

Estudio de la selección *in vivo* de resistencia a galio en *Pseudomonas aeruginosa*

Yahira Katherine Porras Hernández

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Química

Directora:

Viviana Sánchez Torres

Ph.D. Ingeniería Química

Codirectores:

Paulina Castañeda Tamez

MSc en Ciencias Bioquímicas

Rodolfo García Contreras

Ph.D. en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

Dedico con todo mi amor y cariño este proyecto,

A Dios, quien me mantuvo siempre de pie, aun cuando todo parecía caer de a pedazos, a la virgen de Chiquinquirá y a mi Guadalupeana por siempre protegerme y acompañarme en cada uno de mis pasos,

A mi ángel que está en el cielo, desde donde siempre guía mi corazón y mi pensar, a ti, papito lindo quien siempre ha guiado mis pasos por el mejor camino y que, aunque una distancia larga nos separa, siempre estaremos unidos por el corazón, a ti te dedico este logro, a ti que siempre fuiste mi inspiración cuando sentía que ya no podía más,

A mis abuelitos Cristobal y Alfonso y a mi abuelita Rosana, que me vieron crecer y me ayudaron a formar para ser lo que hoy soy, estoy segura que, aunque no los puedo ver, una sonrisa adorna su rostro de la alegría tan inmensa que sienten al verme triunfar,

A mi mamita hermosa, quien ha cumplido muy bien su papel de papá y mamá, mi ejemplo a seguir y mi maestra de vida, por siempre apoyarme en mis decisiones, por su esfuerzo y valentía, te amo mamá,

A mi nonita Blanca, quien me vio crecer y me educo como a una de sus hijas, siempre me apoyo en todo momento y estuvo ahí para aconsejarme y ayudarme a escoger mi mejor camino, por toda su motivación, sabiduría y grandes enseñanzas que me transmitió para la vida,

A mi nonita Nacha, quien siempre me ofrecía en sus oraciones, por su amor incondicional,

A mi tía hermosa, la mejor de todas las tías del mundo, una amiga más, que me vio y me ayudo a crecer, si tu tía Ana, por ser mi cómplice y por todo el amor y apoyo que me has brindado,

A mis hermanas, Whendy y Yulieth, por acompañarme siempre en cada paso que doy, por las risas y llantos juntas y porque a pesar de la distancia siempre nos mantenemos unidas,

A mis hermanos, Nico y Sebas, por sus palabras de aliento y por todo el amor que me demuestran siempre,

A mis primos, Cristian y Gogo, que más que mis primos son mis hermanos, con quienes crecí, por siempre estar presentes en mis logros y apoyarme cuando más lo he necesitado,

A mis tías, tíos, primos y familiares por sus palabras y oraciones llenas de amor,

A mi familia colombiana, Mojica Ostos, por todo el apoyo y amor que me han brindado,

A mi familia mexicana, Doña Esther, Doña Aida, Don Gerardo, Paulina y Estefanía, por todo el amor y cariño que me brindaron durante esta etapa, por sus palabras llenas de amor y sabiduría,

A quienes la vida puso en mi camino durante este proceso: Dani, Rosita, Pau, Wendy, Liz, Yurley, Kelly, Les, Lyda, Aleja, Cristian, Alejo, Fabián, Albeiro, Danna, Ingrid, Jime, Ely, René y a mis amigos de toda la vida Tatis, Carito, Clau, Lau, Mipa, Kari, Nelson, entre otros, por siempre estar conmigo en este largo camino, por llenarlo de felicidad y armonía, por sus palabras de apoyo en los momentos cruciales y lo más importante una amistad muy bonita y sincera,

Por último, a todas y cada una de las personas que siempre estuvieron ahí y de una u otra forma me ayudaron a lo largo este proceso,

Muchas gracias a todos, los quiero mucho.

Yahira Porras

Agradecimientos

Agradezco de todo corazón y con mucho amor,

A Dios por la salud, la sabiduría, el amor, las fuerzas para salir adelante y porque nunca me llevo a donde no pudiera ayudarme; A la virgen de Chiquinquirá por protegerme y ser mi cómplice y guía.

A mi fuente de inspiración para ser lo que soy, quienes me apoyan en cada paso que doy y decisión que tomo por más loca que sea, a ustedes mamita y papito que me crearon para un fin que día a día he logrado gracias a su ejemplo.

Especialmente y con mucho cariño a mi directora, la Doctora Viviana Sánchez, un gran ejemplo a seguir, por su confianza y apoyo a lo largo de este camino, en especial por su seguimiento y apoyo en la escritura de mi tesis.

A Paulina Castañeda por su acompañamiento, su paciencia, sus consejos y su constante apoyo durante este proyecto, por ser esa guía en mis momentos de desespero y tristeza y por siempre estar ahí para alegrarlos.

Al Doctor Rodolfo García por su aporte y conocimiento compartido y por permitirme trabajar en su laboratorio para el desarrollo de este proyecto.

A Guillermo por su ayuda y aporte para concluir este trabajo de la mejor manera.

A Miguel por compartir su conocimiento y orientarme en la etapa final de este proyecto, por sus aportes y por confiar en mí.

A la Doctora Bertha por permitirme trabajar en su laboratorio y siempre estar tan pendiente.

A la Doctora Ana María por su gran amor y hospitalidad hacia mí.

A los miembros del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la facultad de Medicina de la UNAM por su apoyo y conocimiento compartido.

A la familia Castañeda Tamez por el gran amor y apoyo que me brindaron durante mi estancia, por hacerme sentir como una hija más y por su hermosa hospitalidad.

A la familia García Contreras por el cariño.

A mis evaluadores Jaime y Luis por sus aportes.

A ACEIQUIP y ASCEIQ por todo el apoyo y confianza en mi papel como secretaria, por ayudarme a crecer como persona y como profesional, por ayudarme a perder miedos y a confiar más en mí.

A la facultad de Medicina de la UNAM por su gran recibimiento y apoyo durante mi estancia en la Ciudad.

A la Universidad Industrial de Santander que por medio de su oficina de Relaciones Exteriores hicieron posible esta pasantía de investigación y a la Escuela de Ingeniería Química por ser mi segundo hogar; a todos sus profesores por las lecciones que de una u otra forma influyeron en mi formación académica, integra y profesional; por ser mi centro de estudio, campo de lucha y espacio de sueños cumplidos, por dejarme amigos y un nuevo comienzo de muchas más metas y por último a sus administrativos, en especial a Linita por siempre ayudarnos a solucionar nuestros más mínimos inconvenientes.

Contenido

Introducción	14
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo general.....	16
1.2 Objetivos específicos	16
2. Marco teórico	17
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.1.1 Factores de virulencia.	17
2.1.2 Uso del galio como antibiótico.	19
2.2 Modelo <i>in vivo</i> <i>Galleria mellonella</i>	20
3. Metodología	21
3.1 Selección de condiciones de cultivo e infección.....	22
3.1.1 Medio de cultivo.	23
3.1.2 Selección de la concentración de <i>P. aeruginosa</i> (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$)	25
3.1.3 Selección de la concentración de nitrato de galio ($Ga(NO_3)_3$).	26
3.2 Infección de <i>G. mellonella</i>	26
3.3 Evaluación de resistencia.....	27
3.3.1 Concentración letal de bacterias.	28
3.3.2 Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> aislada de <i>G. mellonella</i>	28
3.3.3 CMI de <i>P. aeruginosa</i> aislada de <i>G. mellonella</i>	28

3.3.4 Concentración intracelular de galio de <i>P. aeruginosa</i> aislada de <i>G. mellonella</i>	29
3.3.5 SST3 de <i>P. aeruginosa</i> aislada de <i>G. mellonella</i>	29
3.3.6 Control de experimentos <i>in vitro</i>	30
4. Resultados	30
4.1 Selección de condiciones de cultivo e infección.....	30
4.1.1 Medio de cultivo.	30
4.1.2 Selección de la concentración de células en MMS para infectar <i>G. mellonella</i>	32
4.1.3 Selección de la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$	33
4.2 Infección de larvas	33
4.3 Evaluación de resistencia	35
4.3.1 Concentración de células letales.	36
4.3.2 Factores de Virulencia de las células aisladas de <i>Galleria mellonella</i>	37
4.3.3 CMI de <i>P. aeruginosa</i> aislada de <i>G. mellonella</i>	38
4.3.4 Concentración intracelular de galio en <i>P. aeruginosa</i> aislada de <i>G. mellonella</i>	39
4.3.5 SST3 de PAO1 aislada de <i>G. mellonella</i>	41
4.3.6 Control de experimentos <i>in vitro</i>	42
5. Conclusiones	42
6. Recomendaciones	44
Referencias Bibliográficas	45
Apéndices.....	51

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i> Esquema de los mecanismos de obtención de hierro de <i>P. aeruginosa</i>	185
<i>Figura 2.</i> Ciclo de vida de <i>G. mellonella</i>	20
<i>Figura 3.</i> Esquema de la metodología desarrollada.....	21
<i>Figura 4.</i> Larvas de <i>G. mellonella</i>	25
<i>Figura 5.</i> Fotografía de <i>P. aeruginosa</i>	31
<i>Figura 6.</i> Curva de supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectada con diferentes concentraciones de <i>P. aeruginosa</i> (diluciones: 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) en MMS.....	33
<i>Figura 7.</i> Curva de supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectada con A. PAO1, B. PA14 y C. PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) en MMS	34
<i>Figura 8.</i> Larvas de <i>G. mellonella</i> , melanización como respuesta inmune a la infección.	36
<i>Figura 9.</i> UFC de cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ aisladas de hemolinfa de <i>G. mellonella</i> después de 1 y 5 pases a través del modelo <i>in vivo</i>	36
<i>Figura 10.</i> Producción de pioverdina en MMS de cepas A. PAO1, B. PA14 y C. PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ aisladas de <i>G. mellonella</i>	38
<i>Figura 11.</i> Concentración intracelular y extracelular de galio de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) silvestre y aislada en la secuencia 5 de <i>G. mellonella</i>	40
<i>Figura 12.</i> Ensayo de SST3 de células de PAO1 aisladas de <i>G. mellonella</i> después de 5 pases con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$	41

Lista de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> usadas en la presente investigación.	22
Tabla 2. Comparación de los factores de virulencia de PAO1, PA14 y PA14 Δ pvdF en los medios LB y MMS.	32
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de células aisladas de <i>G. mellonella</i> con PAO1, PA14 y PA14 Δ pvdF con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en MMS	39
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria de cepas silvestres y aisladas in vivo e in vitro (PAO1, PA14 y PA14 Δ pvdF) con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en MMS	42

Lista de Apéndices

Apéndice A. Medios de Cultivo.....	51
Apéndice B. Protocolo para medir los factores de virulencia	52
Apéndice C. Protocolo para medir la concentración intracelular Ga	54
Apéndice D. Mantenimiento de <i>G. mellonella</i>	56
Apéndice E. Protocolo para evaluar la SST3	57
Apéndice F. Análisis Estadísticos	59
Apéndice G. Parámetros para seleccionar el medio de cultivo	61
Apéndice H. Unidades formadoras de colonias aisladas de <i>G. mellonella</i>	65
Apéndice I. Factores de virulencia.....	67
Apéndice J. PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ <i>in vitro</i>	75
Apéndice K. Galio intracelular de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$	78

Lista de Abreviaturas

CMI: Concentración mínima inhibitoria

D.O.: Densidad óptica

EGTA: Ácido etilenglicol tetraacético

FDA: Food and Drug Administration

FQ: Fibrosis quística

Ga(NO₃)₃: Nitrato de galio

LB: Luria Bertani

MMS: Medio mínimo de succinato

OMS: Organización Mundial de la Salud

S₀: Secuencia cero

S₁: Secuencia uno

S₂: Secuencia dos

S₃: Secuencia tres

S₄: Secuencia cuatro

S₅: Secuencia cinco

SST3: Sistema de secreción tipo III

TCA: Ácido Tricloroacético

UFC: Unidades formadoras de colonias

Resumen

TÍTULO: ESTUDIO DE LA SELECCIÓN *IN VIVO* DE RESISTENCIA A GALIO EN *Pseudomonas aeruginosa**.

AUTOR: YAHIRA KATHERINE PORRAS HERNÁNDEZ**

PALABRAS CLAVES: *Pseudomonas aeruginosa*, *Galleria mellonella*, sideróforo, galio, *in vivo*.

DESCRIPCIÓN:

La bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista con facilidad de ser adquirida por pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades como fibrosis quística. Este patógeno es capaz de llevar a cabo distintos mecanismos que le permiten generar resistencia a una gran variedad de antibióticos, debido a esta capacidad se dificulta su tratamiento y en recientes investigaciones se han desarrollado nuevas técnicas para su tratamiento. Una de estas técnicas se basa en el secuestro de bienes públicos con el fin de disminuir su crecimiento y así limitar el efecto en una infección (Ross-Gillespie, et al., 2014). Estas técnicas se basan en el mimetismo de ciertas sustancias como por ejemplo los factores esenciales para el crecimiento de la bacteria. El galio es un metal análogo no oxidizable del hierro (III), el cual reemplaza a este en diversos procesos biológicos, impidiendo su transporte, el cual se lleva a cabo por medio de sideróforos (García-Contreras, et al., 2014). Este metal, en su forma como nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) se usa para tratar la hipercalcemia, asociada a tumores óseos; además, ha demostrado su efectividad para eliminar a *P. aeruginosa* *in vitro* e *in vivo* (Kaneko, et al., 2007; Weigert, et al., 2017). En contraste a esto, en este proyecto, evaluamos la generación de resistencia en tres cepas de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) al $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en larvas de *Galleria mellonella*, para lo cual se realizaron infecciones consecutivas en el modelo *in vivo* con las diferentes cepas en presencia y ausencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, recuperando en cada pase bacterias para evaluar la producción de factores de virulencia y la generación de resistencia al antibiótico, así como para continuar las infecciones consecutivas. Después de seis pases se evaluó la resistencia final al $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y se observó que estas tres cepas no son capaces de generar resistencia a este antibiótico, pero sí aumentan su virulencia.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología. Directora: Viviana Sánchez Torres Ph.D. en Ingeniería Química Codirectores: Rodolfo García Contreras Ph.D. en Ciencias Biomédicas Paulina Castañeda Tamez MSc en Ciencias Bioquímicas.

Abstract

TÍTULO: STUDY OF THE *IN VIVO* SELECTION OF GALLIUM RESISTANCE IN *Pseudomonas aeruginosa**.

AUTHORS: YAHIRA KATHERINE PORRAS HERNÁNDEZ**

KEYWORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, *Galleria mellonella*, siderophore, gallium, *in vivo*.

DESCRIPTION:

The Gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen easily acquired by immunocompromised patients or with diseases such as cystic fibrosis. This pathogen is able to carry out different mechanisms that allow it to generate resistance to a great variety of antibiotics, due to this capacity its treatments is difficult and in recent researches new techniques have been developed for its treatment. One of these techniques is based on the sequestration of public goods in order to reduce their growth and thus limit the effect on an infection (Ross-Gillespie, et al., 2014). These techniques are based on the mimic of certain substances, as for example the essential factors for the growth of the bacteria, gallium is a non-oxidizable metal analogue of iron (III), which replaces it in various biological processes, preventing its transport, which is carried out by siderophores (García-Contreras, et al., 2014). This metal, in its form as gallium nitrate ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) is used to treat hypercalcemia, associated with bone tumors, and has also proven its effectiveness to eliminate *P. aeruginosa* *in vitro* and *in vivo* (Kaneko, et al., 2007; Weigert, et al., 2017). In contrast to this, in this project, we evaluated the generation of resistance in three strains of *P. aeruginosa* (PA01, PA14 and PA14 ΔpvdF) to $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ in the model *in vivo* *Galleria mellonella*, for which consecutive infections were performed in the *in vivo* model with different strains in the presence and absence of $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, recovering in each passage bacteria to evaluate the production of virulence factors and the generation of antibiotic resistance, as well as to continue consecutive infections. After six passes the final resistance to $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ was evaluated and it was observed that these three strains are not capable of generating resistance to this antibiotic, but if they increase their virulence.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología. Directora: Viviana Sánchez Torres Ph.D. en Ingeniería Química Codirectores: Rodolfo García Contreras Ph.D. en Ciencias Biomédicas Paulina Castañeda Tamez MSc en Ciencias Bioquímicas.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es el principal patógeno de la familia *Pseudomonadaceae*. Es un bacilo Gram negativo causante de infecciones en personas inmunocomprometidas, especialmente en pacientes con cáncer, quemaduras o heridas en la piel y fibrosis quística (FQ).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista con las 12 especies de bacterias resistentes a antibióticos para las que es prioritario el desarrollo de nuevas terapias para su tratamiento. Esto debido a que cada año mueren alrededor de 750.000 personas a causa de infecciones resistentes a los antimicrobianos y se estima que para el año 2050 aumentará a diez millones de personas (O'Neill, 2014). En la lista se enumeran varias bacterias Gram negativas, las cuales tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes. Esta lista se divide en tres categorías dependiendo de la urgencia con la que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son peligrosas en hospitales, residencias de ancianos, y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos; entre estas bacterias encontramos a *P. aeruginosa* en segundo lugar (Lowe Davies & Bennett, 2017).

P. aeruginosa cuenta con un alto nivel de tolerancia natural y capacidad de adquirir resistencia a distintos antibióticos y a desinfectantes. Entre los posibles mecanismos para la generación de la resistencia a antibióticos está la capacidad de disminuir la permeabilidad de su membrana externa, la producción de enzimas capaces de degradar a los antibióticos, la activación de varias bombas de flujo, las cuales forman un sistema eficiente de expulsión de los antibióticos que logran entrar a la bacteria y la formación de estructuras de resistencia como la biopelícula; todos estos

mecanismos están presentes en *P. aeruginosa* (Lújan Roca, 2014; Kim & Lee, 2016). Con el descubrimiento de nuevos antibióticos se observó una respuesta favorable contra las enfermedades infecciosas (Livermore, 2012; Steel, et al., 2012). Sin embargo, también aparecieron nuevos mecanismos de resistencia difíciles de controlar, surgiendo bacterias que sobreviven a más de un antibiótico, conocidas como multirresistentes (Amábile-Cuevas, 2010).

Debido a la facilidad que tiene *P. aeruginosa* de adquirir resistencia se propuso una estrategia antibiótica no convencional que fue utilizar la nutrición bacteriana como blanco terapéutico, para lo cual se utilizó el galio, un elemento metálico que pertenece al grupo IIIA de la tabla periódica, como antibiótico por sus similitudes fisicoquímicas con el hierro III, excepto que el galio es incapaz de óxido reducirse en condiciones fisiológicas. El galio en su forma de nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) fue autorizado por la FDA para su uso clínico (Kaneko, et al., 2007) y se usa comúnmente para tratar la hipercalcemia (25 mg/ml), inhibiendo la reabsorción ósea por los osteoclastos y la metástasis ósea; también se ha reportado su uso para el tratamiento experimental en conejos y tripanosomiasis en ratón (Rangel-Vega, et al., 2015), además se han realizados múltiples estudios que confirman la eficiencia del galio como antimicrobiano contra diversas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (Olakanmi, et al., 2000; Olakanmi, et al., 2013), *P. aeruginosa* (DeLeon, et al., 2009; Kaneko, et al., 2007) y *Acinetobacter baumannii* (de Léséleuc, et al., 2012; Arivett, et al., 2015); por lo cual, el objetivo de esta investigación es evaluar si *P. aeruginosa* genera o no resistencia a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ cuando es utilizado como tratamiento en el modelo vivo *Galleria mellonella*, el cual a pesar de no tener un sistema inmune evolucionado como el de los mamíferos es capaz de responder a la infección (Papaioannou, et al., 2013), lo que permite tener un acercamiento a un tratamiento real y así determinar si este antibiótico podría o no ser usado contra *P. aeruginosa*.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) a nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) en el modelo *in vivo* *Galleria mellonella*.

1.2 Objetivos específicos

➤ Seleccionar el medio de cultivo (LB o MMS), la concentración de nitrato de galio y la concentración de bacterias (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) para el tratamiento en el modelo *in vivo* *Galleria mellonella*.

➤ Observar el efecto del $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en la supervivencia de *Galleria mellonella* infectada con *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$).

➤ Evaluar la generación de resistencia a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en bacterias aisladas del modelo *in vivo* *Galleria mellonella*.

2. Marco teórico

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio facultativo (Hassett, et al., 2002) que, utiliza una amplia variedad de fuentes de carbono. Este microorganismo es común en el medio ambiente y se encuentra en diversos entornos, como en las heces, el suelo, el agua, etc. (Milagro Montero, 2012; Cornelis & Dingemans, 2013) tiene un tamaño de entre 0.5 μm y 0.8 μm de ancho por 1.5 μm y 3.8 μm de largo.

2.1.1 Factores de virulencia. Son aquellos productos que generan ventajas a los patógenos como obtención eficiente de nutrientes, y mayor resistencia a condiciones de estrés. *P. aeruginosa* produce una variedad de factores de virulencia, en su mayoría controlados por la percepción de quórum, como ramnolípidos, fenazinas, proteasas como la elastasa y proteasa alcalina, que le permiten colonizar plantas, nematodos, insectos y mamíferos, incluidos los seres humanos (Cornelis & Dingemans, 2013). Otros factores que también puede producir son: fimbrias (*pili*), flagelo, matriz expolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelícula (Lee & Zhang, 2014; Lújan Roca, 2014).

P. aeruginosa también produce dos sideróforos, pioverdina y pioquelina, que son los encargados de la captación del hierro presente en el medio de cultivo. La pioverdina es el sideróforo principal por su mayor afinidad al hierro. Mientras que la pioquelina cuenta con baja afinidad al hierro, sin embargo, es importante en infecciones crónicas, como las que se dan en los

pulmones de pacientes con FQ, desempeñando un papel en la respuesta inflamatoria que causa daño a los tejidos (Cornelis & Dingemans, 2013).

En la Figura 1 se puede observar los mecanismos de obtención del hierro. La pioverdina es sintetizada en el citoplasma y después es transportada al espacio periplásmico para su maduración y secretada fuera de la célula para unirse al hierro por la bomba PvdRT-OpmQ. El complejo Pvd- Fe^{3+} entra a la célula a través de la proteína transportadora FpvA, una vez dentro del espacio periplásmico el hierro es liberado de este complejo por una reacción de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} cuando ambos son separados, la pioverdina libre es enviada de nuevo al exterior de la célula (Pvd-Rec) y el Fe^{2+} es transportado al interior de la célula a través de las proteínas FpvDE. Además de este transporte existe otro mecanismo por el cual puede entrar el hierro a la célula que es a partir de porinas y las proteínas HitAB.

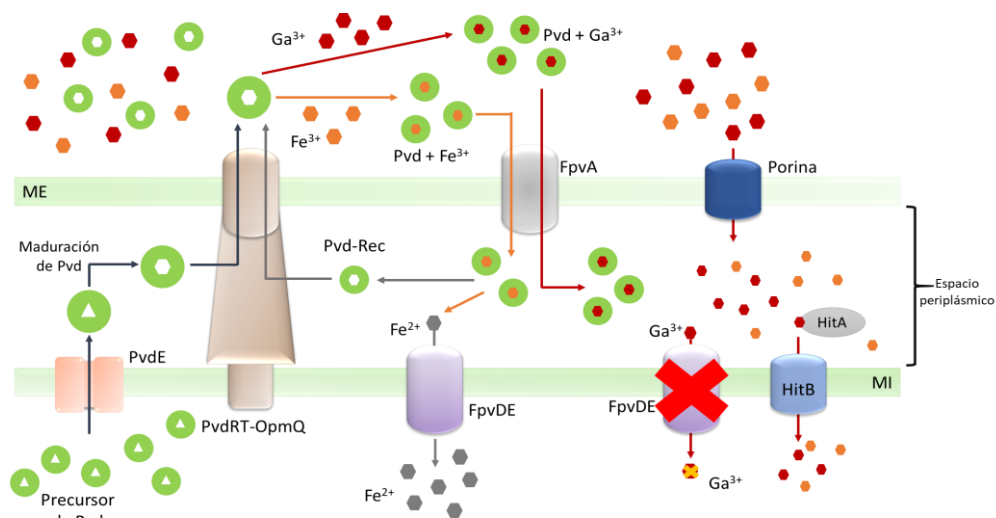


Figura 1. Esquema de los mecanismos de obtención de hierro de *P. aeruginosa*. Pioverdina (Pvd), membrana externa (ME), membrana interna (MI), transportador del precursor de pioverdina al espacio periplásmico (PvdE), bomba transportadora de pioverdina del espacio periplásmico al

exterior de la célula (PvdRT-OpmQ), pioverdina reciclada (Pvd-Rec), receptor transportador de hierro-pioverdina (FpvA), receptor de hierro al citoplasma (FpvDE), proteína periplásmica de transporte membranal (HitA), permeasa para transporte de hierro/galio (HitB).

Por otra parte, los sistemas de secreción se encargan de enviar proteínas y otras moléculas al exterior, teniendo un papel importante en la virulencia de *P. aeruginosa* (Cabañas-Romero & Huerta-Saquero, 2014). El sistema de secreción tipo III (SST3) es esencial para infecciones crónicas; son “nanojeringas” de origen proteico y de escala nanométrica que se ensamblan en las membranas celulares de las bacterias que las producen. Es el encargado de la secreción de toxinas ExoS, ExoT y ExoU, las cuales son inyectadas directamente desde el citoplasma de la bacteria al citoplasma de la célula eucariota infectada (Cabañas-Romero & Huerta-Saquero, 2014).

2.1.2 Uso del galio como antibiótico. El hierro es el cuarto elemento más abundante en la Tierra y ampliamente utilizado por los organismos, debido a que puede existir en dos estados de oxidación Fe^{2+} y Fe^{3+} , siendo de mayor utilidad para la bacteria en su estado de oxidación Fe^{2+} (Cornelis & Dingemans, 2013). El galio puede alterar el metabolismo bacteriano del hierro, ya que es capaz de sustituir al hierro cuando es absorbido por las bacterias y se utiliza como un “Caballo de Troya”, debido a que tiene un radio iónico casi idéntico al del hierro y algunos sistemas de captación bacteriana son incapaces de distinguir el galio del hierro (Figura 1), por lo tanto, el galio se incorpora en lugar del hierro en algunas proteínas, interrumpiendo su funcionamiento (García Contreras, et al., 2018; Goss, et al., 2018). Sin embargo, altas concentraciones de hierro en el ambiente reducen la captación de galio y por lo tanto su actividad.

Además, se ha comprobado que el galio tiene actividad antibacteriana contra algunos patógenos humanos, entre ellos *P. aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* (Goss, et al., 2018).

2.2 Modelo *in vivo* *Galleria mellonella*

G. mellonella es un lepidóptero que tiene metamorfosis completa; en la Figura 2 se observa el ciclo de vida de este.

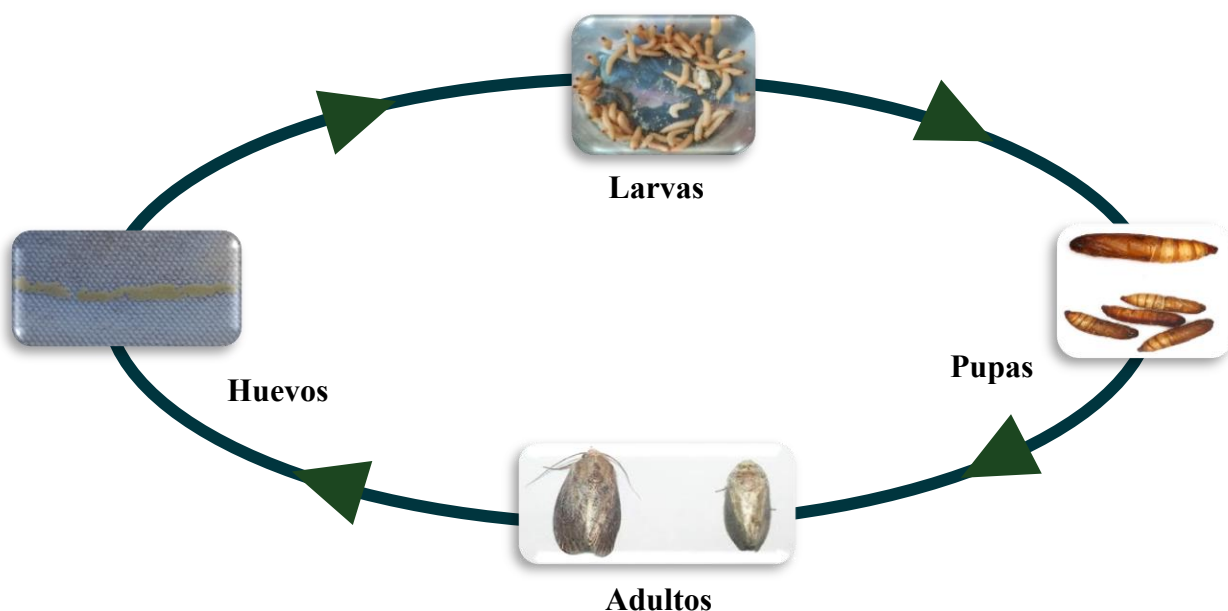


Figura 2. Ciclo de vida de *G. mellonella*.

G. mellonella es usada como modelo para estudiar las interacciones de patógenos humanos, en su fase de larva. Se ha utilizado con diferentes patógenos como: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *P. aeruginosa*, entre otros (Papaioannou, et al., 2013). Es viable usar este modelo por su capacidad de crecer a 37 °C a diferencia de otros invertebrados, que no pueden

crecer a esta temperatura, además de su facilidad de uso, bajo costo, requerimiento de espacio y su rápida generación.

En 2003, Miyata y colaboradores usaron *G. mellonella* para comprobar la secreción de exotoxinas por el SST3 y evaluar su importancia en la virulencia (Miyata, et al., 2003). Mientras que, en 2014, Hill y colaboradores determinaron la viabilidad de utilizar *G. mellonella* como modelo *in vivo* para evaluar la farmacocinética y la eficiencia de antibióticos contra *P. aeruginosa* (Hill, et al., 2014). En 2015, Arivett y colaboradores demostraron la actividad antibacteriana de galio protoporfirina IX contra *A. baumannii* en este modelo (Arivett, et al., 2015). Y finalmente en 2017, Weigert y colaboradores evaluaron si la presencia de pioverdina estaba ligada a la virulencia en *G. mellonella* (Weigert, et al., 2017).

3. Metodología

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en tres etapas generales como se observa en la Figura 3.

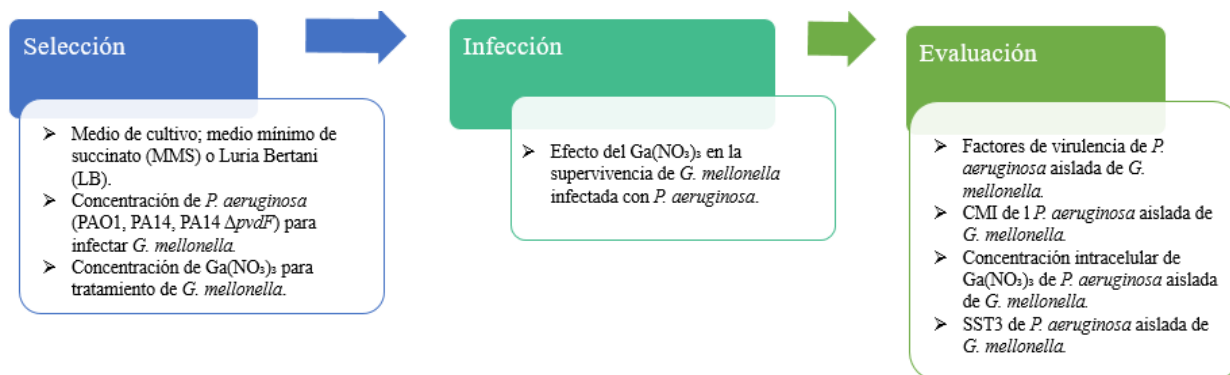


Figura 3. Esquema de la metodología desarrollada.

3.1 Selección de condiciones de cultivo e infección

Para la presente investigación, se emplearon tres cepas de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) descritas en la Tabla 1, las cuales pertenecen al cepario del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de México.

Tabla 1.

Cepas bacterianas de P. aeruginosa usadas en la presente investigación.

Cepa	Descripción	Referencia
PAO1	Cepa referencia. Aislado clínico de herida.	(Klockgether, et al., 2010)
PA14	Cepa referencia. Aislado clínico de quemadura.	(Liberati, et al., 2005)
PA14 $\Delta pvdF$	Mutante por transposición de la cepa PA14 en el gen <i>pvdF</i> (pioverdina) con resistencia a gentamicina (15 $\mu\text{g/ml}$).	(Liberati, et al., 2005)

Las cepas fueron reactivadas de criopreservación (-70 °C) en cajas de Petri con medio LB-agar (Apéndice A) incubadas por 24 h a 37 °C. Se usaron para seleccionar el medio de cultivo y la concentración de bacterias. El $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ se disolvió en agua ultra pura (Mili-Q), se esterilizó por filtración (filtros con poros de 0.22 μm) y se almacenó a -20 °C.

3.1.1 Medio de cultivo. Se realizaron precultivos en 5 ml de medio mínimo de succinato (MMS) y medio Luria Bertani (LB) (Apéndice A) en matraces Erlenmeyer de 50 ml (por triplicado), a 37 °C y 200 rpm durante 12-16 h. La concentración celular se midió con la densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600nm}$) en un espectrofotómetro (UV-VIS Spectrophotometer, Científica Vela Quin, México).

Para seleccionar el medio de cultivo adecuado para el desarrollo de este proyecto se determinó el crecimiento celular, los factores de virulencia y la concentración mínima inhibitoria (CMI) en cultivos inoculados a partir de los precultivos antes mencionados; también se determinó la concentración de hierro en los medios de cultivo.

3.1.1.1 Curva de crecimiento. A partir de los precultivos se iniciaron cultivos de 5 ml en matraces de 50 ml con un $D.O_{600nm}$ inicial de 0.05 a 37 °C y 200 rpm por 24 h; el crecimiento celular se midió con la $D.O_{600nm}$ medida en diferentes tiempos de incubación.

3.1.1.2 Factores de virulencia. Los factores de virulencia medidos fueron pioverdina, piocianina, elastasa y proteasa alcalina a lo largo del tiempo de cultivo. Para determinar estos factores, se tomó 1 ml de los cultivos y se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min. Para cuantificar la pioverdina y la piocianina se realizó una extracción con cloroformo del sobrenadante, la fase acuosa contenía pioverdina y la fase orgánica la piocianina. Para cuantificar la elastasa y la proteasa alcalina se utilizaron técnicas colorimétricas, donde el sustrato de cada proteasa estaba asociado a un colorante y por su acción enzimática fueron liberados (rojo congo y azul de remazol, para elastasa y proteasa respectivamente). En el Apéndice B se explica detalladamente la determinación de cada uno de los factores.

3.1.1.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de nitrato de galio ($Ga(NO_3)_3$). Se iniciaron cultivos en 2 ml de cultivo (LB y MMS) con una D.O._{600nm} de 0.05, en tubos de ensayo a diferentes concentraciones de $Ga(NO_3)_3$ (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 μM) por 24h a 37 °C y 200 rpm, al final del cultivo se midió la D.O._{600nm} en un espectrofotómetro. El valor de CMI fue la concentración de $Ga(NO_3)_3$ a partir de la cual ya no se observó crecimiento a las 24 h.

3.1.1.4 Concentración de hierro en los medios de cultivo. Se tomaron 5 ml de medio de cultivo estéril sin bacterias (LB y MMS) y se digirieron con una solución de ácido nítrico al 16% a 95 °C por una hora (1:1), para liberar los metales presentes en el medio, después se utilizó un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (PerkinElmer Optima 8300 ICP-OES, Shelton, CT, U.S.A) (Apéndice C).

3.1.2 Selección de la concentración de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 Δ pvdF). En este proyecto se utilizó *G. mellonella* como modelo para la evaluación de la generación de resistencia de *P. aeruginosa*, ya que este modelo no presenta muchas variables fisiológicas como las que podrían presentarse en mamíferos más avanzados, además tiene algunas ventajas como su tiempo de generación que es de 30 - 45 días, su fácil manejo, el bajo costo y que no requiere consideraciones éticas para su uso (Papaioannou, et al., 2013).

Se prepararon cultivos de las cepas en medio MMS a 37 °C y 200 rpm por 12-16 h y se realizaron diluciones seriadas (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) en NaCl estéril (9 g/L), posteriormente con una jeringa de insulina estéril se inyectó 20 μ l de estas diluciones en el último par de propatas de cada larva de *G. mellonella* (grupo de 5 por triplicado) (Figura 4). Como control se inyectó 20 μ l de NaCl estéril (9 g/L). Las larvas para este experimento debían tener un color claro y medir entre 2 y 3 cm de largo (Harding, et al., 2013). Seguido de la inoculación, las larvas se incubaron a 37 °C dentro de cajas Petri estériles (Figura 4), llevándose un conteo diario del número de larvas vivas durante 5 días.



Figura 4. Larvas de *G. mellonella* **A.** Inmovilización de la larva. **B.** Inserción de la aguja para la inoculación (Burgwyn Fuchs, et al., 2010) **C.** Larvas inoculadas.

La concentración de bacterias óptima para realizar esta investigación era la que causara un porcentaje de supervivencia medio, es decir que sobreviviera al menos el 50% de larvas infectadas.

3.1.3 Selección de la concentración de nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$). Se prepararon diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en NaCl estéril (9 g/L) (10, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 μM). Posteriormente, se inyectó con una jeringa de insulina estéril 20 μl en el último par de propatas de cada concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a grupos de 5 larvas (por triplicado) de *G. mellonella* y se incubaron a 37 °C en cajas de Petri estériles por 5 días, haciendo conteo diario de las larvas vivas para calcular el porcentaje de supervivencia. Como control se inyectó 20 μl de NaCl estéril (9 g/L). Las larvas que se usaron para este experimento eran de color claro y medían entre 2 y 3 cm (Harding, et al., 2013). La concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ recomendable para el desarrollo de la presente investigación fue aquella que no causara ningún efecto negativo en la larva.

3.2 Infección de *G. mellonella*

Se hicieron diluciones seriadas en NaCl estéril (9 g/L) de precultivos de las cepas en MMS hasta llegar a la dilución seleccionada. Se inocularon con una jeringa de insulina 20 μl de esta dilución en el último par de propatas de cada larva (grupo de 5 larvas por triplicado) y 5 min después se inyectaron estas mismas larvas con 20 μl de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 1 mM en el mismo sitio de infección; como control se inyectaron 20 μl de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ estéril ó 20 μl de NaCl estéril (9 g/L) a un grupo de 5 larvas (por triplicado) y 20 μl de la dilución de bacterias seleccionada a otro grupo de 5 larvas (por triplicado). Se incubaron a 37 °C en cajas de Petri estériles durante 5 días, contando cada 24 h post-inyección las larvas vivas para realizar las curvas de supervivencia.

La recolección de hemolinfa se realizó a las 24 h post-inyección de las larvas muertas. Con una jeringa de insulina estéril se tomaron 3 µl de hemolinfa (del sitio donde se infectó) y se inocularon en cajas Petri con medio LB-agar a 37 °C por 24 h, las cuales se utilizaron para preparar precultivos en las mismas condiciones y volver a inyectar un grupo de 5 larvas (por triplicado), teniendo los mismos controles antes descritos e incubándolas a las mismas condiciones. Este procedimiento se realizó secuencialmente 6 veces en las mismas condiciones. La secuencia cero (S_0) se refiere a la primera vez que se infectó la larva con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y la secuencia cinco (S_5), a la sexta y última vez que se infectó al modelo con las cepas aisladas de la anterior secuencia con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

3.3 Evaluación de resistencia

La resistencia se evaluó según el cambio de la CMI entre las cepas aisladas de *G. mellonella* de cada secuencia y las cepas silvestres; se tuvo en cuenta la producción de los factores de virulencia, la concentración intracelular de galio y la concentración de células letales.

3.3.1 Concentración letal de bacterias. Con una jeringa de insulina se tomaron 3 µl de hemolinfa de las larvas muertas 24 h post-inyección para hacer diluciones seriadas en NaCl estéril (9 g/L), posteriormente se sembraron en placas LB-agar y se determinó el número de células letales (UFC). Por otra parte, con una jeringa de insulina se tomaron 3 µl de hemolinfa de las larvas muertas (24 h post-inyección), se inocularon en cajas de Petri con medio LB-agar a 37 °C durante 24 h para preparar precultivos y medir la producción de los factores de virulencia, la concentración intracelular de galio y preparar los cultivos con diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (0, 10, 25, 50, 100 y 200 µM) para determinar la CMI.

3.3.2 Factores de virulencia de *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella*. Los factores de virulencia se midieron para compararlos con los observados en las cepas silvestres y en las cepas aisladas de cada secuencia y así poder observar su relación con la virulencia y conocer el efecto del $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Se midieron todos los factores de virulencia mencionados anteriormente: pioverdina, piocianina, elastasa y proteasa alcalina siguiendo los protocolos detallados en el Apéndice B.

3.3.3 CMI de *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella*. El cálculo de la CMI de las cepas que se aislaron de *G. mellonella* se determinó como ya antes se mencionó (sección 3.1.1.3) a partir de precultivos y se utilizaron para compararlos con las CMI de las cepas silvestres y de esta forma determinar si hubo generación de resistencia.

3.3.4 Concentración intracelular de galio de *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella*. Las cepas aisladas de *G. mellonella* y las cepas silvestres, se cultivaron en 5 ml de MMS a 37 °C y 200 rpm por 12-16 h para iniciar un cultivo con D.O._{600nm} inicial de 0.05 con una concentración de Ga(NO₃)₃ de 10 µM, incubadas a 37 °C y 200 rpm por 24 h.

Se midió el crecimiento (D.O._{600nm}) y se hicieron diluciones seriadas en NaCl estéril (9 g/L) para calcular las UFC. Se tomó 1 ml de estos cultivos, se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min, separando el sobrenadante de la pastilla celular. El sobrenadante se digirió con ácido nítrico al 16% a 95 °C por 1 h (1:1). Las pastillas celulares se lavaron dos veces con amortiguador de pH, lavado 1: Tris 20 mM pH=8 y lavado 2: Tris 20 mM-EGTA 2 mM, y se digirieron en ácido nítrico al 70% a 95 °C por 2 h. Los lavados se digirieron de la misma forma que el sobrenadante. La concentración intracelular y extracelular de galio se determinó usando un espectro de emisión óptica (Optima 8300, PerkinElmer) (Apéndice C). Las concentraciones de galio se midieron para saber si las cepas aisladas de *G. mellonella* internalizaban galio, usando como control las cepas silvestres.

3.3.5 SST3 de *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella*. Mediante inmunodetección tipo Western Blot se comparó la secreción de proteínas de virulencia (efectores) a través del SST3 de cepas de *P. aeruginosa* en cultivos *in vitro* de bacterias aisladas del modelo *in vivo* como se explica en el Apéndice E. Este ensayo se realizó para conocer si la secreción de efectores era el causante del aumento de virulencia en la cepa PAO1 que pasó 6 veces por la larva con Ga(NO₃)₃.

3.3.6 Control de experimentos *in vitro*. Se hicieron cultivos en 5 ml de MMS en matraces de 50 ml de las cepas silvestres con una D.O._{600nm} inicial de 0.05 y con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 50 μM a 37 °C y 200 rpm por 24 h. Estos cultivos se usaron para hacer el mismo número de secuencias que se realizaron con las larvas y de la misma forma, es decir, 24 h después de iniciado el cultivo se aislaron cepas en placas LB-agar y se incubaron a 37 °C por 24 h, posteriormente se utilizaron para preparar precultivos e inocular un nuevo cultivo en las mismas condiciones que se mencionaron antes; esto se repitió 6 veces de la misma forma que con las larvas; con el fin de comparar la generación de resistencia (CMI) y la concentración intracelular y extracelular de galio entre las cepas aisladas de *G. mellonella* e *in vitro* y ver si había algún cambio significativo.

4. Resultados

4.1 Selección de condiciones de cultivo e infección

4.1.1 Medio de cultivo. En la Tabla 2 se observa que las cepas cultivadas en medio LB crecen más que las cepas cultivadas en medio MMS, lo que se debe a que el medio LB es un medio rico en nutrientes a diferencia del MMS. También se observa que en medio LB producen mayor cantidad de piocianina, elastasa y proteasa que en MMS, ya que cuenta con la cantidad de sustrato suficiente para producirlos a diferencia del MMS que solo tiene como fuente de carbono el succinato. Cabe mencionar que estos factores en este caso no son producidos para infectar a células del huésped, sino que son producidos para la supervivencia de la bacteria.

Sin embargo, las cepas cultivadas en MMS producen mayor cantidad del sideróforo fluorescente pioverdina (Figura 5), lo que se debe a la deficiencia de hierro de este medio, que, al no ser percibido por las bacterias, estas aumentan la producción de sideróforos para aumentar la probabilidad de captar hierro, mientras que en LB este metal no es limitante; además, las cepas cultivadas en LB necesitan mayor cantidad de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ para ser inhibidas que las cepas cultivadas en MMS.

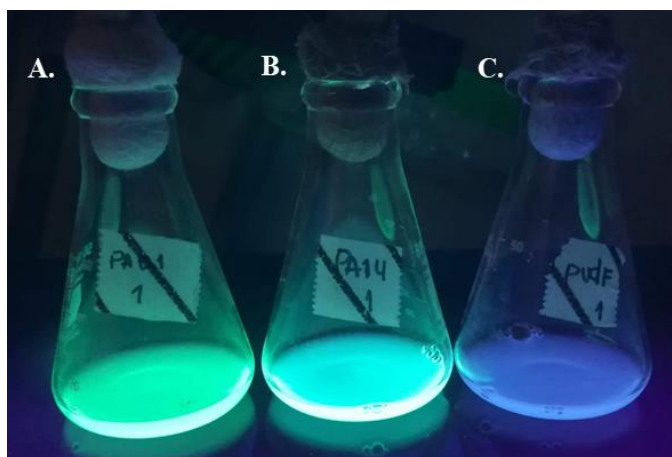


Figura 5. Fotografía de *P. aeruginosa* A. PAO1, B. PA14 y C. PA14 $\Delta pvdF$ en MMS vistas con luz UV.

Con base en los datos observados en la Tabla 2, se seleccionó el medio de cultivo MMS, en el cual *P. aeruginosa* está activa, es decir que crece y produce factores acordes a su crecimiento, además tiene baja concentración de hierro la cual favorece la actividad antibiótica del $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, demostrado en las CMI de *P. aeruginosa* cultivada en este medio. Estos resultados concuerdan con los publicados por Rezzoagli y colaboradores (2018), los cuales comprueban que la baja concentración de hierro favorece la actividad del galio (Rezzoagli, et al., 2018).

Tabla 2.

Comparación de los factores de virulencia de PAO1, PA14 y PA14 Δ pvdF en los medios LB y MMS. (Promedio $\pm$ error típico, n=3). (Apéndice G).

PARAMETROS	LB			MMS		
	PA01	PA14	PA14 Δ pvdF	PA01	PA14	PA14 Δ pvdF
D.O. (600 nm)	1.9 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.23	1.5 $\pm$ 0.09	1.35 $\pm$ 0.16	1.003 $\pm$ 0.11	0.88 $\pm$ 0.09
Pioverdina (407 nm)	0.52 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.005	0.21 $\pm$ 0.02	2 $\pm$ 0.26	2.22 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.01
Piociánina (520 nm)	0.03 $\pm$ 0.001	0.5 $\pm$ 0.07	0.4 $\pm$ 0.004	0.04 $\pm$ 0.004	0.04 $\pm$ 0.003	0.01 $\pm$ 0.002
Elastasa (495 nm)	0.17 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02	0.006 $\pm$ 0.004	0.02 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.007
Proteasa (595 nm)	0.18 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.003	0.00 $\pm$ 0.004	0.01 $\pm$ 0.002
CMI (600 nm)	500 μ M	500 μ M	500 μ M	50 μ M	50 μ M	10 μ M
Concentración de Fe³⁺	12.033 $\pm$ 4.92 μ M			1.931 $\pm$ 0.7 μ M		

4.1.2 Selección de la concentración de células en MMS para infectar *G. mellonella*. En la Figura 6 se muestra la supervivencia de las larvas a lo largo de 5 días, después de haber sido infectadas con 20 μ l de diferentes diluciones de los cultivos (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}), las cuales corresponden a una inoculación con 12 $\pm$ 2 UFC para PAO1, 3 $\pm$ 1 UFC para PAO1 y 6 $\pm$ 2 UFC para PA14 Δ pvdF. Se tuvo como control la inyección de la misma cantidad de NaCl estéril (9 g/L).

En esta figura se observa que la mortalidad media para cada una de las cepas fue cuando se inyectaron con la dilución 10^{-7} . La prueba de Kaplan-Meier $p < 0.05$ indica que la comparación entre dos diluciones es significativamente diferente (Apéndice F).

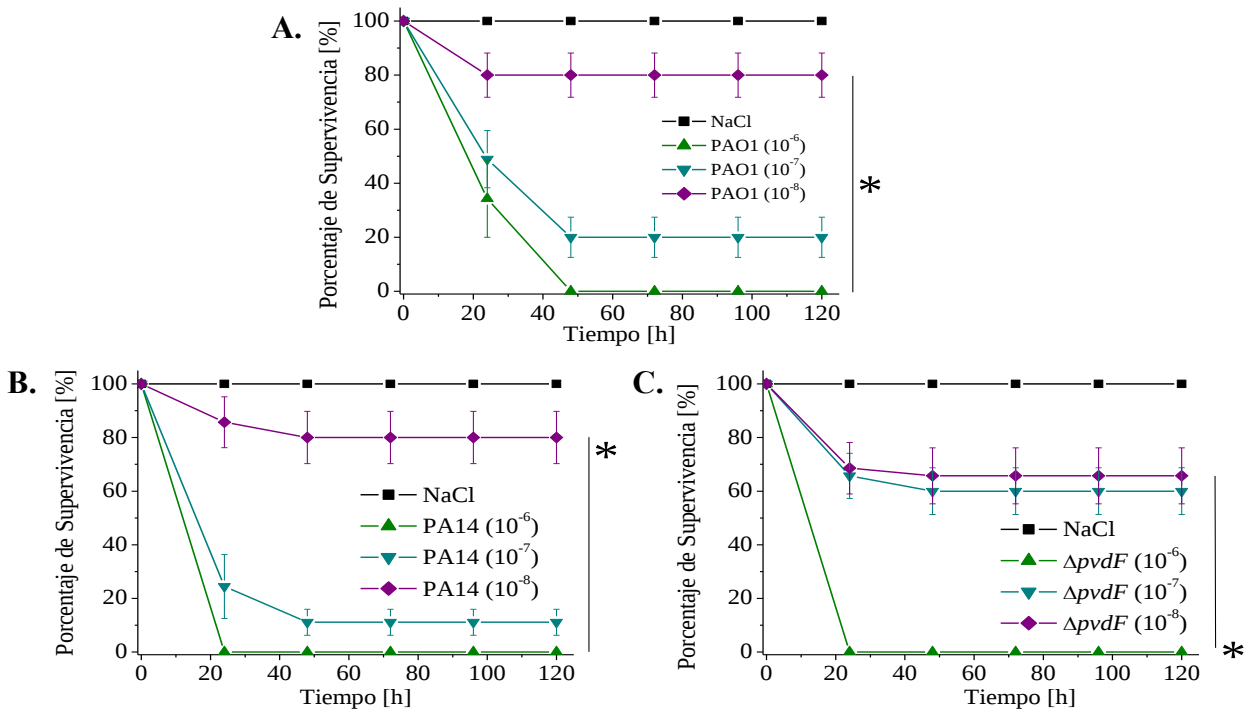


Figura 6. Curva de supervivencia de *G. mellonella* infectada con diferentes concentraciones de *P. aeruginosa* (diluciones: 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) en MMS A. PAO1, B. PA14 y C. PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$). (Promedio $\pm$ error típico, n=3, *Kaplan-Meier p<0.05).

4.1.3 Selección de la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. El efecto del $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en *G. mellonella* se evaluó administrando a las larvas diferentes concentraciones de este antibiótico (10 - 1000 μM); para todas las concentraciones evaluadas se observó una supervivencia del 100%, por lo que se seleccionó la concentración máxima a la que fue expuesto dicho modelo (1 mM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$).

4.2 Infección de larvas

En la Figura 7 se compara la supervivencia al inicio y al final de las secuencias, es decir la S_0 y la S_5 , teniendo en cuenta los controles (1 mM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaCl estéril (9 g/L)). En esta figura se

observa que la supervivencia de las larvas infectadas con PAO1 no cambia a lo largo de las secuencias, lo que indica que el comportamiento de la bacteria no cambia al pasar por la larva, mientras que cuando se infectaron las larvas con PAO1 en presencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, la supervivencia disminuyó el 40%, es decir que la cepa reinoculada 6 veces en presencia de galio es más virulenta que la cepa sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (Figura 7. A).

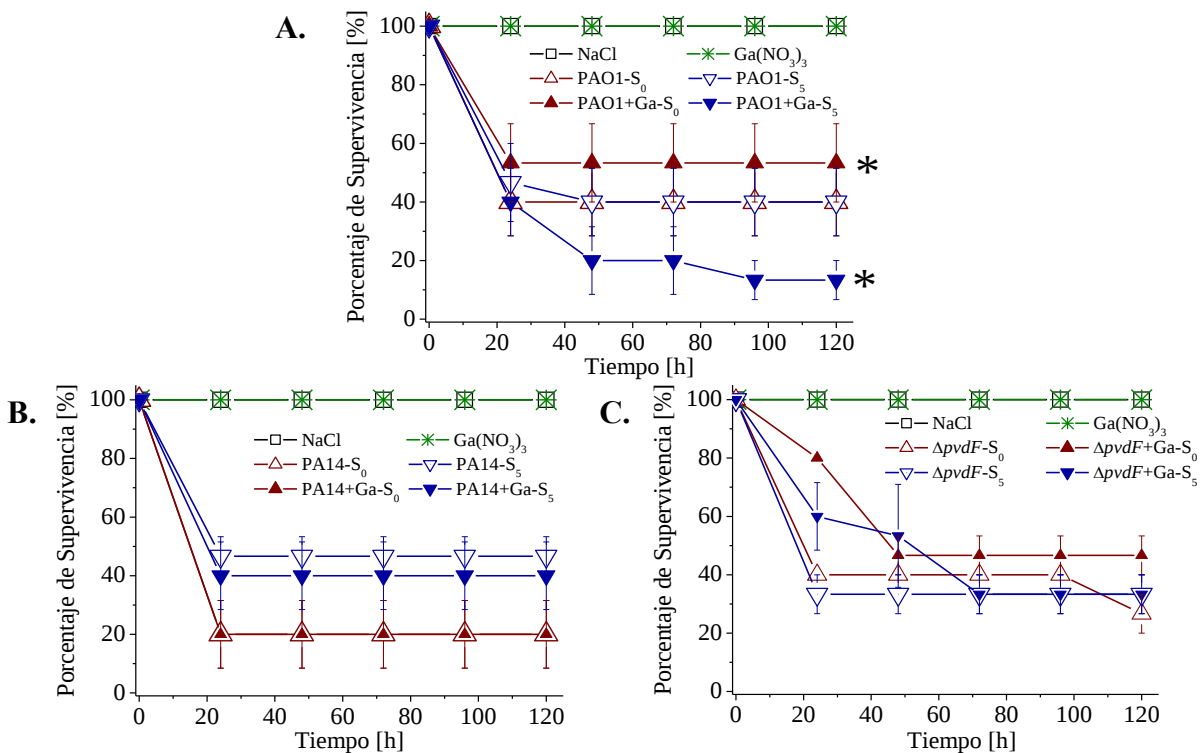


Figura 7. Curva de supervivencia de *G. mellonella* infectada con **A.** PAO1, **B.** PA14 y **C.** PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) en MMS. (Promedio $\pm$ error típico, n=3, *Kaplan-Meier $p < 0.05$).

En la Figura 7.B se muestra la supervivencia de las larvas infectadas con la cepa PA14, donde se observa que en la primera secuencia la supervivencia es la misma en las dos condiciones (con y sin tratamiento), es decir que el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ no causa ningún efecto contra PA14, sin embargo, se

observa que PA14 se vuelve más sensible al finalizar las secuencias, ya que la supervivencia de las larvas infectadas con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ aumenta.

En la Figura 7.C se observa que el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ no tiene ningún efecto significativo en la supervivencia de las larvas infectadas con PA14 $\Delta pvdF$; además, tampoco hay un cambio estadísticamente significativo en la supervivencia de las larvas entre la secuencia inicial y la secuencia final.

Con base en los datos obtenidos, la supervivencia de las larvas infectadas con PAO1 es menor con respecto a las otras dos cepas (PA14 y PA14 $\Delta pvdF$), al final de las secuencias, lo que podría ser causado por la generación de resistencia a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ o el aumento de la virulencia.

4.3 Evaluación de resistencia

Después de obtener los resultados en la supervivencia de *G. mellonella* expuesta a PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ con y sin tratamiento se procedió a evaluar la resistencia de las cepas aisladas de las larvas muertas 24 h post-inyección (Figura 8), con el fin de visualizar si se produjo algún cambio en el sistema de las cepas después de haber sido expuestas a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

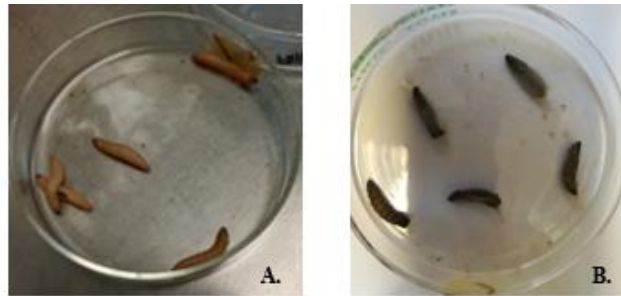


Figura 8. Larvas de *G. mellonella*, melanización como respuesta inmune a la infección. **A.** Larvas vivas y **B.** Larvas muertas.

4.3.1 Concentración de células letales. En la Figura 9 se observa que en la última secuencia es menor el número de bacterias necesarias para matar a las larvas, sobre todo en las secuencias con presencia de galio, lo que puede ser causado por un aumento en la virulencia. En el Apéndice H se puede apreciar mejor el comportamiento de las UFC's en el transcurso de las secuencias.

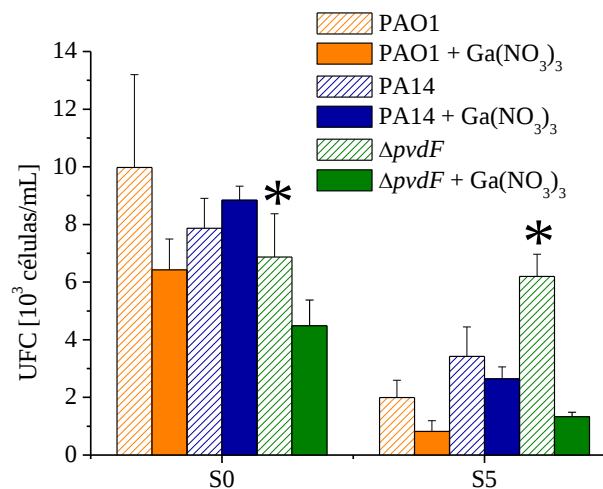


Figura 9. UFC de cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ aisladas de hemolinfa de *G. mellonella* después de 1 y 5 pases a través del modelo *in vivo*. (Promedio $\pm$ error típico, $n=3$, *Mann-Whitney $p>0.05$).

4.3.2 Factores de virulencia de las células aisladas de *Galleria mellonella*. La Figura 10 muestra la cantidad de pioverdina producida por las células de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ aisladas de *Galleria mellonella* después de la S₀ y S₅.

La cepa PAO1 aislada de la S₅ con y sin Ga(NO₃)₃ muestra una leve disminución en la producción de pioverdina en comparación con la silvestre, sin embargo, no es estadísticamente significativa (Mann-Whitney $p > 0.05$). Por lo que la producción de este factor de virulencia no explica los cambios observados en la supervivencia de las larvas para la cepa PAO1. Las cepas PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ tienen un comportamiento similar, es decir que la producción de pioverdina no varía significativamente entre las secuencias con y sin tratamiento con respecto a la silvestre (Figura 10). La producción de este factor de virulencia a lo largo de las secuencias se puede ver en el Apéndice I.

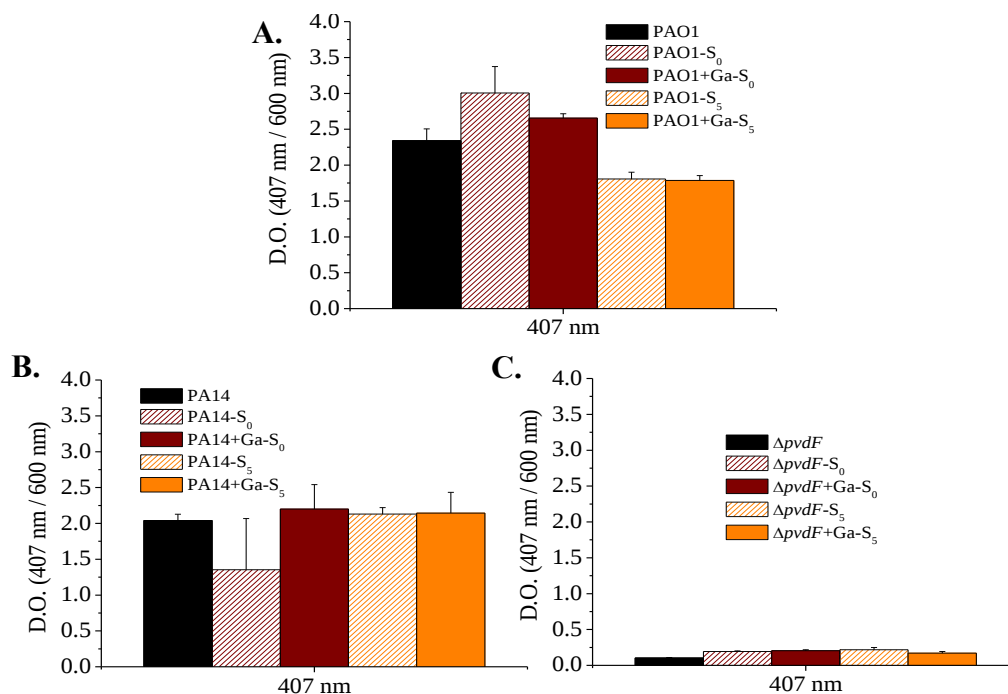


Figura 10. Producción de pioverdina en MMS de cepas **A.** PAO1, **B.** PA14 y **C.** PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ aisladas de *G. mellonella* después de 6 pases a través del modelo *in vivo*. (Promedio $\pm$ error típico, $n=3$, Mann-Whitney $p>0.05$).

También se midió la producción de piocianina, elastasa y proteasa alcalina de las cepas aisladas del modelo y no se observó variación significativa en la producción de estos factores de virulencia entre la primera y la última secuencia y en el transcurso de las secuencias con respecto a la silvestre (Apéndice I).

4.3.3 CMI de *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella*. Las CMI de *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella* al final de las secuencias S₀ y S₅ con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y de la cepa silvestre, se ven en la Tabla 3.

PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ no muestran un cambio en la CMI, es decir que no generan resistencia a este antibiótico cuando pasan por el modelo vivo.

Tabla 3.

Concentración mínima inhibitoria de células aisladas de G. mellonella con PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ con y sin $Ga(NO_3)_3$ en MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n=3$, Mann-Whitney $p>0.05$).

CEPA	CMI				
	WT	S ₀	S ₀ + Ga(NO ₃) ₃	S ₅	S ₅ + Ga(NO ₃) ₃
PAO1	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M
PA14	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M
PA14 $\Delta pvdF$	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M

Otras investigaciones también reportan que en tratamientos *in vivo* la frecuencia en generación de resistencia a galio es muy baja (Rezzoagli, et al., 2018; Goss, et al., 2018; Frangipani, et al., 2004; Gugla, et al., 2019).

4.3.4 Concentración intracelular de galio en *P. aeruginosa* aislada de *G. mellonella*. La

Figura 11 muestra la concentración intracelular y extracelular de galio de las cepas aisladas de *G. mellonella* comparadas con la cepa silvestre.

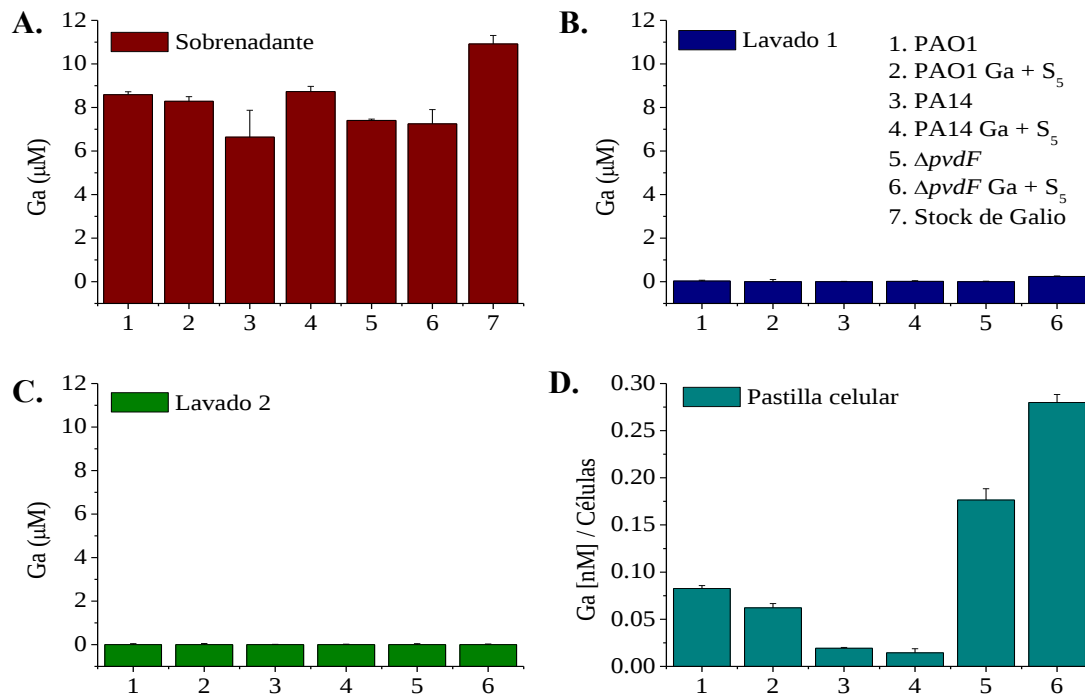


Figura 11. Concentración intracelular y extracelular de galio de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) silvestre y aislada en la secuencia 5 de *G. mellonella* con 10 μM $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n=3$).

En esta figura se observa que PAO1 y PA14 silvestres y aisladas de *G. mellonella* internalizan la misma cantidad de galio; en cambio PA14 $\Delta pvdF$ internaliza más galio después de haber pasado 6 veces por *G. mellonella* en presencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ que la cepa silvestre, esto se debe probablemente a que al ser una mutante de pioverdina y no producir este factor de virulencia, el galio no estaría secuestrando nada, por lo que aumentaría la probabilidad de entrar a la célula de forma independiente por el sistema HitAB (García-Contreras, et al., 2014), mientras que PAO1 y PA14 si producen pioverdina, la cual es secuestrada por el galio limitando la cantidad de galio libre para entrar a la célula, ya que este al no poder reducirse no puede desprenderse de la pioverdina (Goss, et al., 2018). Estos resultados también indican que la entrada de galio no necesariamente

fomenta la resistencia en las cepas, ya que como se mostró anteriormente, ninguna de las cepas aisladas de *G. mellonella* generó resistencia a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

Los resultados anteriores muestran que PAO1 provoca disminución de la supervivencia, pero esto no se debe a que esta genere resistencia o aumente la producción de sus factores de virulencia, por lo cual se realizaron ensayos del SST3, sistema causante de alta virulencia en *P. aeruginosa*, por su inyección directa de toxinas a la célula eucariota. Los resultados se muestran a continuación:

4.3.5 SST3 de PAO1 aislada de *G. mellonella*. Ensayos preliminares del SST3 muestran que las bacterias aisladas después de pasar 6 veces por *G. mellonella* tratadas con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ secretan mayor cantidad del efector ExoS que las células aisladas después de pasar una vez por la larva con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y que la cepa silvestre sin tratamiento, por lo que posiblemente el incremento en la virulencia de PAO1 se deba a que esta cepa tiene el SST3 más activo después de haber pasado 6 veces por el modelo *in vivo* (Figura 12).

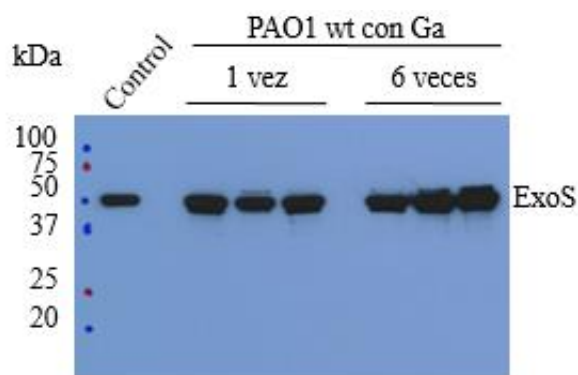


Figura 12. Ensayo de SST3 de células de PAO1 aisladas de *G. mellonella* después de 5 pases con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

4.3.6 Control de experimentos *in vitro*. La Tabla 4 muestra la CMI de *P. aeruginosa* aisladas de *G. mellonella*, *in vitro* y de las cepas silvestres. En esta tabla se observa que las cepas de PAO1 y PA14 aisladas de la última secuencia *in vitro* con un procedimiento similar al tratamiento *in vivo* generan resistencia a pesar de estar sometidas a menor concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (50 μM).

Tabla 4.

Concentración mínima inhibitoria de cepas silvestres y aisladas in vivo e in vitro (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n=3$, Mann-Whitney ($p>0.05$)). (Apéndice J).

CEPA	CMI		
	WT	<i>In vivo</i> S ₅ + $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$	<i>In vitro</i> S ₅ + $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$
PAO1	50 μM	50 μM	100 μM
PA14	50 μM	50 μM	100 μM
PA14 $\Delta pvdF$	10 μM^*	10 μM^*	10 μM^*

Por otra parte, las cepas aisladas del tratamiento *in vitro* internalizan mas galio (Apéndice K).

5. Conclusiones

Se comprobó que el MMS era el mejor medio de cultivo para llevar a cabo los experimentos, por su baja concentración de hierro, permitiendo que el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ inhibiera el crecimiento de las cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ a concentraciones bajas, ya que interrumpió la obtención del hierro fomentando la producción de pioverdina.

El $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ no causo efectos negativos en el modelo *in vivo* *G. mellonella*, y también mostró un efecto terapéutico en las larvas infectadas con PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ en las primeras secuencias. Sin embargo, a lo largo de las secuencias disminuye la cantidad de bacterias letales,

mostrando que las cepas se volvían más virulentas. Pero la producción de factores de virulencia no se modifica por la infección en el modelo *in vivo* ni por el tratamiento con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y las cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ no generan resistencia $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en el modelo *in vivo*.

La disminución de la supervivencia de las larvas infectadas con PAO1 en presencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ no se debió a la generación de resistencia ni al cambio de la producción de los factores de virulencia, sino que fue causada por la secreción del efector ExoS, lo que indica que esta cepa tiene el SST3 activo.

El $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ inhibe el crecimiento de PA14 en *G. mellonella*, aumentando el porcentaje de supervivencia, lo cual confirma su uso como antibiótico.

La cepa PA14 $\Delta pvdF$ en presencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ disminuye la supervivencia de las larvas, sin embargo, no es estadísticamente significativa y no genera resistencia ni aumenta la producción de los factores de virulencia, pero si internaliza más galio que las otras dos cepas, ya que a diferencia de estas no cuenta con el sideróforo, pioverdina, quien impide que el galio se internalice porque no puede ser liberado debido a que no se puede reducir.

Las cepas que fueron cultivadas *in vitro* generaron resistencia a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a diferencia de las cepas que pasaron por *G. mellonella*, debido a que el sistema *in vitro* es un sistema cerrado, mientras que el *in vivo* es un sistema abierto.

6. Recomendaciones

Evaluar la virulencia generada por el SST3 en las células aisladas de las cepas PA14 y PA14 $\Delta pvdF$, también evaluar la secreción de efectores por el SST3 en las cepas aisladas del experimento *in vitro* ya que estudios preliminares mostraron que el $Ga(NO_3)_3$ puede inhibir el SST3.

Aumentar el número de secuencias para evaluar si la generación de resistencia es dependiente del número de secuencias (Gugla, et al., 2019).

Realizar la infección y los pases secuenciales siempre en las mismas condiciones, es decir, en el mismo medio de cultivo y siempre en presencia de galio, con el fin de saber si el mantenerlas siempre en presencia de galio aumenta la presión de selección para la formación de cepas resistentes.

Estandarizar técnicas para cuantificar la CMI, los factores de virulencia, la concentración intracelular y extracelular de galio, entre otros, directamente de las larvas, usando algún compuesto para que la hemolinfa no se melanice (Papaioannou, et al., 2013).

Referencias Bibliográficas

- Aguayo, C. M., & Lora, M. E. (s.f.). Cómo hacer “paso a paso” un Análisis de Supervivencia con SPSS para Windows. *Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en salud*, 1-11.
- Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A., & Abdallah, M. A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry*, 33(26), 6391-6402.
- Amábile-Cuevas, C. F. (2010). Antibiotic resistance in México: a brief overview of the current status and its causes. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(3), 126-131.
- Arivett, B. A., Fiester, S. E., Ohneck, E. J., Penwell, W. F., Kaufman, C. M., Relich, R. F., & Actis, L. A. (2015). Antimicrobial activity of gallium protoporphyrin IX against *Acinetobacter baumannii* strains displaying different antibiotic resistance phenotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59, 7657-7665.
- Bmbelli, P., Howe, C. J., & Bertocchini, F. (2017). Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology*, 27, R292-R293.
- Burgwyn Fuchs, B., O'Brien, E., El Khoury, J. B., & Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1(6), 475-482.
- Cabañas-Romero, P. V., & Huerta-Saquero, A. (2014). Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano*, 7(13), 28-36.
- 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, 1-7.
- Das, M. C., Sandho, P., Guptua, P., Rudrapaul, P., De, U. C., Tribdi, P., . . . Bhattacharjee, S. (2016). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Scientific Reports*, 6, 1-13.

- de Léséleuc, L., Harris, G., KuoLee, R., & Chen, W. (2012). *In vitro* and *In vivo* biological activities of iron chelators and gallium nitrate against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(10), 5397-5400.
- DeLeon, K., Balldin, F., Watters, C., Hamood, A., Griswold, J., Sreedharan, S., & Rumbaugh, K. p. (2009). Gallium maltolate treatment eradicates *Pseudomonas aeruginosa* infection in thermally injured mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1331-1337.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1306-1321.
- Elías-Santos, M., Lozano-Contreras, M. G., Maldonado-Blanco, M. G., Castro-Saucedo, M., Meza-García, J. L., & García-Miranda, M. (2006). Introducción de la cría masiva de *Galleria mellonella* para el aislamiento de hongos entomopatógenos y reproducción de nemátodos en la ciudad de Monterrey Nuevo León. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, 479-482.
- Frangipani, E., Bonchi, C., Minandri, F., & Visca, P. (2004). Pyocheline potentiates the inhibitory activity of gallium on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5572-5575.
- García Contreras, R., Gonzáles Tinoco, Y., Porras Hernández, Y. K., Angarita Zapata, V., Florez Duarte, M. P., Perez Eretza, F. B., & Sanchez Torres, V. (2018). El galio como un nuevo antimicrobiano para combatir. *Mensaje Bioquímico*, 42, 103-109.
- García-Contreras, R., Lira-Silva, E., Jasso-Chávez, R., Hernández-González, I. L., Maeda, T., Hashimoto, T., . . . Moreno-Sánchez, R. (2013). Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 574-582.
- García-Contreras, R., Pérez-Eretza, B., Lira-Silva, E., Jasso-Chávez, R., Coria-Jiménez, R., Rangel-Vega, A., . . . Wood, T. K. (2014). Gallium induces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens and Disease*, 70(1), 95-98.
- Goss, C. H., Kaneko, Y., Khuu, L., Anderson, G. D., Ravishankar, S., Aitken, M. L., . . . Singh, P. K. (2018). Gallium disrupts bacterial iron metabolism and has therapeutic effects in mice and humans with lung infections. *Science Translational Medicine*, 10, 1-11.

- Grosso-Becerra, M.-V., González-Valdez, A., Granados-Martínez, M.-J., Morales, E., Servín-González, L., Méndez, J.-L., . . . Soberón-Chávez, G. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 100(23), 9995-10004.
- Gugla, N., Vu, D., Parkins, M. D., & Turner, R. (2019). Specificity in the Susceptibilities of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Six Metal Antimicrobials. *antibiotics*, 8(2), 1-12.
- Harding, C. R., Schroeder, G. N., Collins, J. W., & Gad, F. (2013). *Use of Galleria mellonella as a Model Organism to Study Legionella pneumophila Infection*. doi:10.3791/50964
- Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lymar, S. V., Rowe, J. J., Sun Yoon, S., . . . Ochsner, U. A. (2002). Anaerobic metabolism and *quorum sensing* by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 1425-1443.
- Hill, L., Velli, N., & Coote, P. J. (2014). Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(3), 254-261.
- 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. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 877-888.
- Kim, S.-K., & Lee, J.-H. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 54(2), 71-85.
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., . . . Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *American Society for Microbiology*, 192(4), 113-1121.
- Lawe Davies, O., & Bennett, S. (2017). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 10 de Octubre de 2017, de <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

- Lee, J., & Zhang, L. (2014). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*, 6, 1-16.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., . . . Ausubel, F. M. (2005). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2833-2838.
- Livermore, D. M. (2012). Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean Journal of Internal Medicine*, 27(2), 128-142.
- Lújan Roca, D. Á. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474.
- Meyer, J. M. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107, 319-328.
- Milagro Montero, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona-Departamento de Medicina.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M., & Drenkard, E. (2003). Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71(5), 2404-2413.
- Olakanmi, O., Britigan, B., & Schlesinger, L. S. (2000). Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. *Infection and Immunity*, 68(10), 5619-5627.
- Olakanmi, O., Kesavalu, B., Pasula, R., & Abdalla, M. Y. (2013). Gallium nitrate is efficacious in murine models of tuberculosis and inhibits key bacterial Fe-dependent enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 6074-6080.
- Olson, J. C., & Ohman, D. E. (1992). Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 4140-4147.

- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *AMR Review Paper*.
- Papaioannou, E., Utari, P. D., & Quax, W. J. (2013). Choosing an appropriate infection model to study *quorum sensing* inhibition in *Pseudomonas* infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 19309-19340.
- Pérez-Cano, H. J., & Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista medica MD*, 4(3), 186-191.
- Rangel-Vega, A., Bernstein, L. R., Mandujano-Tinoco, E. A., García-Contreras, S. J., & García-Contreras, R. (2015). Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-8.
- Realpe-Aranda, F. J., Bustillo-Pardey, A. E., & López-Núñez, J. C. (2007). Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nemátodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2), 142-157.
- Rezzoagli, C., Wilson, D., Weigert, M., Wyder, S., & Kümmerli, R. (2018). Probing the evolutionary robustness of two repurposed drugs targeting iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2018(1), 246-259.
- Roskams, J., & Rodgers, L. (2009). *Cold Springs Harbor Protocols*.
- Ross-Gillespie, A., Weigert, M., Brown, S. P., & Kümmerli, R. (2014). Gallium-mediated siderophore quenching as an evolutionarily robust antibacterial treatment. *Evolution, Medicine and Public Health*, 18-29. doi:10.1093/emph/eou003
- Steel, H. C., Theron, A. J., Cockeran, R., Anderson, R., & Feldman, C. (2012). Pathogen -and host- directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1-17.
- Tello, A., Austin, B., & Telfer, T. C. (2012). Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance of public health. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 110-1106.

- Visaggio, D., Pasqua, M., Bonchi, C., Kaefer, V., Visca, P., & Imperi, F. (2015). Cell aggregation promotes pyoverdine-dependent iron uptake and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-11.
- Weigert, M., Ross-Gillespie, A., Leinweber, A., Pessi, G., Brown, S. P., & Kümmerli, R. (2017). Manipulating virulence factor availability can have complex consequences for infections. *Evolutionary Applications*, 10, 91-101.
- Wilke, M. H. (2010). Multiresistant bacteria and current therapy - the economical side of the story. *European journal of medical research*, 15(12), 571-576.

Apéndices

Apéndice A. Medios de Cultivo

Medio mínimo de succinato

Tabla A1.

Receta para preparar un litro de MMS líquido.

Reactivo	Fórmula	Concentración	Peso
Ácido Succínico (Succinato, Fuente de Carbono)	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH	65 mM	7.68 g
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	56 mM	7.72 g
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	1.7 mM	0.20 g
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5 mM	1.00 g
Hidróxido de sodio	NaOH	66 mM	2.64 g
Ajustar el Ph a 7.0 con hidróxido de potasio	KOH	85-95 lentes	

(Albrecht-Gary, et al., 1994)

Medio y placas LB (Luria Bertani)

Líquido (Caldo):

Tabla A2.

Receta para preparar un litro de medio LB líquido.

Reactivo	Fórmula	Concentración o Porcentaje	Peso
Cloruro de Sodio	NaCl	171 mM	10 g

Extracto de levadura	-	0.5%	5 g
Tryptona	-	1%	10 g

(Roskams & Rodgers, 2009)

Para medio sólido se agregan 12 g/L de agar.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120 libras/in² de presión y 125 °C por 15 min.

Apéndice B. Protocolo para medir los factores de virulencia

La producción de los factores de virulencia se cuantificó a partir de precultivos de las cepas silvestres y las cepas aisladas de las larvas muertas. Se tomó 1 ml de muestra y se centrifugaron por 5 min a 13000 rpm en una centrifuga (High speed microcentrifuge, Corning lse, U.S.A.) obteniendo el sobrenadante sin células. El protocolo para medir la producción de estos factores de virulencia se muestra en la Figura B1.

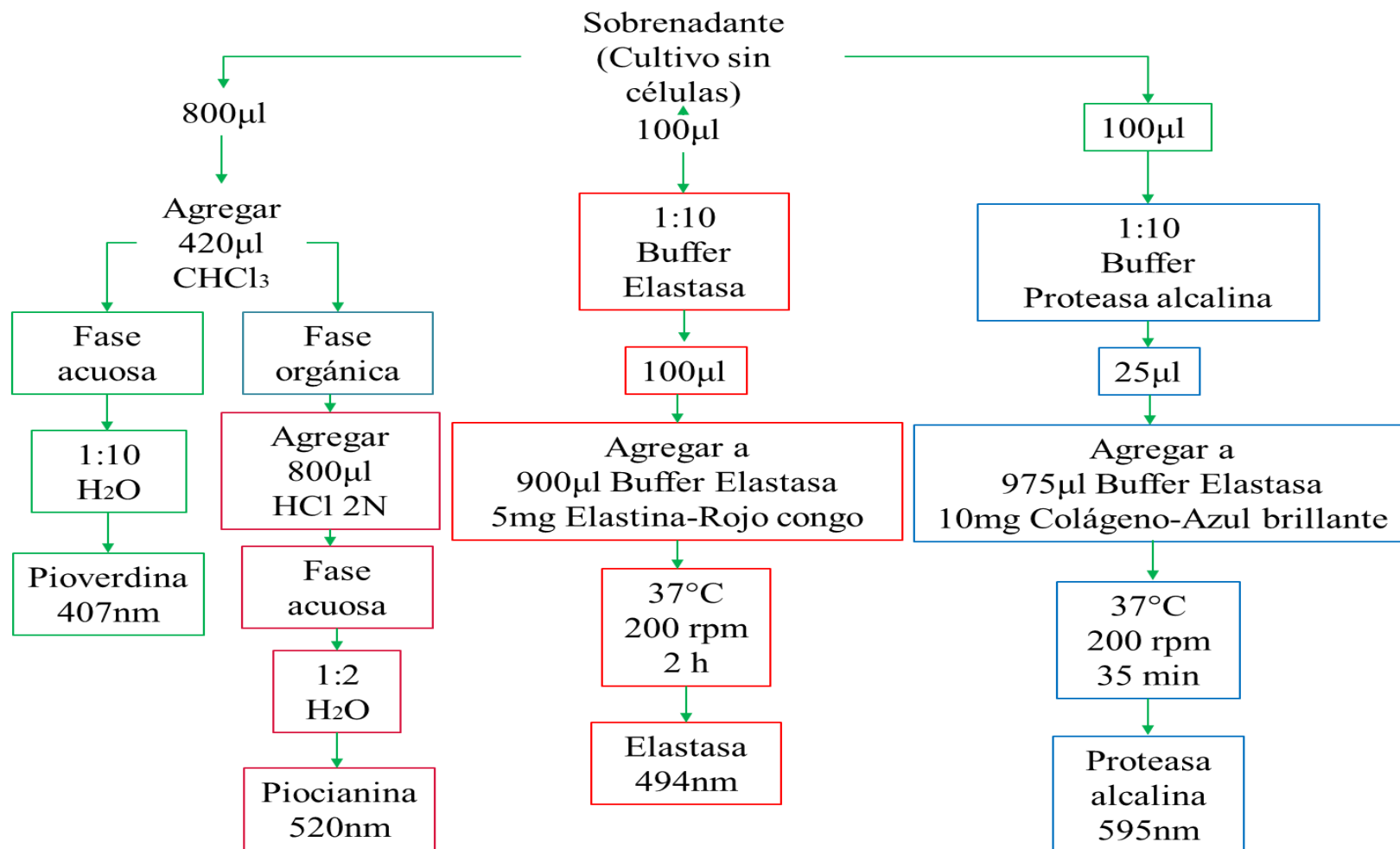


Figura B1. Protocolo para medir la producción de factores de virulencia (pioverdina, piocianina, elastasa y proteasa alcalina).

Apéndice C. Protocolo para medir la concentración intracelular Ga

Para la determinación del Ga se utilizó un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (PerkinElmer Optima 8300 ICP-OES, Shelton, CT, U.S.A).

Se realizaron precultivos de las cepas en medio de cultivo MMS a 37 °C y 200 rpm por 12-16 h.; después de este tiempo se iniciaron cultivos con 10 μ M de Ga(NO₃)₃ y una D.O._{600nm} de 0.05, estos se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 1.5-2.0; al alcanzar esta D.O._{600nm} se tomó el volumen total del cultivo y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C para obtener la pastilla celular. Se separó el sobrenadante de la pastilla celular.

La pastilla celular se lavó dos veces; primero se resuspendió en 3 ml de amortiguador Tris-EGTA a pH 8 y después se centrifugaron durante 3 min a 14000 rpm. Se colectó el sobrenadante para medir Ga (1° lavado) y la pastilla celular se resuspendió en 2mM Tris-HCl y 20 mM EGTA y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante se colectó para medir Ga (2° lavado) y el pellet se guardó para ser procesado mediante digestión ácida.

La preparación de las muestras para la determinación del galio se realizó mediante una digestión ácida del pellet, el sobrenadante y los lavados. Se tomó 1 ml del sobrenadante o lavados y se mezcló con 1 ml de ácido nítrico al 16%, mientras para digerir la pastilla celular se añadió 1 ml de ácido nítrico concentrado (70%). La digestión se llevó a cabo en un digestor thermoblock

(CORNING LSE, USA) donde se calentaron las muestras 95-97 °C durante 1 h. Al enfriarse, las muestras se aforaron a 2.5-5.0 ml con agua Mili-Q.

La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación en una curva patrón preparada con 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 ppm (1 ppm = 40.3166817 μ M de galio) de una solución estándar comercial de Ga para AAS (Atomic Absorption Spectroscopy) (1000 mg/L Ga en ácido nítrico, Sigma-Aldrich, México). La curva de calibración se muestra en la Figura C1.

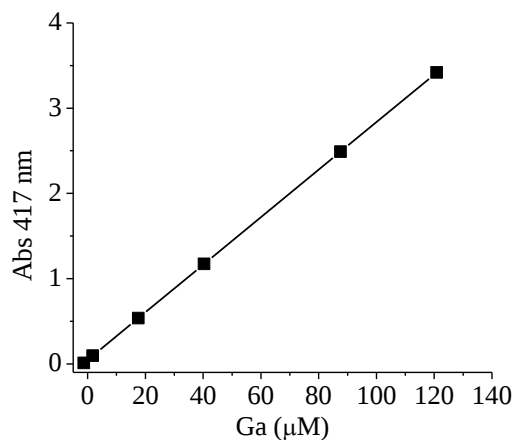


Figura C1. Curva de calibración de galio.

La concentración de hierro en los medios de cultivo se determinó mediante una digestión ácida de los medios de la misma forma que se cuantificó el sobrenadante cuando se cuantificó el galio, usando la curva de calibración de la Figura C2 proporcionada por el Dr Fanis Missirlis del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

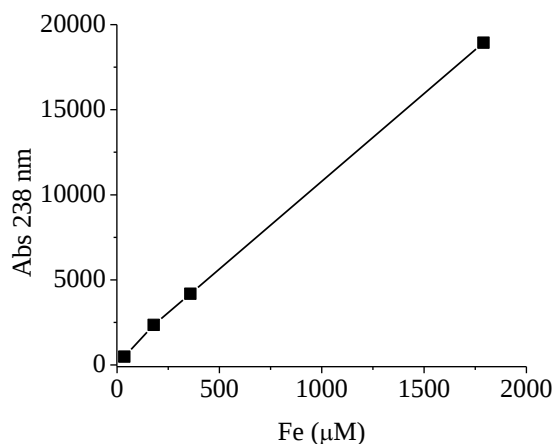


Figura C2. Curva de calibración de hierro.

Apéndice D. Mantenimiento de *G. mellonella*

El modelo para la realización de los experimentos *in vivo* fue la larva de la polilla de cera de nombre científico *Galleria mellonella*.

Este modelo se cultivó en el laboratorio (Huevo, Larva, Pupa y Polilla) (Realpe-Aranda, et al., 2007) a una temperatura de 28-30 °C en botes de plástico con tapa de tela. Su alimento se preparaba utilizando harinas, leche en polvo, levadura, cera de abeja, miel, glicerina y agua (Tabla D1). Se hicieron galletas y se mantuvieron a 4 °C.

Tabla D1.

*Receta para comida de *Galleria mellonella**

Producto	Una porción
Harina de maíz	90 g
Harina de trigo	50 g
Leche en polvo	50 g

Levadura	20 g
Cera de abeja	50 g
Miel	70 ml (50 g)
Agua	50 ml
Glicerina	50 ml
Benzoato de sodio	1.2 g

Para los experimentos se usó en el estado de larva con un volumen aproximado de 200 μ l, es decir con una longitud de 2 a 3 cm, y con un color claro, ya que cuando la larva presentaba una coloración más oscura los resultados variaban.

Apéndice E. Protocolo para evaluar la SST3

1. Ensayo de secreción

El ensayo de secreción consiste en:

Se creció un precultivo a partir de una colonia aislada en 2 ml de medio LB a 37 °C con agitación (250 rpm) por 12-14 horas (Shacker Innova 44, Brunswick Scientific); al día siguiente se inició un cultivo de 4 ml de LB suplementado con 10 mM $MgCl_2$, 0.5 mM $CaCl_2$ y 5 mM EGTA (pH 7.4) (LBCM-EGTA) con una dilución 1:200 del precultivo y se creció a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. (600 nm) de entre 0,8-1,0; al alcanzar esta D.O. se tomaron 2 ml de cultivo y se centrifugaron por 2 min a 14000 rpm a 4 °C (Centrífuga Minispin, Eppendorf), el sobrenadante se traspasó a un tubo para microcentrífuga limpio sin tocar la pastilla celular, ésta se

congeló para posteriormente determinar la cantidad intracelular de proteínas. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 4 °C por 2 min a 14000 rpm para eliminar bacterias restantes y se colectó en un tubo limpio. Las proteínas secretadas al medio extracelular se precipitaron del sobrenadante agregando ácido tricloroacético (TCA) al 10% concentración final (100µl de TCA por cada 1 ml sobrenadante) (Sigma-Aldrich T6399) e incubando la mezcla por 12 horas a 4 °C. La mezcla de sobrenadante y TCA se centrifugó a 14000 rpm por 30 min a 4 °C (Centrífuga 5424 R, Eppendorf), el sobrenadante se extrajo con una punta de micropipeta acoplada a una bomba de vacío cuidando de no tocar la pastilla proteica.

Preparación de muestras para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE): Las pastillas celulares y de proteínas se resuspendieron en amortiguador de carga SDS-PAGE (sample buffer Laemmli), el volumen de amortiguador se normalizó de acuerdo a la D.O. (600 nm) del cultivo al momento de cosechar las células, para la pastilla celular se multiplicó la D.O. (600 nm) por 200 y se añadieron 2 µl del agente reductor β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M3148) para mantener el estado monobásico de las proteínas. Para la pastilla proteica se utilizaron 20 µl para una D.O. (600 nm) de 0,8, las proteínas precipitadas se resuspendieron con ayuda de una micropipeta cuidando de no generar burbujas de aire, el TCA residual se neutralizó añadiendo Tris Saturado para una concentración final de 10% (2 µl).

Los lisados celulares completos y las proteínas secretadas al medio se hirvieron por 5 min, se homogenizaron con ayuda de un vortex por 15 segundos y se centrifugaron, las muestras se cargaron por duplicado en geles de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), 8 µl para los lisados completos y 10 µl para las proteínas secretadas, los geles se corrieron

por 2 horas a 90 V (fuente de poder PowerPac basic, BioRad). Uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie y el otro se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

2. Ensayo de inmunodetección (western blot)

El gel con las muestras a transferir se incubó por 10 min en amortiguador de transferencia (Tris 20 mM, Glicina 150 mM y 20% Metanol) con agitación para eliminar el SDS. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cámara de transferencia semi-seca durante 39 min a 19 V (Trans-Blot SD cell Semi-Dry Transfer, BioRad), una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con solución de leche descremada al 5% en amortiguador salino de Tris pH 7.4 suplementado con detergente Tween-20 al 0,1% (TBS-T) por 12 h a 4 °C con agitación. Las membranas se lavaron con TBS-T por 30 min cambiando el amortiguador cada 10 min y se incubaron por 1 hora a 4 °C con agitación con suero policlonal anti-ExoS diluido 1:5000 en TBS-T; posteriormente la membrana se lavó tres veces con TBS-T cambiando el amortiguador cada 10 min y se incubó por 1 hora a 4 °C con agitación con anticuerpo GAR (Goat anti-Rabbit IgG) diluido 1:10000 en TBS-T; posteriormente se realizaron lavados sucesivos con TBS-T por 30 min cambiando el amortiguador cada 10 min. La membrana se remojó por 5 min en solución quimioluminiscente del kit comercial Immobilon Western de Milipore, se eliminó el exceso de solución y la membrana se colocó entre dos micas plásticas para ponerse en contacto con una hoja de papel fotosensible para radiografías (Carestream MXB Film) dentro de un cassette de impresión y así obtener la autoradiografía por revelado.

Apéndice F. Análisis Estadísticos

El programa de análisis estadístico que se utilizó para realizar estos análisis fue IBM SPSS Statistics 25. Los estándares de significancia estadística de cada prueba se muestran en la Tabla F1. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

Tabla F1.

Valores de significancia de los análisis estadísticos realizados.

Tipo de prueba	Análisis	Significancia
Prueba de normalidad	Shapiro-Wilk	$p > 0.05$
Prueba de homogeneidad de varianzas	Levene	$p > 0.05$
Supervivencia	Kaplan-Meier	$p < 0.05$
Pruebas no paramétricas	Kruskal-Wallis (global)	$p < 0.05$
Pruebas no paramétricas	Mann-Whitney (pares)	$P < 0.05$

Previo al análisis de todos los datos se les aplicaron pruebas para comprobar su normalidad y homogeneidad de varianzas. Si estos supuestos se cumplían se continuó con una prueba paramétrica ANOVA. En caso de que no se cumplieran al menos uno de los supuestos anteriores se procedió a realizar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Si los resultados de la prueba mostraban que era significativa se hicieron pruebas pareadas de U de Mann-Whitney para poder identificar los pares que eran significativamente diferentes (Andy, n.d.; Townend, 2002).

Para los datos de supervivencia se realizaron análisis Kaplan-Meier para ver si existían diferencias significativas entre estos datos (Aguayo & Lora, s.f.).

Apéndice G. Parámetros para seleccionar el medio de cultivo

En la Figura G1, se observa el crecimiento celular de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) a lo largo de 24 h en los medios LB y MMS.

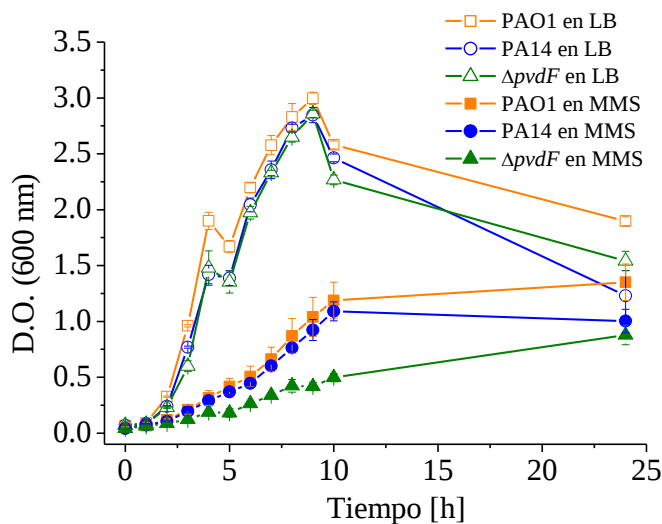


Figura G1. Crecimiento celular de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$)) en medio LB y MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$).

En la Tabla G1 se muestran los parámetros cinéticos de las cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$, donde se observa que en LB todas las velocidades son mayores que en MMS y, por lo tanto, todos los tiempos de duplicación son menores en LB. Al igual que se observó en la curva de crecimiento la cepa PA14 $\Delta pvdF$ tuvo menor velocidad de crecimiento y mayor tiempo de duplicación a diferencia de las otras dos cepas en MMS, esto a causa de la deficiencia de pioverdina.

Tabla G1.

Parámetros cinéticos de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) en medio LB y MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$).

Parámetro Celular	Medio de cultivo	PAO1	PA14	PA14 $\Delta pvdF$
μ (h^{-1})	LB	1.03 ± 0.01	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.03
	MMS	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.23 ± 0.01
td (h)	LB	0.68 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.02
	MMS	2.2 ± 0.13	2.17 ± 0.06	3.02 ± 0.1

En todos los experimentos se realizó la prueba de viabilidad y se comprobó que las condiciones de cultivo y el medio no afectan la viabilidad de las células a las 24 h en LB y en MMS a pesar de la deficiencia de hierro.

Factores de virulencia

A continuación, se muestra la producción de los factores de virulencia (Pioverdina, Piocianina, Elastasa y Proteasa alcalina):

Pioverdina. En la Figura G2A se puede observar que las cepas PAO1 y PA14 cultivadas en MMS producen una mayor cantidad de pioverdina, esto debido a que este medio cuenta con una cantidad menor de hierro que el medio LB, por lo que estas dos cepas incrementan la producción de pioverdina para aumentar la probabilidad de capturar el hierro presente en el medio. En la misma figura también observamos que la cepa PA14 $\Delta pvdF$ en MMS produce menor cantidad que los cultivos en LB de las tres cepas a las 24 h, esto se debe a que esta cepa no cuenta con la sintasa de este sideróforo por lo cual, es incapaz de producir pioverdina; en lo referente a los cultivos en LB, en este medio no está limitada la cantidad de hierro por lo que la baja cantidad de pioverdina producida es suficiente para abastecer de hierro a las bacterias y obtener un buen crecimiento.

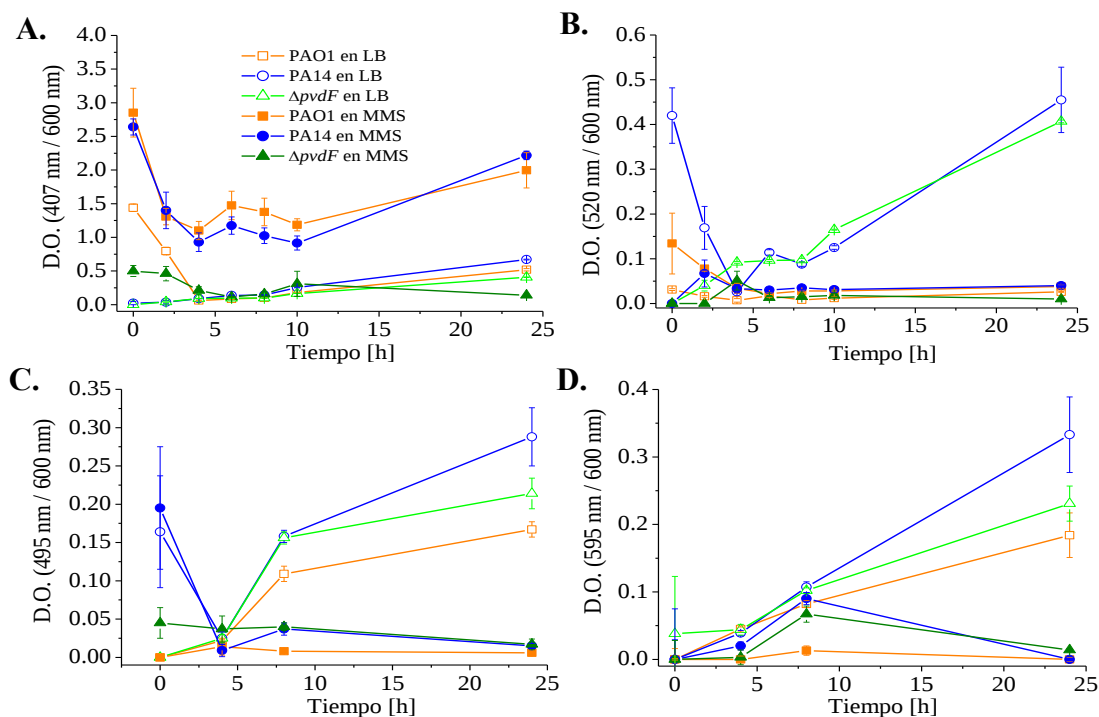


Figura G2. Producción de factores de virulencia de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$)) en medio LB y MMS **A.** Pioverdina, **B.** Piocianina, **C.** Elastasa y **D.** Proteasa alcalina. (Promedio $\pm$ error típico, n = 3).

Piocianina. La producción de piocianina se puede observar en la Figura G2B. Las cepas PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ cultivadas en LB tienen la mayor producción a las 24 h, mientras que los cultivos de PAO1 en MMS y PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ en LB tienen una producción muy limitada, lo que coincide con investigaciones anteriores, donde se ha comprobado que la cepa PA14 tiene una mayor producción de piocianina que la cepa PAO1 (Dietrich, et al., 2006).

Elastasa. La elastasa producida por las cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ en el medio LB es un reflejo del aumento de la cantidad de células en ese medio, ya que su producción es controlada por los sistemas de quórum, los cuales dependen de la densidad celular y también de la fuente de carbono. La elastasa producida en MMS es menor a la que se produjo en LB, coincide con la disminución en su crecimiento. Además, el medio LB tiene más nutrientes y las células son capaces de producirla con mayor facilidad que en el medio MMS. Esto se puede observar en la Figura G2C.

Proteasa alcalina. Al igual que la elastasa, la producción de proteasa alcalina en las cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ en el medio LB es proporcional al crecimiento celular, ya que su producción es controlada por los sistemas de quórum y en MMS a diferencia de LB se produce una menor cantidad de proteasa. Esto se observa en la Figura G2D.

CMI de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$

En la Figura G3A se muestra el comportamiento que tuvieron las cepas (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) expuestas a diferentes concentraciones de galio cultivadas en medio LB y MMS. En la Figura G3B se puede observar que, para las cepas en LB, el crecimiento se comenzó a inhibir a una concentración de 500 μM y para las cepas en MMS se observa que el crecimiento se empieza a inhibir a 50, 25 y 10 μM para PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ respectivamente.

Esto se debe a que en LB las células cuentan con mejores condiciones de crecimiento y por lo tanto son capaces de producir mayor cantidad de compuestos que le sirvan como protección, lo que les permite resistir a mayores cantidades de antibiótico a diferencia de las células crecidas en MMS.

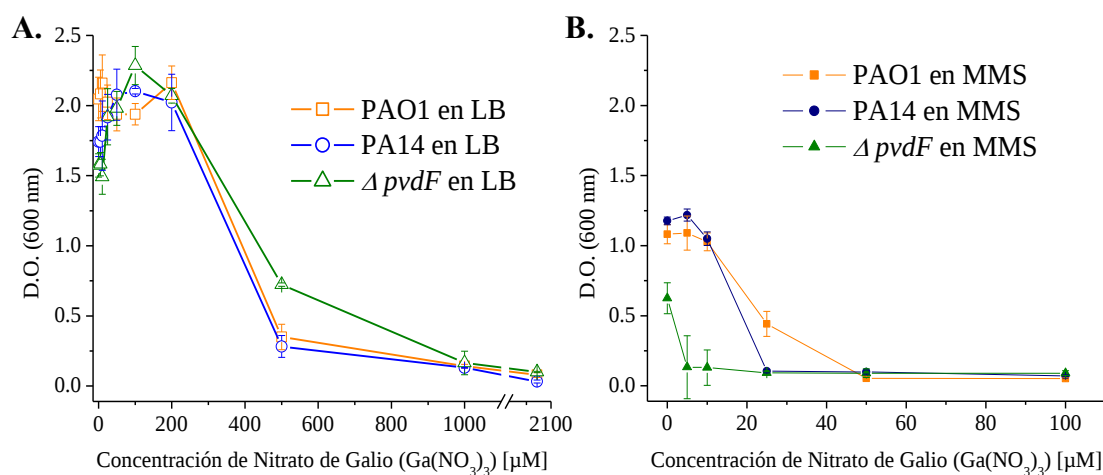


Figura G3. Concentración mínima inhibitoria de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$) en medio **A.** LB y **B.** MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$).

Apéndice H. Unidades formadoras de colonias aisladas de *G. mellonella*

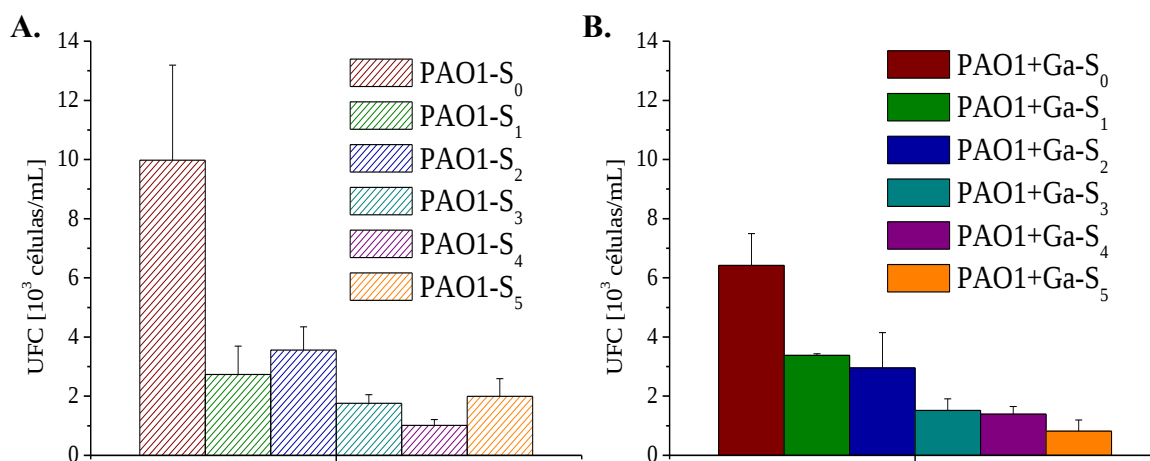


Figura H1. Unidades Formadoras de colonias aisladas de *G. mellonella* infectada con PAO1 **A.** sin $Ga(NO_3)_3$ y **B.** con $Ga(NO_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$).

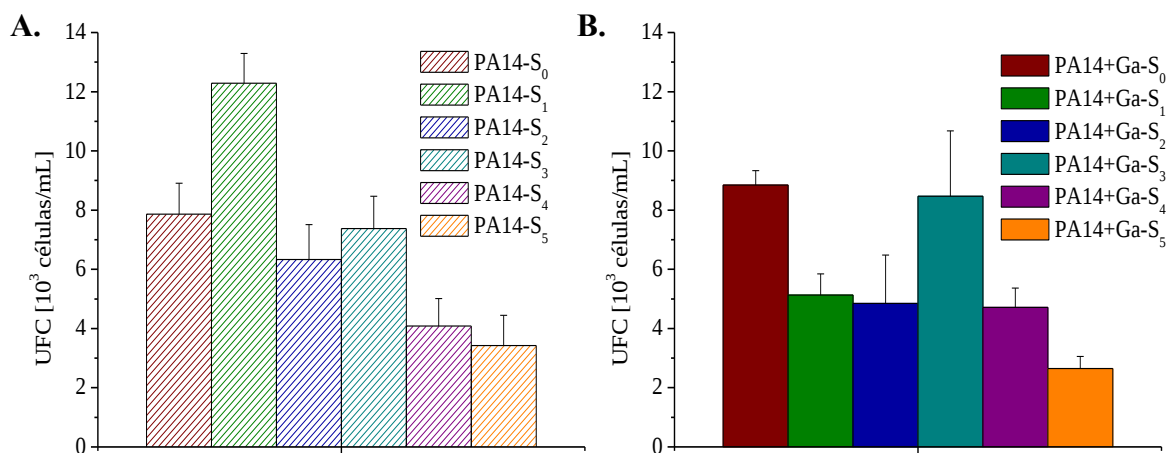


Figura H2. Unidades Formadoras de colonias aisladas de *G. mellonella* infectada con PA14 **A.** sin $Ga(NO_3)_3$ y **B.** con $Ga(NO_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$).

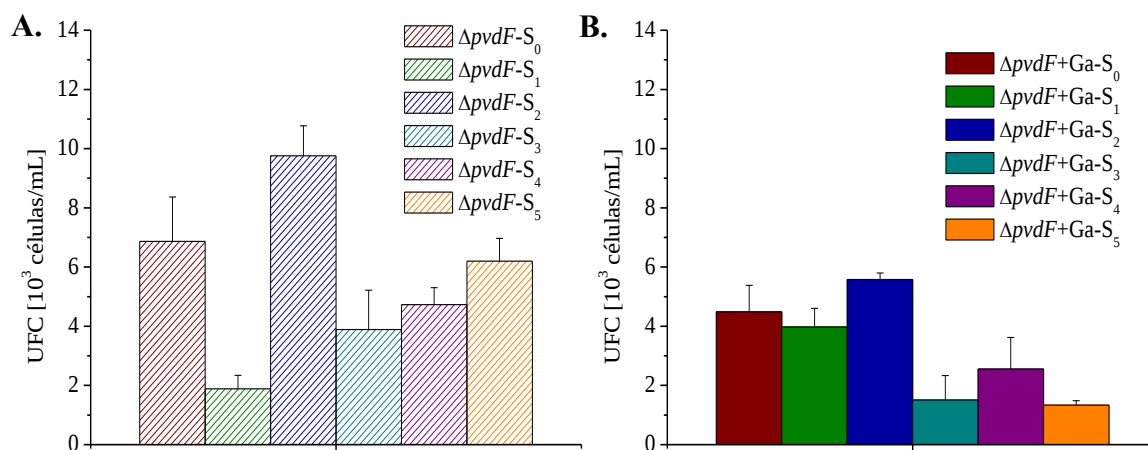


Figura H3. Unidades Formadoras de colonias aisladas de *G. mellonella* infectada con PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) **A.** sin Ga(NO₃)₃ y **B.** con Ga(NO₃)₃. (Promedio $\pm$ error típico, n = 3).

Apéndice I. Factores de virulencia

Se cuantificó la producción de pioverdina tras cada secuencia para ver si cambiaba la producción de este factor o no.

La Figura I1 muestra la producción de pioverdina de las células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PAO1 sin y con tratamiento a lo largo de las secuencias. Se observa que la producción de pioverdina no varió a lo largo de las secuencias.

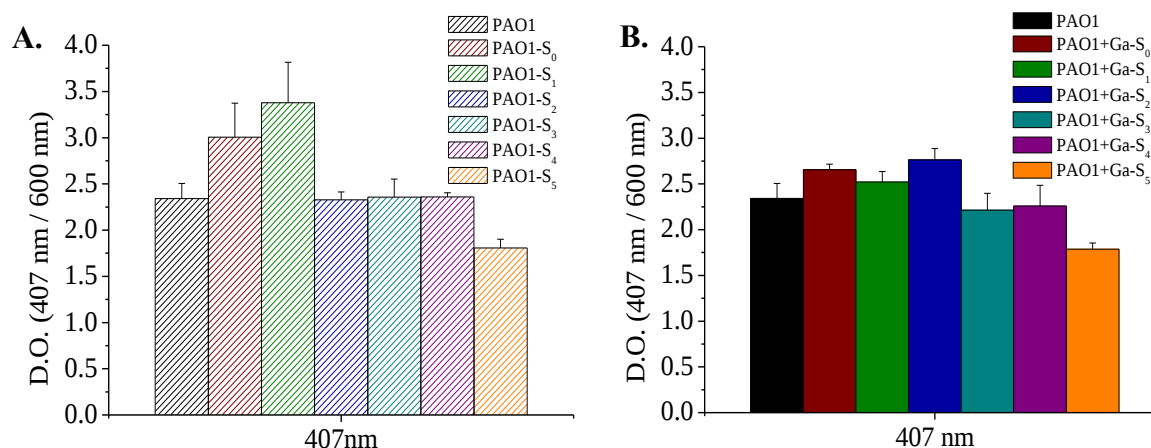


Figura 11. Producción de pioverdina en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PAO1 **A.** sin Ga(NO₃)₃ y **B.** con Ga(NO₃)₃. (Promedio ± error típico, n = 3, Man-Whitney p>0.05).

Las células de PA14 aisladas de *G. mellonella* sin y con Ga(NO₃)₃ no cambiaron significativamente la producción de pioverdina en el transcurso de las secuencias (Figura J2).

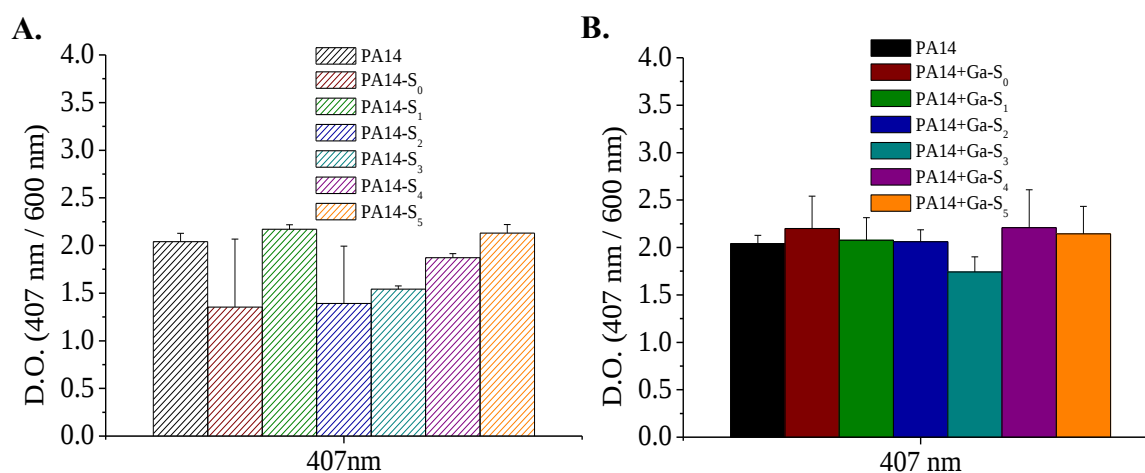


Figura 12. Producción de pioverdina en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 **A.** sin Ga(NO₃)₃ y **B.** con Ga(NO₃)₃. (Promedio ± error típico, n = 3, Man-Whitney p>0.05).

En la Figura I3 se puede apreciar la producción de pioverdina de las células de PA14 $\Delta pvdF$ aisladas de *G. mellonella* con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, siendo esta cantidad casi cero, lo cual confirma que no hay producción de pioverdina, ya que esta cepa es una mutante de pioverdina.

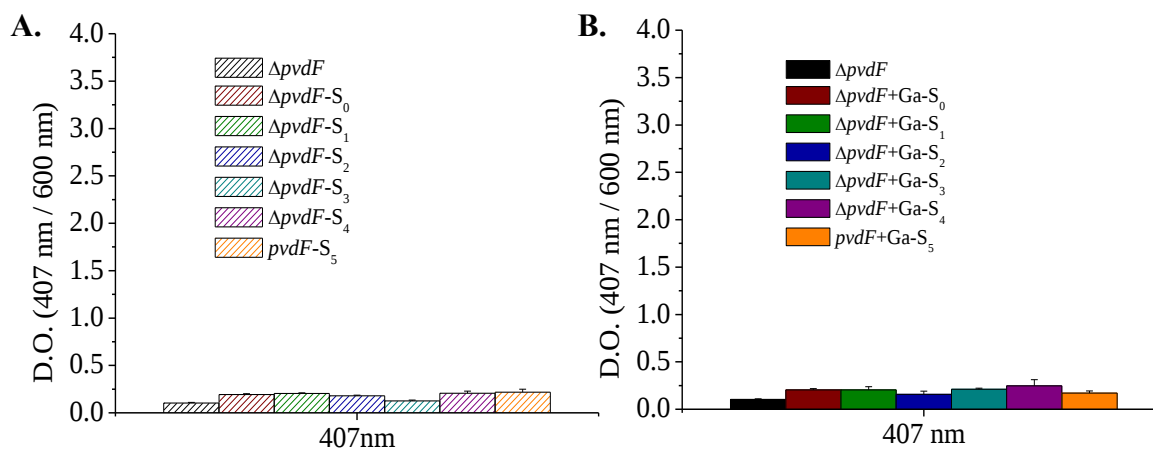


Figura I3. Producción de pioverdina en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 $\Delta pvdF$ **A.** sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y **B.** con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p > 0.05$).

De acuerdo con los datos obtenidos en la producción de pioverdina y la supervivencia se midió la producción de otros factores de virulencia: piocianina, elastasa y proteasa alcalina con el fin de observar si se producía algún cambio en la producción de alguno de estos factores de virulencia y así saber si estos eran los causantes de la virulencia.

En las Figuras I4, I5 y I6 se observa la producción de piocianina de las células aisladas del modelo infectado con PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. El paso por el gusano con y sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ no afecta la producción de piocianina de PAO1 con respecto a la cepa silvestre (Figura I4), la producción de piocianina para la cepa PA14 es casi nula, sin embargo, se ve que al pasar por el modelo aumenta la producción de este factor de virulencia en pequeñas cantidades

(Figura I5) y la producción de piocianina para la cepa PA14 $\Delta pvdF$ es casi cero y no cambia conforme pasa por la larva (Figura I6).

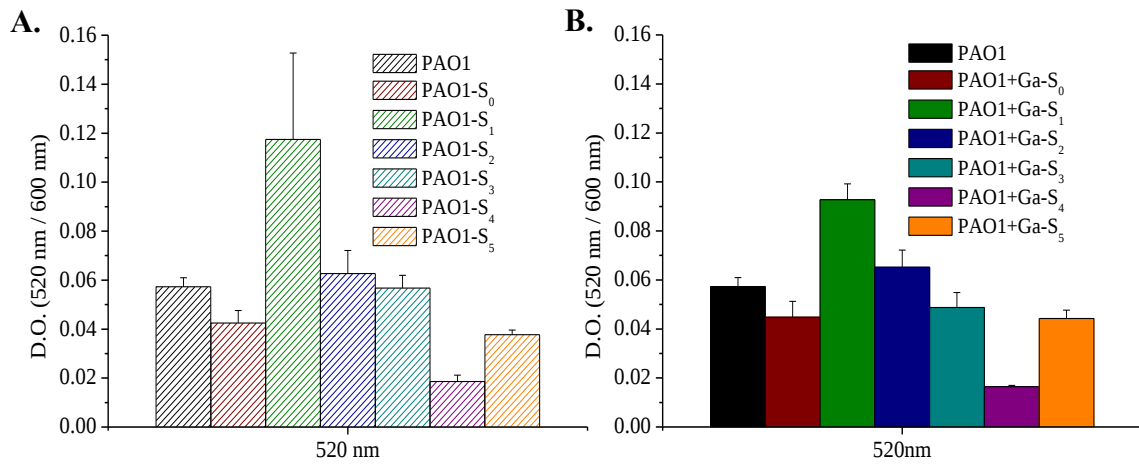


Figura I4. Producción de piocianina en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PAO1 **A.** sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y **B.** con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p > 0.05$).

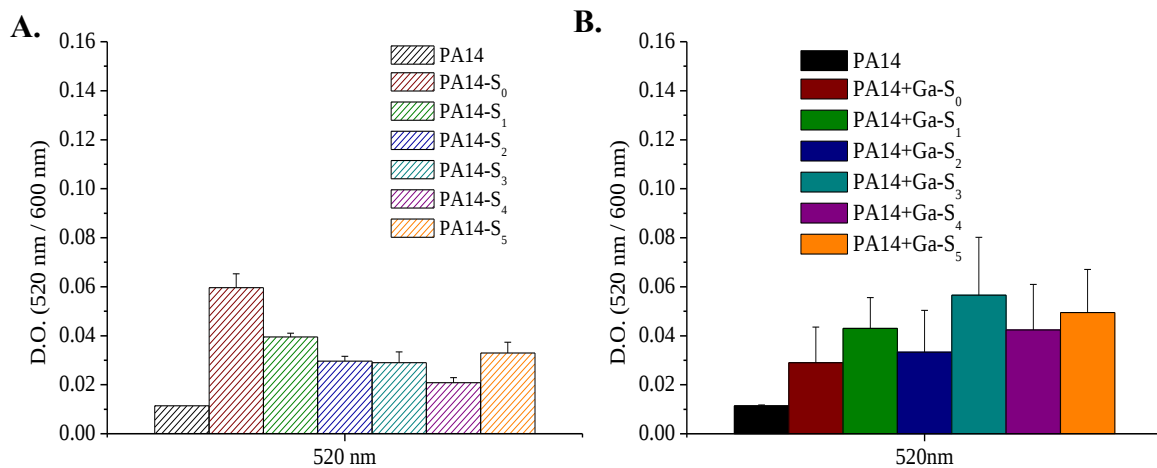


Figura I5. Producción de piocianina de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 **A.** sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y **B.** con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en MMS. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p > 0.05$).

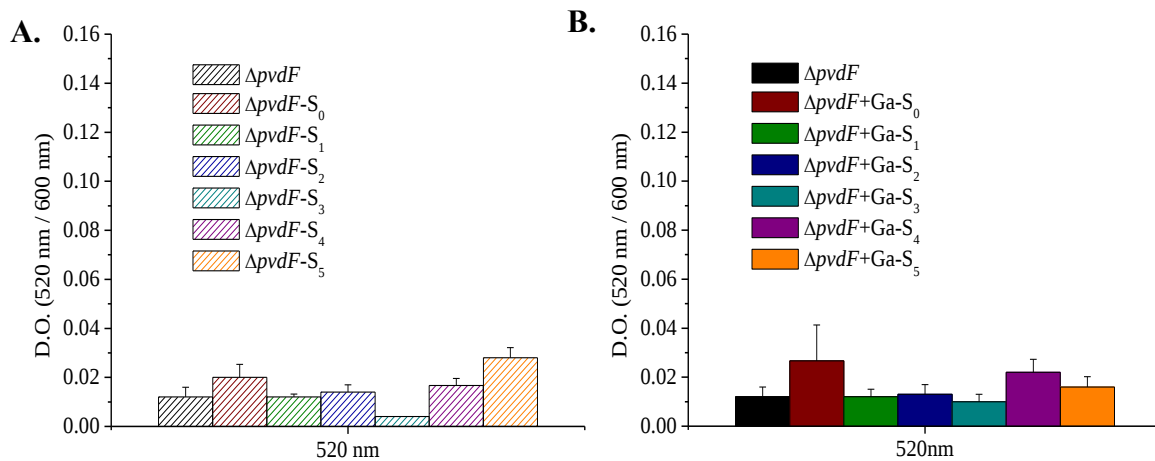


Figura I6. Producción de piocianina en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) **A.** sin $Ga(NO_3)_3$ y **B.** con $Ga(NO_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$ Man-Whitney $p > 0.05$).

La producción de elastasa de las cepas PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ no se vio afectada en el transcurso de las secuencias con y sin tratamiento, además, la producción de este factor de virulencia fue mínima (Figura I7, I8 y I9), aún en las cepas PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ (Figura I8 y I9), en las cuales aumento levemente la producción de elastasa en las últimas secuencias con y sin tratamiento; al aumentar en las dos condiciones, se puede decir que este factor de virulencia no tiene relevancia con el efecto del galio tanto en el huésped como en las cepas.

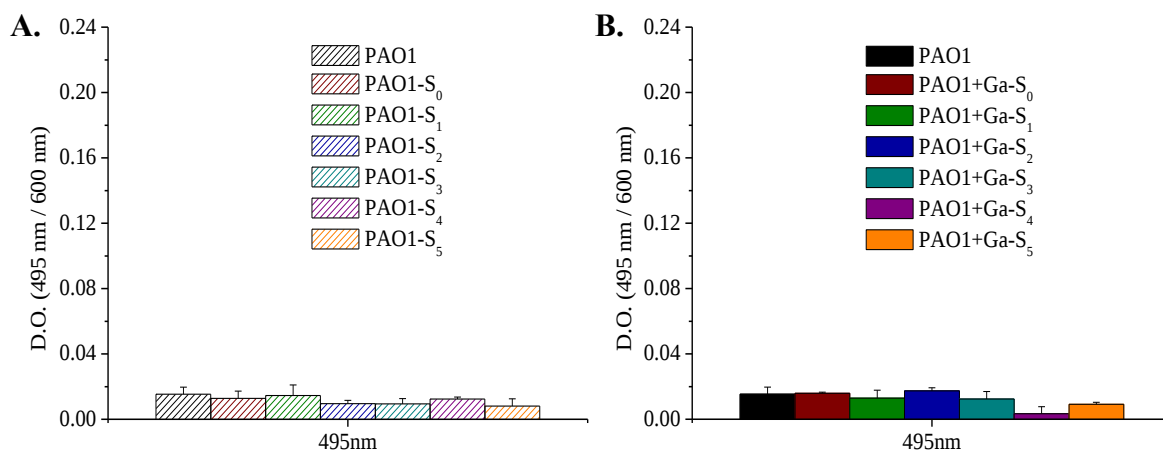


Figura I7. Producción de elastasa en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PAO1 **A.** sin Ga(NO₃)₃ y **B.** con Ga(NO₃)₃. (Promedio ± error típico, n = 3, Man-Whitney p>0.05).

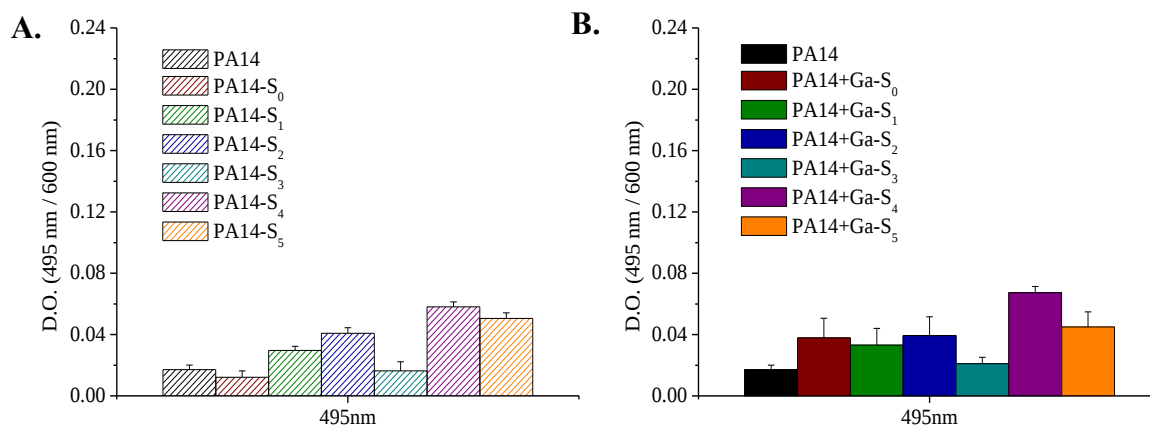


Figura I8. Producción de elastasa en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 **A.** sin Ga(NO₃)₃ y **B.** con Ga(NO₃)₃. (Promedio ± error típico, n = 3, Man-Whitney p>0.05).

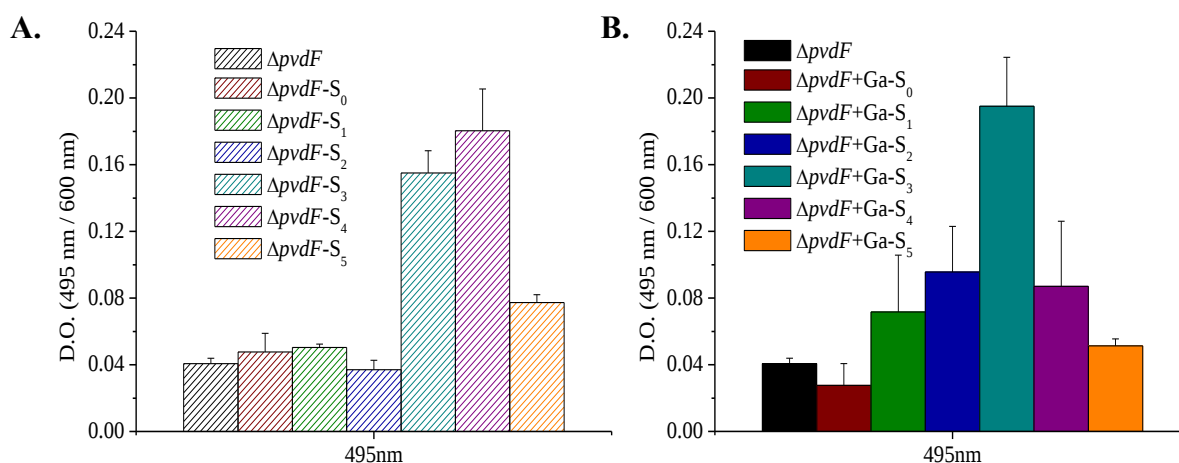


Figura I9. Producción de elastasa en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) **A.** sin $Ga(NO_3)_3$ y **B.** con $Ga(NO_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p > 0.05$).

La producción de proteasa de las células de PAO1 aisladas de *G. mellonella* con y sin tratamiento después de cada secuencia no cambia significativamente con respecto a la cepa silvestre (Figura I10).

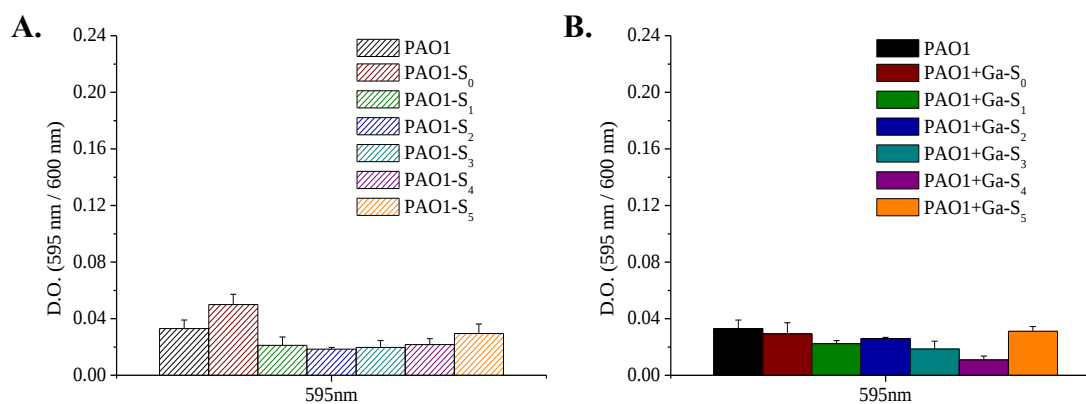


Figura I10. Producción de proteasa en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PAO1 **A.** sin $Ga(NO_3)_3$ y **B.** con $Ga(NO_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p > 0.05$).

Aunque la producción de proteasa de las células de PA14 aisladas de *G. mellonella* con y sin tratamiento es mínima, se ve un aumento de este factor de virulencia en las S₁, S₂, S₃, S₄ y S₅ sin tratamiento y con tratamiento con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, estadísticamente no son diferentes (Figura I11).

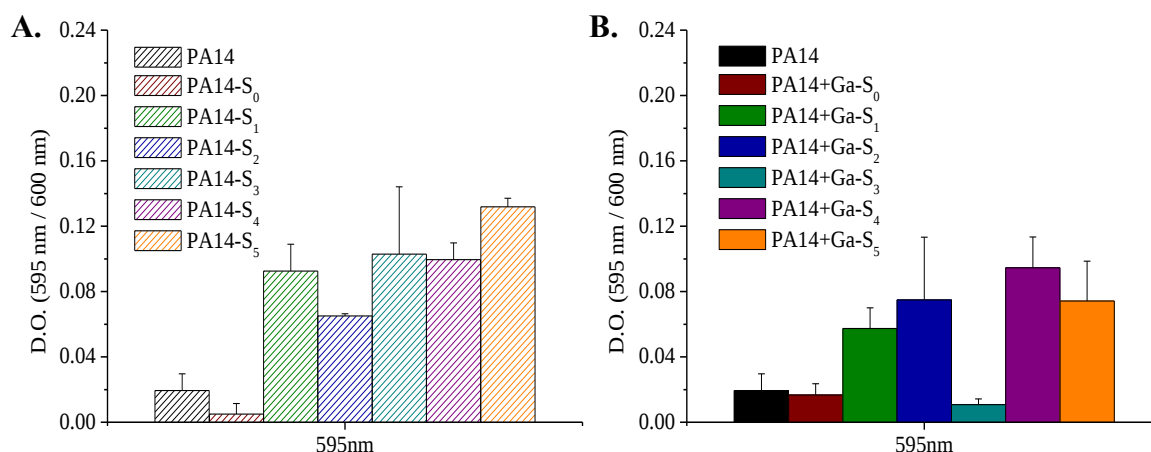


Figura I11. Producción de proteasa en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 **A.** sin Ga(NO₃)₃ y **B.** con Ga(NO₃)₃. (Promedio ± error típico, n = 3 Man-Whitney p>0.05).

La producción de proteasa de las células de PA14 $\Delta pvdF$ aisladas de *G. mellonella* con y sin tratamiento aumenta en las S₃ y S₄ sin Ga(NO₃)₃ con respecto a la cepa silvestre; sin embargo, este aumento también se vio en la S₃ con Ga(NO₃)₃, per estadísticamente no es significativo (Figura I12).

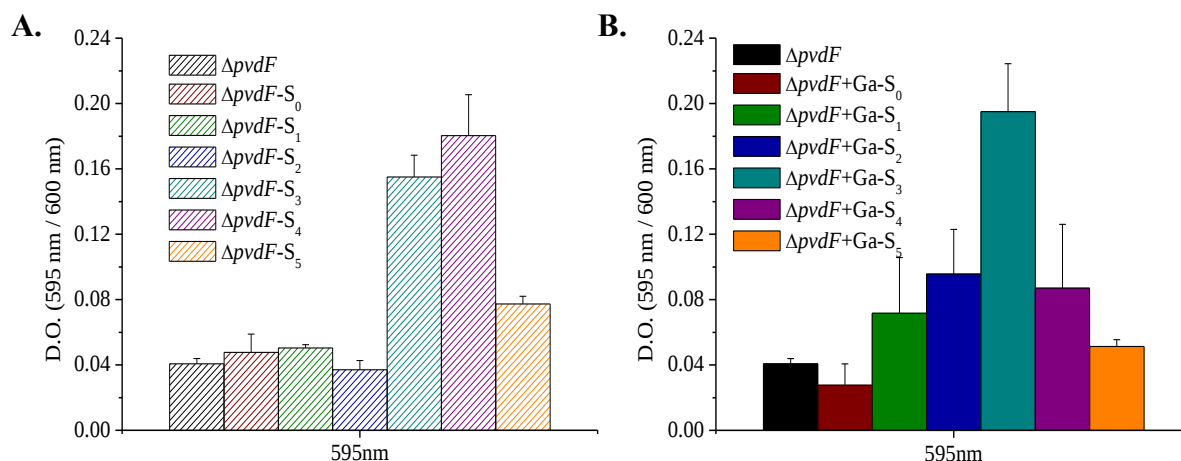


Figura I12. Producción de proteasa en MMS de células aisladas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) **A.** sin $Ga(NO_3)_3$ y **B.** con $Ga(NO_3)_3$. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$ Man-Whitney $p > 0.05$).

Apéndice J. PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ *in vitro*

Adicionalmente se realizó el mismo procedimiento secuencial, pero de forma *in vitro* para ver si de esta forma se generaba resistencia.

En estos experimentos se imitó el procedimiento que se realizó de forma *in vivo*, es decir que se realizaron precultivos de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ en 5 ml de MMS y se cultivaron a 37 °C y 200 rpm durante 12-16 h, al cabo de este tiempo se midió la D.O._{600 nm} para iniciar por triplicado los cultivos con y sin $Ga(NO_3)_3$ (50 μ M) en MMS a D.O._{600nm} de 0.05. Después de 24 h se aislaron las células en una placa de LB-agar y se incubaron a 37 °C para posteriormente hacer precultivos e iniciar una nueva secuencia y así sucesivamente hasta completar las 6 secuencias como en el modelo *in vivo*.

La Figura J1 muestra la concentración mínima inhibitoria de las células de PAO1 que fueron aisladas al finalizar los tratamientos *in vitro* (tratamiento como gusano), en la cual se puede observar que la CMI es mayor en comparación con la de la cepa silvestre, lo cual indica que cuando esta cepa es expuesta a galio *in vitro* genera resistencia.

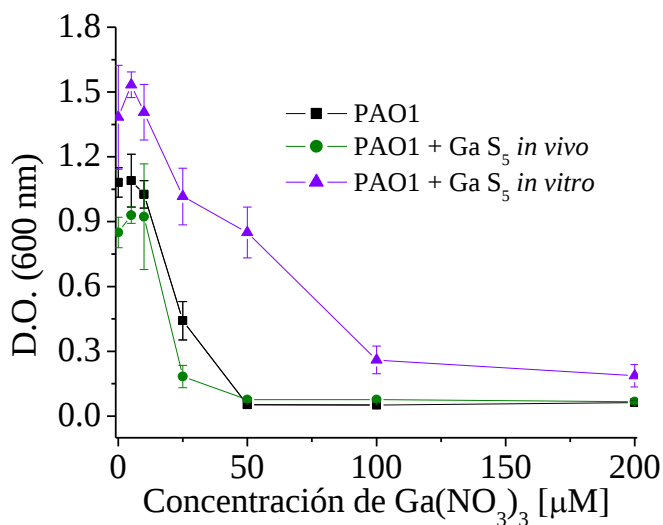


Figura J1. Concentración mínima inhibitoria en MMS de células de PAO1 aisladas de la última secuencia *in vivo* e *in vitro*. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p < 0.05$).

La Figura J2 muestra la concentración mínima inhibitoria de las células de PA14 que fueron aisladas al finalizar los tratamientos *in vitro*, en la cual se puede observar que la CMI es mayor para estas en comparación con la de la cepa silvestre, lo cual indica también que cuando esta cepa es expuesta a galio *in vitro* genera resistencia al igual que PAO1.

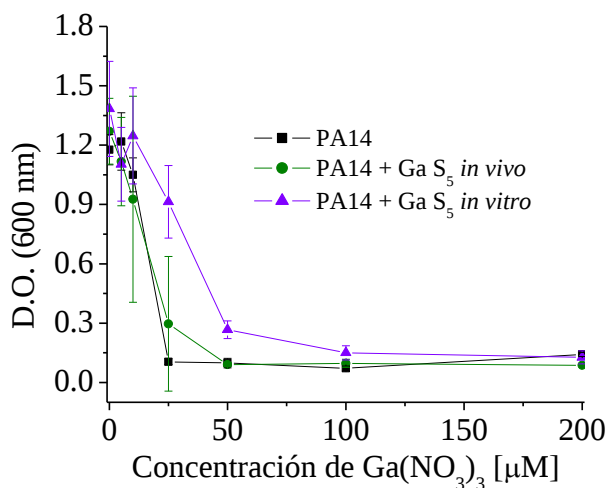


Figura J2. Concentración mínima inhibitoria en MMS de células de PA14 aisladas de la última secuencia *in vivo* e *in vitro*. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$ Man-Whitney $p < 0.05$).

La Figura J3 muestra la concentración mínima inhibitoria de las células de PA14 $\Delta pvdF$ que fueron aisladas al finalizar los tratamientos *in vitro*, en la cual se puede observar que la CMI no cambia.

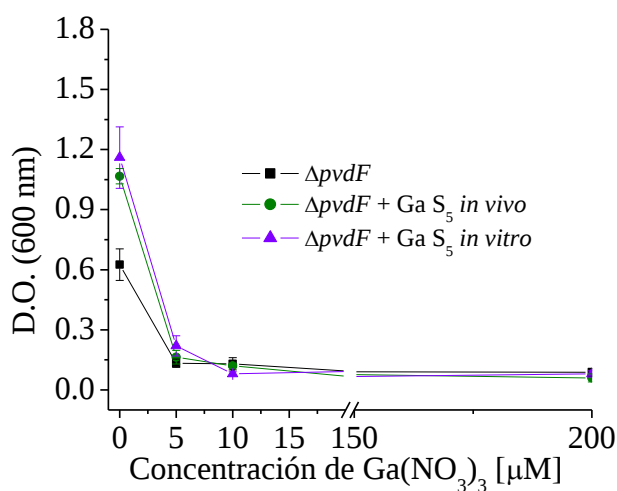


Figura J3. Concentración mínima inhibitoria en MMS de células de PA14 $\Delta pvdF$ ($\Delta pvdF$) aisladas de la última secuencia *in vivo* e *in vitro*. (Promedio $\pm$ error típico, $n = 3$, Man-Whitney $p > 0.05$).

Con base en estos resultados se puede concluir que estas PAO1 y PA14 son capaces de generar resistencia a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ cuando están en contacto con este antibiótico de forma directa, como lo sería en los tratamientos *in vitro*, sin embargo, cuando se realizaron los experimentos en el modelo *in vivo*, ninguna de estas cepas fue capaz de generar resistencia.

Apéndice K. Galio intracelular de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$

Se determinó la concentración intracelular y extracelular de galio de PAO1, PA14 y PA14 $\Delta pvdF$ aisladas de la última secuencia con tratamiento *in vitro*, observándose que entra mayor cantidad de galio a las cepas aisladas que a la cepa silvestre (Figura K.1), esto podría ser por la generación de resistencia de estas cepas. La entrada de galio a las células podría significar que estas cepas tienen la capacidad de almacenar el galio para evitar la interferencia de este con las funciones metabólicas de las células.

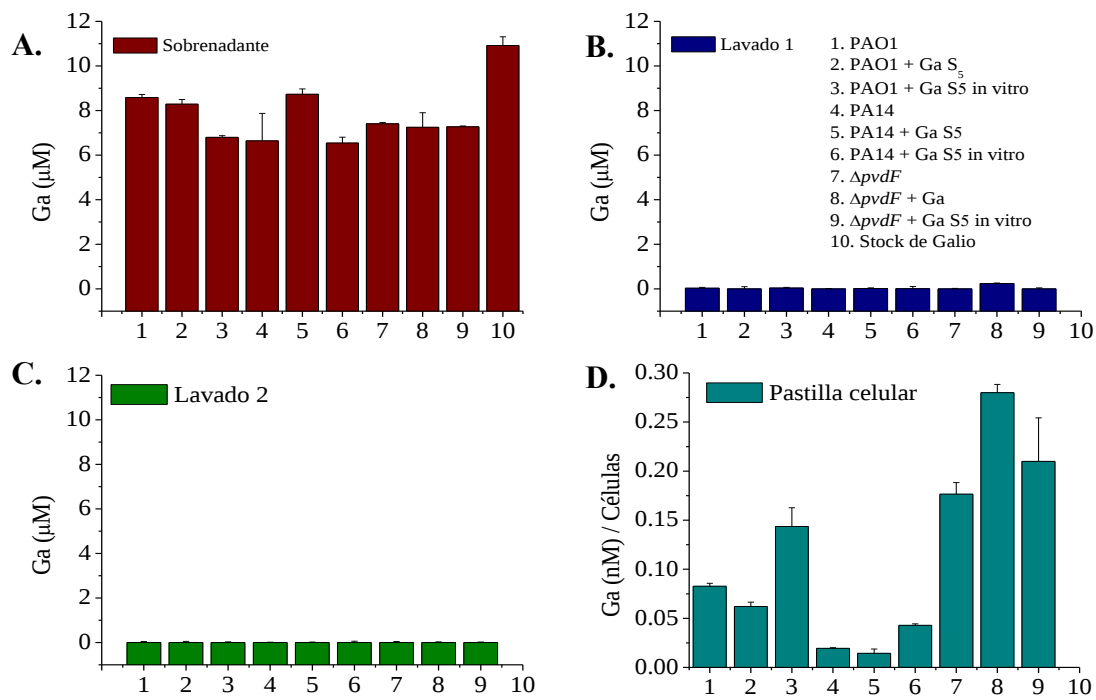


Figura K1. Concentración intracelular y extracelular de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ de células aisladas de PAO1, PA14 y PA14 Δ pvdF (Δ pvdF) *in vivo* e *in vitro*.