M y 18' parecen no productoras o productoras de concentraciones muy bajas de piocianina. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.6 Concentraciones de galio intracelular.

Una menor concentración de galio intracelular en las cepas 14' que es la versión resistente de 30R y 18' versión resistente de 58M podría ser parte de los mecanismos de resistencia de estas cepas. Para probar esta hipótesis se hicieron experimentos utilizando espectrometría de absorción atómica de flama (AAS) para la cuantificación del galio.

Partiendo de una curva de calibración para el equipo realizada con las mismas condiciones de los cultivos, es decir en MMS y con el patrón de galio se obtuvieron los resultados posteriores. Los datos y la curva de calibración se encuentran en el apéndice G. Para los cálculos se tomaron valores de absorbancia medidos a una longitud de onda de 294,4 nm que equivalen a un rango de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$ según el rango de trabajo óptimo del equipo.

Respecto a concentraciones de galio (μM) en las cepas 14' y 18' se encontró que internalizan menos galio que las cepas parentales 30R y 58M respectivamente (figura 11), además de ello las diferencias son significativas en pruebas T de una cola ($P < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

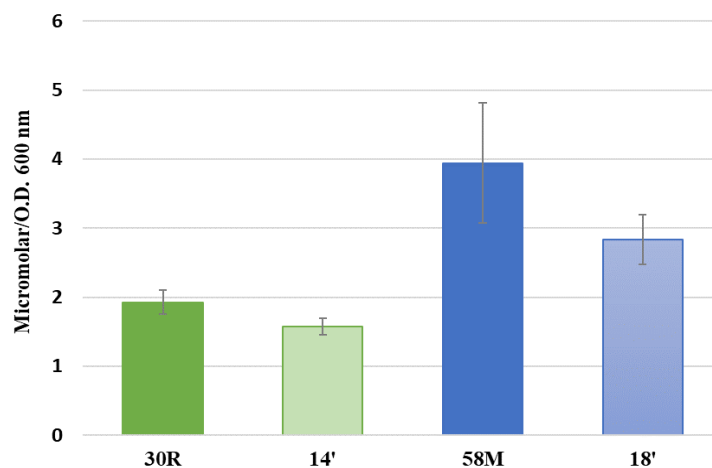


Figura 10. Galio intracelular cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.

Este experimento fue realizado de igual forma utilizando el método de espectrometría de emisión óptica de plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES) mostrando los mismos resultados obtenidos con el AAS, figura 12. Las barras de error representan la desviación estándar.

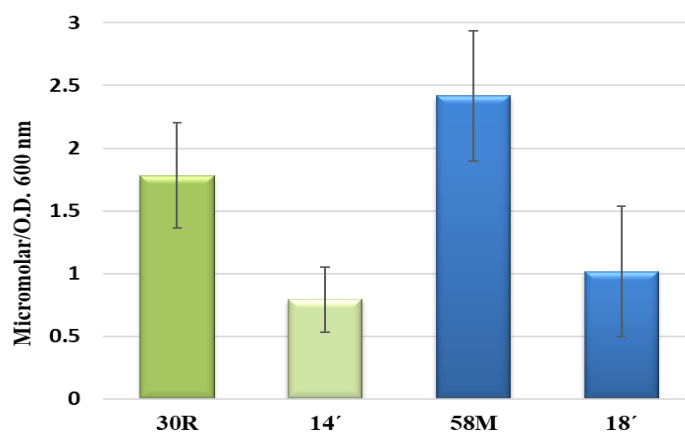


Figura 11. Galio intracelular cepas 30R, 58M y mutantes respectivas (García Contreras t al., 2018).

6. Conclusiones

- La obtención de resistencia a galio en las cepas clínicas y de laboratorio de *Pseudomonas aeruginosa* se dio de manera espontánea. La mayoría de las cepas clínicas probadas generan tiempos prolongados de desarrollo llegando a tardar hasta 8 días en evidenciarse crecimiento en algunas, y sin presentar adaptación al final del tratamiento como es el caso de las cepas 48M, 49R y 58R las cuales no se adaptaron a galio, mientras que la 30R desde el segundo pase demostró adaptación para 25 μM de galio y para 100 μM desde el cuarto. La cepa de referencia PA14 y la clínica 44M se adaptaron a partir del cuarto pase consecutivo a galio, aunque la 44M no presentó resistencia a 100 μM de galio; cepas como la 58M y 57M se adaptaron del cuarto al sexto pase consecutivo. Finalmente, la cepa 57R presentó adaptación a partir del sexto pase consecutivo.
- El máximo número de generaciones promedio antes de presentar resistencia galio 100 μM fue de 24, es este el caso de la cepa 58M quien al final del tratamiento presentó resistencia probablemente debido a mutaciones, por otra parte, el mínimo número de generaciones promedio antes de presentar resistencia fue de 12, este es el caso de la cepa 30R quien también adquirió resistencia.
- La producción tanto de pioverdina como piocianina para la cepa 30R es mayor en la mutante que en la cepa parental, esta característica fenotípica puede estar relacionada con su mecanismo de resistencia.
- La cepa 58M produce más pioverdina que la cepa mutante por lo que es probable que se relacione con algún mecanismo de resistencia. En el caso de la piocianina no se

presentan diferencias entre cepa mutante y parental, esto indica que su producción no está ligada al mecanismo de resistencia de esta cepa.

- Las cepas 14' y 18' mutantes derivadas de 30R y 58M respectivamente, internalizan menor cantidad de galio en comparación a sus respectivas cepas parentales lo sugiere que existe una relación entre la generación de resistencia a galio y una menor internalización por parte de las mutantes.

Referencias Bibliográficas

- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Cano, J. C. (2013). *Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana*. Volumen 4, número 3.
- Chitambar, C. R., & Antholine, W. E. (2013). Iron-Targeting Antitumor Activity of Gallium Compounds and Novel Insights Into Triapine-Metal Complexes. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Contreras, R. G., Silva, E. L., Chávez, R. J., L, I., González, H., Maeda, T., . . . Sánchez, R. M. (2013). Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *International Journal of Medical Microbiology*.
- Crosa, J. (1997). Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Cuevas, A. C. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries*.
- D W Essar, L. E. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*.
- Dacheng Ren, R. Z. (2004). Quorum-sensing antagonist (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- Frangipani, E., bonchi, C., Minandri, F., Imperi, F., & Visca, P. (2014). Pyochelin Potentiates the Inhibitory Activity of Gallium on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- García Contreras, R., González Tinoco, Y., Angarita Zapata, V., Porras Hernández, Y. K., Florez Duarte, M. P., Perez Eretza, F. B., & Sanchez Torres, V. (2018). El galio como un nuevo antimicrobiano para combatir infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. *Mensaje Bioquímico*.
- García-Contreras, R. M. (2013). Resistance to Quorum-Quenching Compounds. . *Applied and Environmental Microbiology*.
- Hijazi, S., Visaggio, D., Pirolo, M., Frangipani, E., Bernstein, L., & Visca, P. (1018). Antimicrobial Activity of Gallium Compounds on ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Kaneko, Y., Thoendel, M., Olakanmi, O., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2007). The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *The Journal of clinical investigation*.
- Laboratoriotecnicasinstrumentales.es. (2018). *Laboratoriotecnicasinstrumentales.es*. . Obtenido de Espectroscopía de Plasma ICP-OES. : <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-plasma-icp-oes>
- Liberati NT, U. J. (2016). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. . *PNAS*.

- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Liu, L. L.-J.-T.-C.-H. (2018). Structural and functional studies on *Pseudomonas aeruginosa* DspI: implications for its role in DSF biosynthesis . *Scientific Reports*.
- Livermore, D. (2008). Current epidemiology and growing resistance of gram negative pathogens. . *Korean J Intern Med*. .
- López, G. A., Rocha, G. R., Bello, L. E., Juárez, Z. C., Sáenz, Y., Castañeda, L. M., & Lozano, Z. P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. *Infection and Drug Resistance*.
- MH, W. (2010). Multiresistant bacteria and current therapy- the economical side of the story. . *Eur J Med Res*. .
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Sanches I., L. P. (1986). *La espectrometría de emisión con fuente de plasma de acoplamiento inductivo*.
- Sandri, A., Ortombina, A., Boschi, F., Cremonini, E., Boaretti, M., Sorio, C., . . . Lleo, M. (2018). Sandri, A., Ortombina, A., Boschi, F., La inhibición de los factores de virulencia secretados por *Pseudomonas aeruginosa* reduce la inflamación pulmonar en ratones con FQ. Virulencia. *Virulencia*.

- Sarah, H., Paolo, V., & Emanuela, F. (2017). Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Stell, H. T. (2012). Pathogen and Host Directed Anti Inflammatory Activities of Macrolide Antibiotics. . *Mediators Inflamm.* .
- Tello A, A. B. (2011). Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. *Environ Health Perspect.*

Apéndices

Apéndice A. *Pseudomonas aeruginosa*



Figura A1. *Pseudomonas aeruginosa* (2018). Investigating heat-shock gene *htpG* and the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* - Infectious Diseases Hub. Infectious Diseases Hub. <https://www.id-hub.com/2018/01/24/investigating-heat-shock-gene-htpg-production-virulence-factors-pseudomonas-aeruginosa/>



Figura A2. *P. aeruginosa*. Sally Robertson, B. (2018). Researchers identify target gene in *P. aeruginosa* infection. News-Medical.net. Available at: <https://www.news-medical.net/news/20180423/Researchers-identify-target-gene-in-P-aeruginosa-infection.aspx>

Apéndice B. Lista de prioridades de patógenos globales para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.

Species	Type of Antibiotic Resistance
Critical*	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem resistant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem resistant
<i>Enterobacteriaceae</i> [†]	Carbapenem resistant
	Third-generation cephalosporin resistant
High	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin resistant
<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin resistant
	Vancomycin intermediate and resistant
<i>Helicobacter pylori</i>	Clarithromycin resistant
<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolone resistant
<i>Salmonella spp</i>	Fluoroquinolone resistant
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolone resistant
	Third-generation cephalosporin resistant
Medium	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin nonsusceptible
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillin resistant
<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolone resistant

Figura B1. Sweta Gupta, E. (2018). WHO Prioritizes Antibiotic-Resistant Bacteria on

Pathogens List. Infectious Disease Advisor. Available at:

<https://www.infectiousdiseasadvisor.com/antibiotics-antimicrobial-resistance/who-ranks-global-pathogens-list/article/641720/>

Apéndice C. Medios de cultivo

Tabla C1.

Medio mínimo de succinato

REACTIVO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD (g)
Ácido succínico	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH	65 mM	7.68
Fosfato de			

potasio monobásico	KH_2PO_4	56 mM	7.72
Sulfato de magnesio	MgSO_4	1.7 mM	0.2
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_2)\text{SO}_4$	7.5 mM	1
Hidróxido de sodio (Ajuste de pH a 7.0)	NaOH	66 mM	2.64

Tabla C2.

Medio LB

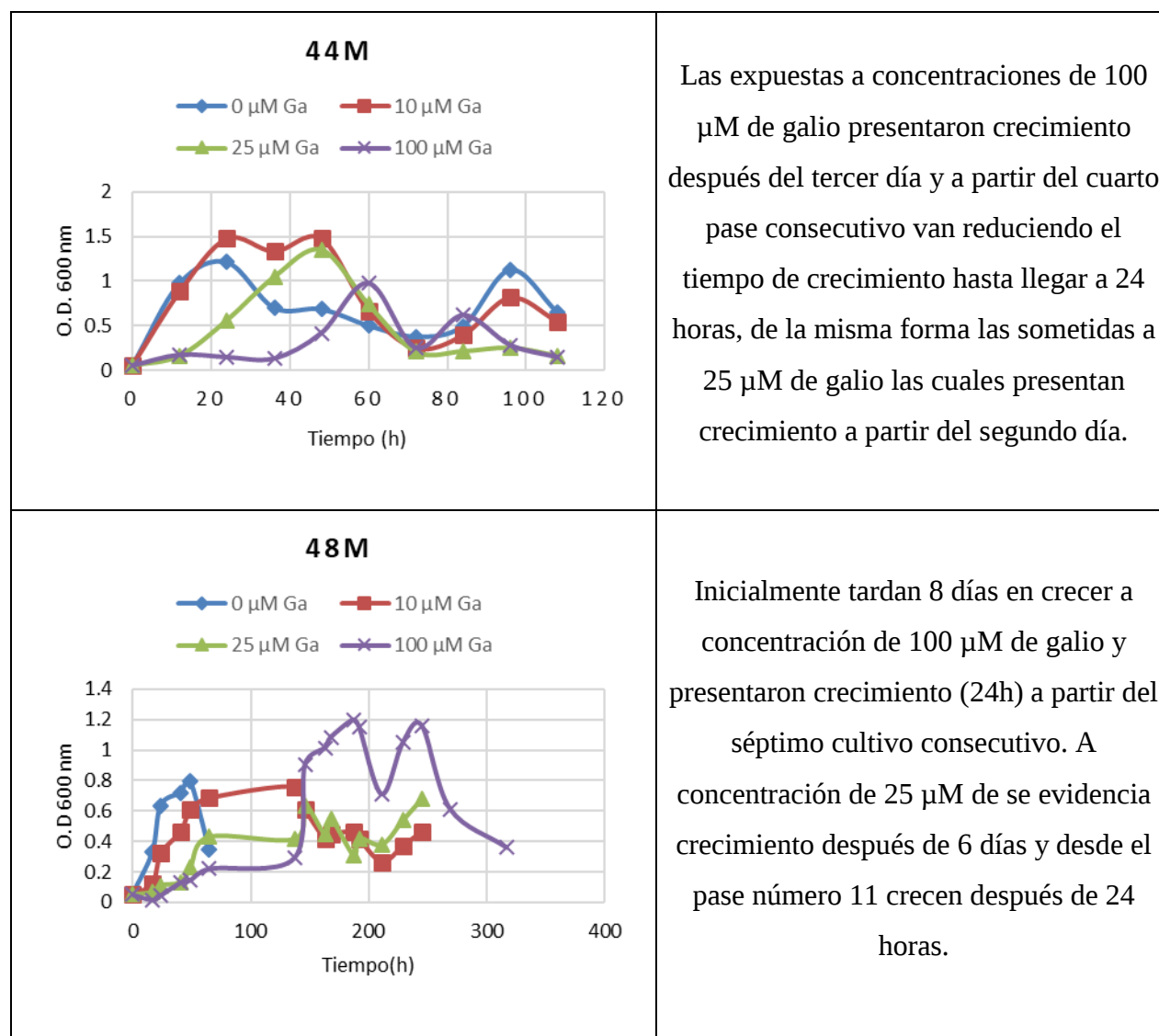
REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD (g)
Cloruro de sodio	NaCl	10
Extracto de levadura	-	5
Triptona	-	10
Agar (Para medio sólido en placas)	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_9$	15

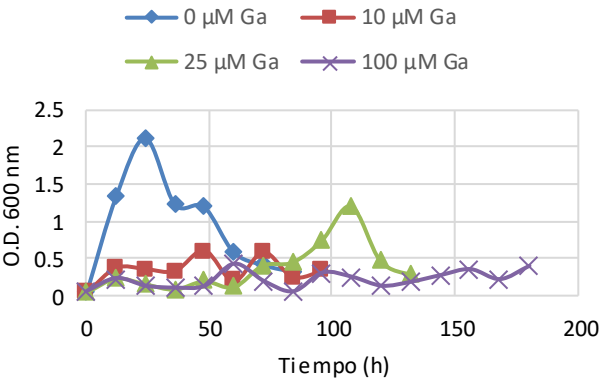
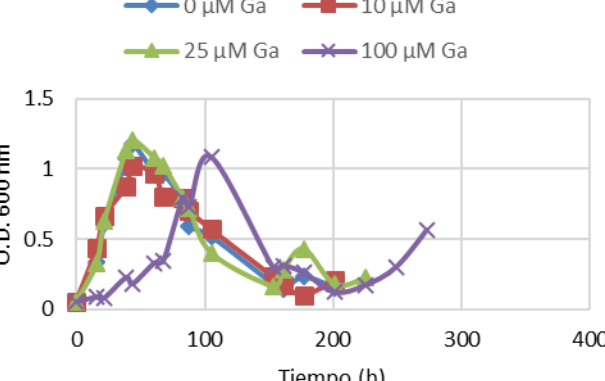
Apéndice D. Descripción tratamiento de cepas para obtención de mutantes.

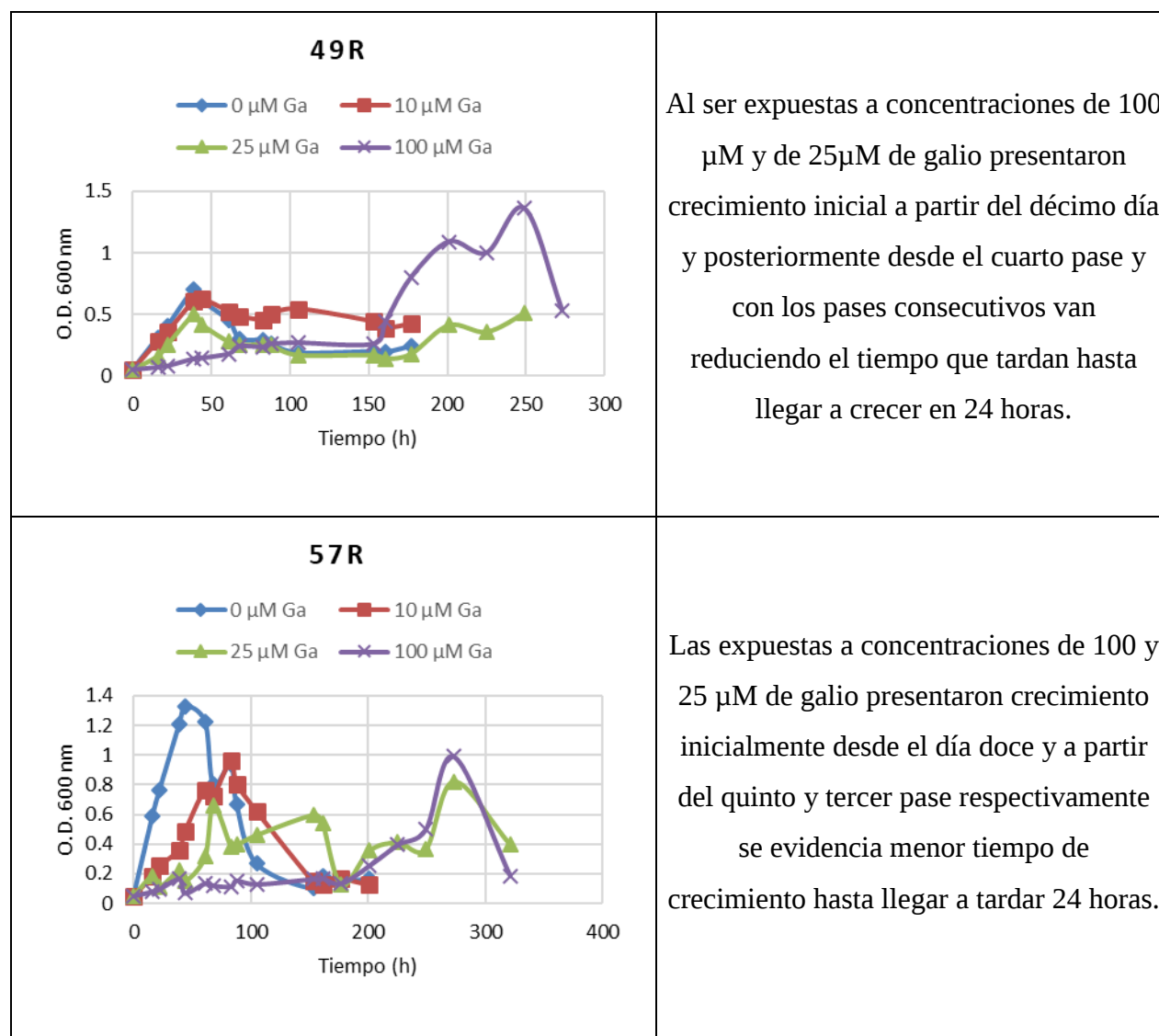
Tabla D 1.

Descripción tratamiento de cepas para obtención de mutantes.

Curvas de crecimiento continuas	Descripción de la resistencia
--	--------------------------------------



57M  O.D. 600 nm Tiempo (h)	Las cepas expuestas a concentraciones de 100 μM de galio no presentaron crecimiento inicialmente y aquellas sometidas a 25 μM a partir del cuarto día de cultivo inicial y después del quinto pase consecutivo se evidencia una disminución en el tiempo hasta llegar a crecer en 24 horas.
58R  O.D. 600 nm Tiempo (h)	Presentaron crecimiento inicialmente después del cuarto y segundo día de cultivo expuestas a concentraciones de 100 μM y 25 μM de galio respectivamente, a partir del tercer pase y con los pases consecutivos van reduciendo el tiempo de crecimiento hasta 24 horas.



Apéndice E. Tablas de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación cepas 30R, 58M y mutantes respectivas.

Tabla E1.

Velocidades específicas de crecimiento cepas 30R, 58M y mutantes.

Velocidad Específica de Crecimiento μ (h ⁻¹)			
Cepa	μ (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹) Ga 5	μ (h ⁻¹) Ga 10
30R	0.19 ± 0.04 (4)	0.23 ± 0.07 (4)	0.11 ± 0.03 (4)
14' (30R Ga^R)	0.34 ± 0.05 (3)	0.37 ± 0.01 (3)	0.31 ± 0.007 (3)
58M	0.33 ± 0.02 (3)	0.20 ± 0.04 (3)	0.16 ± 0.01 (2)
18' (58M Ga^R)	0.36 ± 0.05 (3)	0.25 ± 0.02 (4)	0.22 ± 0.01 (4)

Tabla E2.

Tiempo de duplicación cepas 30R, 58M y mutantes.

Tiempo de duplicación (h)				
Galio μ M	30R	14'	58M	18'
0	3.53 ± 0.52 (4)	1.88 ± 0.16 (3)	2.10 ± 0.18 (3)	1.94 ± 0.30 (3)
5	4.76 ± 0.19 (3)	1.82 ± 0.07 (3)	3.48 ± 0.72 (3)	2.62 ± 0.33 (4)
10	7.84 ± 0.43 (3)	2.23 ± 0.027 (3)	4.23 ± 0.27 (3)	3.09 ± 0.19 (4)

Los valores que se indican entre paréntesis son el número de experimentos realizados (cultivos independientes) y el valor es el promedio de estos.

Apéndice F. Cepas preservadas sometidas a galio con crecimiento de 24 h.

Tabla F 1.

Cepas preservadas sometidas a galio con crecimiento de 24 h.

Cepa parental	Cepa preservada expuesta a galio (crecimiento 24h)	Número designado posible mutante
49R	49R+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	1
57R	57R+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	2
58M	58M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	3
58M	58M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	4
PA14	PA14+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	5
PA14	PA14+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	6
PA14	PA14+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	7
PA14	PA14+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	8
PA14	PA14+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	9
PA14	PA14+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	10
58M	58M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	11
58M	58M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	12
58M	58M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	13
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	14
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	15
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	16
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	17
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	18
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	19
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	20

30R	30R+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	21
48M	48M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	22
48M	48M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	23
48M	48M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	24
57R	57R+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	25
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	26
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	27
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	28
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	29
44M	44M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	30
49R	49R+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	31
49R	49R+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	32
57R	57R+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	33
57M	57M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	34
57M	57M+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	35
49R	49R+25 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	36
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	1'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	2'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	3'
57R	57R+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	4'
57R	57R+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	5'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	6'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	7'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	8'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	9'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga(NO}_3)_3$	10'

57R	57R+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	11'
57R	57R+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	12'
58M	58M+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	13'
30R	30R+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	14'
30R	30R+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	15'
30R	30R+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	16'
58M	58M+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	17'
58M	58M+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	18'
58M	58M+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	19'
58M	58M+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	20'
PA14	PA14+100 $\mu\text{mol Ga}(\text{NO}_3)_3$	21'

Apéndice G. Datos y curva de calibración para mediciones de galio en AAS.

Tabla G 1.

Datos para curva de calibración para mediciones de galio en AAS.

Curva de calibración MMS			
PATRONES (MMS)	LECTURAS		
ppm (mg/L)	ppm (mg/L)	Abs 294 nm	Micromolar
0.5	0.5	0.0150	7.17
3	3	0.0086	43.03
7	7	0.0193	100.40
10	10	0.0278	143.43

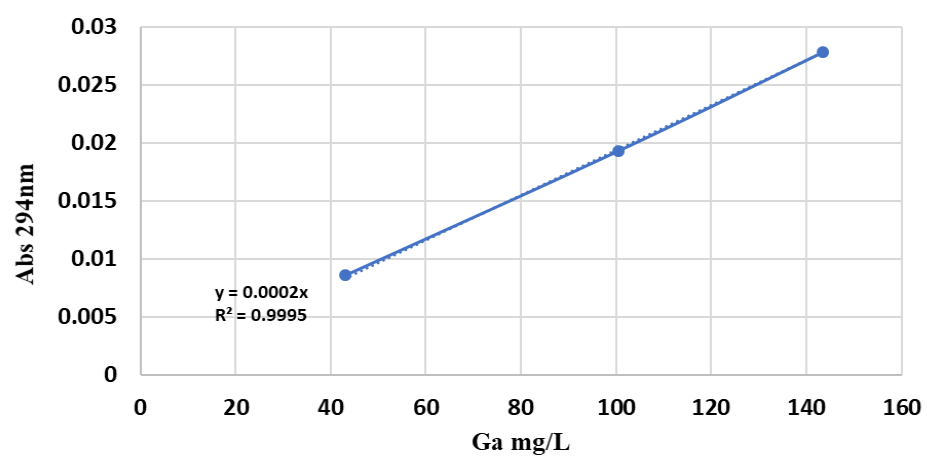


Figura G1. Curva de calibración para galio equipo AAS.