

**ESTUDIO DE LA SELECCIÓN *IN VITRO* DE RESISTENCIA A GALIO EN
*Pseudomonas aeruginosa***

MONICA PAOLA FLOREZ DUARTE

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

**ESTUDIO DE LA SELECCIÓN IN VITRO DE RESISTENCIA A GALIO EN
Pseudomonas aeruginosa.**

MONICA PAOLA FLOREZ DUARTE

**Trabajo de grado presentado para optar por título de Ingeniero
Químico**

Directora:

**VIVIANA SÁNCHEZ TORRES
Ph.D Ingeniería Química**

Codirector:

**RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
Ph.D Ciencias Biomédicas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2018**

A Dios por haberme permitido haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional.

A la memoria de mi señor padre Henry Wenceslao Florez Galeano, quien me enseñó que la vida no es de prototipos sino de grandes sueños, que no se trata de parecer sino de ser y que a pesar de que la vida no nos permitió pasar mas tiempo juntos te siento siempre cerca, la promesa está cumplida, ser una gran profesional, como siempre lo soñaste.

A mi amada madre Ana Libia Duarte, por ser el pilar mas importante en mi vida, por su ejemplo, amor y apoyo constante, por demostrarme que cada día se puede ser mejor persona y por estar siempre conmigo en los momentos mas difíciles de mi vida.

A mi tía Rosa María Oviedo, quien es como una segunda madre para mi, por enseñarme a ser una mujer guerrera y con carácter para enfrentar cada obstáculo que se presente.

A mis hermanos Claudia Maritza, Henry Leonardo y Maria Alejandra por su apoyo y consejos.

A mis hermosas sobrinas Mariana, Sofia y Mariangel quienes me enseñaron a valorar las cosas sencillas y me han enseñado a amar.

A Yesid Landinez, con quien compartí momentos de felicidad y quien estuvo en los momentos en los que creí no poder continuar.

Finalmente, a mis familiares, compañeros y amigos por brindarme cariño, apoyo.

Monica Paola Florez Duarte

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander y principalmente a la Escuela de Ingeniería Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Departamento de microbiología y parasitología de la Facultad de Medicina, por permitirme realizar la pasantía de investigación.

A la oficina de Relaciones Exteriores por el aporte económico adjudicado al intercambio académico.

A mis directores la Dra. Viviana Sánchez Torres y Dr. Rodolfo Garcia Contreras por su asesoría, dedicación guía y confianza depositada en mi para la realización de este proyecto.

Al laboratorio de microbiología de la UNAM y al grupo de investigación GIMBA por brindarme el espacio y todos los materiales necesarios para el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Fany con quien disfrutaba los largos días de trabajo en el laboratorio. Gracias por todas las experiencias compartidas y por brindarme ánimo en los momentos de dificultad.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 <i>PSEUDOMONAS</i>	18
1.1.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	18
1.2 RESISTENCIA BACTERIANA	19
1.3 CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS.....	20
1.4 USO DEL GALIO COMO ANTIBIÓTICO. MECANISMO DE ACCIÓN	21
1.5 PIOVERDINA.....	23
2. METODOLOGÍA.....	25
2.1 CRECIMIENTO DE <i>PSEUDONOMAS AERUGINOSA</i> EN MICROPLACAS	25
2.1.1 MICROORGANISMOS Y CULTIVO:.....	25
2.2 PRUEBA DE VIABILIDAD	26

2.3 CÁLCULO DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.....	27
2.3.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN	27
2.3.2 NÚMERO DE GENERACIONES.....	27
2.4 CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS.....	27
2.5 DETERMINACIÓN DE GALIO	28
2.5.1 ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	30
3. RESULTADOS.....	31
3.1 CRECIMIENTO CELULAR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	31
3.2 PRUEBA DE VIABILIDAD	34
3.3 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	36
3.3.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN	36
3.3.2 NÚMERO DE GENERACIONES.....	37
3.4 CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS.....	38
3.5 DETERMINACIÓN DE GALIO	40

4.CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS.....	47

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. Metodología usada en el desarrollo del proyecto.....	25
FIGURA 2. Curvas de crecimiento PA01 expuestas a 20 μM y 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3	32
FIGURA 3. Curvas de crecimiento PA14 expuestas a 20 μM y 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3	32
FIGURA 4. Curvas de crecimiento TC5 expuestas a 20 μM y 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3	33
FIGURA 5. Curvas de crecimiento TC5 expuestas a diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3	33
FIGURA 6. Prueba de viabilidad. Técnica CFU.....	34
FIGURA 7. Cuentas viables cepa PA01	35
FIGURA 8. Cuentas viables cepa TC5	36
FIGURA 9. Concentraciones minimas inhibitorias PA01	39
FIGURA 10. Concentraciones minimas inhibitorias PA14 y TC5.....	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Mecanismos antibacterianos del galio	47
ANEXO B. Medios de cultivo	48
ANEXO C. Curva de calibración	49
ANEXO D. Curvas de crecimiento cepa E12	50
ANEXO E. Cuentas viables	52
ANEXO F. Velocidad específica y tiempo de duplicación	52
ANEXO G. Número de generaciones	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DO Densidad óptica

LB Medio Luria Bertani

CAA Medio de Casaminoácidos

UFC Unidades Formadoras de Colonias

OMS Organización Mundial de la Salud

MIC Concentraciones Mínimas Inhibitorias

RESUMEN

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

AUTOR: MONICA PAOLA FLOREZ DUARTE

PALABRAS CLAVE: Resistencia a antibióticos, galio, sideróforos, antimicrobianos, *Pseudomonas aeruginosa*

DESCRIPCIÓN:

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día, están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad de tratar infecciones comunes; lo que ha propiciado la búsqueda de antimicrobianos dentro de los cuales se encuentra el galio, el cual ha tenido usos en la medicina como en el tratamiento de trastornos en la resorción ósea y enfermedades autoinmunes. Los efectos antimicrobianos del galio [III] se basan en su similitud fisicoquímica con el hierro [III], con la principal diferencia de que el galio es estable y no se puede óxido reducir. Por lo que interfiere con el transporte del hierro mediado por sideróforos y desplaza al hierro en diversas enzimas implicadas en procesos vitales como la respiración.

En la presente investigación se desea evaluar la selección de la resistencia al galio de las cepas PA01, PA14, TC5 y E12 de *Pseudomonas aeruginosa* en cultivos secuenciales en microplacas de 96 pozos, las cuales se inocularon durante 72 horas a 37°C a diferentes concentraciones de nitrato de galio y controles con nitrato de sodio. Se realizó el seguimiento en el crecimiento de cada cultivo y se realizó prueba de viabilidad entre cada pase. Adicionalmente se realizaron MIC para confirmar selección de resistencia en cada una de las cepas y se determinó experimentalmente que la bacteria internaliza galio.

*Proyecto de grado

**Facultad de Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química Directora: Ph.D. Viviana Sánchez Torres Codirector: Ph.D. Rodolfo García contreras

ABSTRACT

TITLE: ESTUDIO DE LA SELECCIÓN *IN VITRO* DE RESISTENCIA A GALIO EN *Pseudomonas aeruginosa*.

AUTHOR: MONICA PAOLA FLOREZ DUARTE

KEYWORDS: Antibiotic resistance, gallium, siderophores, antimicrobials *Pseudomonas aeruginosa*.

DESCRIPCIÓN:

Antibiotic resistance is increasing worldwide to dangerous levels. Day after day, new mechanisms of resistance are appearing and spreading all over the planet that jeopardize our ability to treat common infections; what has led to the search for antimicrobials, including gallium, which has had uses in treatment of disorders in bone resorption and autoimmune diseases. The antimicrobial effects of gallium [III] are based on its physicochemical similarity to iron [III], with the crucial difference that gallium is stable and cannot be oxidized-reduced. Hence it interferes with iron transport mediated by siderophores and displaces iron from various enzymes involved in vital processes such as respiration.

This research is intended to evaluate the selection of gallium resistance of the strains PA01, PA14, TC5 and E12 of *Pseudomonas aeruginosa* in sequential cultures in 96 well microplates, which were inoculated for 72 hours at 37°C at different concentrations of gallium nitrate and sodium nitrate controls. We tracked the growth of each crop and feasibility test was performed on each pass. Additionally, MICs performed to confirm selection of resistance in each of the strains and it was experimentally determined internalizes gallium.

* Project of grade

**Faculty of Engineering Physicochemical School Engineering Chemical Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres Codirector: Ph.D. Rodolfo García contreras

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso indebido de antimicrobianos ha aumentado la cantidad y el tipo de microorganismos resistentes. En consecuencia, muchas enfermedades infecciosas pueden volverse incontrolables. Con el crecimiento del comercio y los viajes en todo el mundo, los microorganismos resistentes pueden propagarse rápidamente a cualquier parte del mundo[1].

La OMS publicó en 2017 una lista de las 12 especies de bacterias resistentes a antibióticos más peligrosas y se estima que de no tomarse medidas adecuadas para el año 2030, morirán alrededor de 10 millones de personas al año como consecuencia de estas infecciones, por lo que esta causa de muerte estaría superando a las que prevalecen en la actualidad, como lo es el cáncer. Dentro de la lista de bacterias consideradas más peligrosas se encuentran *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* en las prioridades 1 y 2 respectivamente; ya que ambas especies son naturalmente insensibles a múltiples antimicrobianos y son capaces de desarrollar resistencia a nuevos fármacos rápidamente [2].

El 30% de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* ahora son resistentes a 3 o más fármacos. A pesar de estas tendencias, solo se ha introducido un nuevo fármaco antibacteriano con un mecanismo de acción completamente novedoso en las últimas 3 décadas (linezolid), y muy pocos antibióticos nuevos están en desarrollo avanzado [3].

Pseudomonas aeruginosa tiene más de 30 genes que codifican receptores de hierro (Fe), lo que reduce la probabilidad de que los sistemas de absorción de Fe puedan bloquearse efectivamente. Así que se ha explorado la utilización del galio (Ga) como un “Caballo de Troya” para interrumpir el metabolismo bacteriano del Fe; por las similitudes que éste tiene con el Fe, tales como un radio iónico casi idéntico; muchos sistemas biológicos son incapaces de distinguir Ga^{3+} de Fe^{3+} [3].

Fuera de la célula, Ga^{3+} y Fe^{3+} se unen al sideróforo pioverdina y estos complejos ingresan al periplasma a través del transportador FpvA. El Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} por una proteína aún desconocida y es liberado por la pioverdina, la pioverdina libre es bombeada por la célula mediante el sistema de flujo OmpQ que ingresa al periplasma a través de una porina; como Ga^{3+} no puede ser reducido, permanece en el espacio periplásmico unido a la pioverdina [4].

Una vez dentro de la bacteria el Ga es capaz de reemplazar al Fe en diversas enzimas que requieren de la óxido reducción de éste para funcionar. Entre estas enzimas se encuentran la ribonucleótico reductasa que participa en la síntesis del ADN, la catalasa y el superóxido dismutasa dependientes de Fe, que están involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno [EROS] y los complejos de la cadena respiratoria que contienen centros hierroazufre [5]. Recientemente se demostró que el complejo Ga protoporfirina IX (precursor del grupo hemo) es internalizado por *P. aeruginosa* con lo que ocasiona la inhibición de la actividad de las citocromooxidasas con citocromos tipo b (Cco-1, Cco-2 y de la citocromo oxidasa resistente a cianuro Cio) [6].

En este trabajo se quiere demostrar que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* genera resistencia al nitrato de galio, analizando entre cada pase la viabilidad y el número de generaciones de las cepas PA01, PA14 (cepas de referencia de *P. aeruginosa*) TC5 (cepa silvestre con mutación por transposón) y E12 (cepa silvestre con mutación espontánea) de *P. aeruginosa*. También se pretende determinar si el galio adicionado a cada cultivo ingresa a la bacteria, o si por el contrario permanece en el medio.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PSEUDOMONAS

Las *pseudomonas* son bacilos Gramnegativos, móviles con flagelos polares, aerobios y de metabolismo oxidativo no fermentativo, algunas de las cuales producen pigmentos hidrosolubles. Las *Pseudomonas* tienen una amplia distribución en el suelo, el agua, las plantas y los animales. Pertenecen a la familia Pseudomonaceae, la cual está compuesta por una gran variedad de especies que poseen versatilidad metabólica [7].

1.1.1 Pseudomonas aeruginosa. Es un patógeno oportunista de gran relevancia clínica. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos y en los hospitales. *P. aeruginosa* es móvil, tiene forma de bastón, es Gramnegativa y muestra una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas. Esta bacteria es un aerobio obligado que se multiplica fácilmente en muchos tipos de medios de cultivo, produciendo en ocasiones un olor dulce o parecido al de las uvas o a la tortilla de maíz. Suele producir un pigmento azulado no fluorescente, llamado piocianina, que se difunde hacia el agar, muchas cepas de *P. aeruginosa* también producen el pigmento fluorescente pioverdina (principal sideróforo), que le confiere un color verdoso al agar [7].

Este microorganismo es causante de múltiples infecciones, especialmente en unidades de cuidados intensivos y en pacientes con fibrosis quística. Al tener mínimos requerimientos nutricionales, puede sobrevivir a diversas condiciones físicas del ambiente hospitalario, medicamentos, antisépticos, jabones y diversas soluciones [8].

El tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* es difícil por su facilidad de desarrollar resistencia a diferentes antimicrobianos, ya sea de manera intrínseca (mediante alteración de la permeabilidad, las bombas de expulsión), por adquisición de determinantes de resistencia o por la presencia de ambos factores [8].

1.2 RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia a los antimicrobianos, se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios que los hacen insensibles a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas. Dicho de un modo más coloquial, las bacterias que atacan al organismo ya conocen las barreras de defensa (antibióticos) y se puede decir que están preparadas para ganar la batalla [9].

El mecanismo mas importante con el que surge la resistencia bacteriana, es la modificación de la información genética de las bacterias. Esto puede llevar a que algunas pierdan la pared celular y se transformen en resistentes a antibióticos que destruyen la pared; otras, modifican su metabolismo o su síntesis proteica al alterar sus sistemas enzimáticos, lo que anula la acción del antibiótico; o producen enzimas que alteran la molécula antibiótica como es el caso de las betalactamasas en el *Staphylococcus aureus* [10].

La resistencia bacteriana es un motivo de preocupación a nivel mundial. Actualmente, y cada vez más, están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia. Esto tiene como consecuencia que la incapacidad para tratar infecciones aumente día a día. A largo plazo se da un aumento de diferentes enfermedades y en consecuencia, un aumento en el número de muertes [9].

1.3 CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . La MIC se ha establecido como el "estándar de oro" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado [11].

La concentración mínima inhibitoria, es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en condiciones normalizadas. Es el método mas utilizado para evaluar la sensibilidad a atibióticos en los laboratorios de microbiología clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas de referencia, con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias: S(sensible), I(intermedio), R(resistente).

- **Sensible:** si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.

- **Intermedia:** cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones.
- **Resistente:** si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento [9].

1.4 USO DEL GALIO COMO ANTIBIÓTICO. MECANISMO DE ACCIÓN

El galio es un elemento metálico del grupo 3A de la tabla periódica, con número atómico 31, peso atómico de 69,7 g/mol y punto de fusión 29,78 ° C. El galio ha atraído la atención de muchos investigadores para sus aplicaciones y usos potenciales en el tratamiento de diversas enfermedades tales como trastornos en la resorción ósea, enfermedades autoinmunes, ciertos tipos de cánceres y enfermedades infecciosas. El galio se usa en la clínica para el tratamiento de hipercalcemia, para la supresión de osteolisis y el tratamiento del dolor asociado con metástasis ósea. El uso de galio también se ha sugerido para el tratamiento de la osteoporosis [12].

En general se puede decir que el amplio espectro de acción farmacológico del galio es debido a la capacidad del Ga^{3+} en imitar Fe^{3+} , en particular por el hecho de que el radio iónico de los dos iones es casi idéntico. Así que muchos sistemas biológicos son incapaces de distinguir entre el Fe^{3+} y Ga^{3+} . El Ga^{3+} tiene la capacidad de interrumpir los procesos biológicos dependientes de Fe^{3+} , ya que, a diferencia de Fe^{3+} , Ga^{3+} no experimenta reducción en condiciones fisiológicas, lo que le impide participar en los procesos cruciales

que dependen del hierro. El ion Fe^{3+} es esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, ya que es necesario en muchas rutas metabólicas y la síntesis de ADN. Ga^{3+} se une a sitios Fe^{3+} de la transferrina, producida por las bacterias, y se incorpora por los fagocitos mononucleares en sitios de inflamación [12].

El metabolismo del Fe es un factor de vulnerabilidad bacteriana infecciosa, porque para la mayoría de los patógenos el Fe es esencial para el crecimiento y función de las enzimas, tales como las implicadas en la síntesis de ADN en el transporte de electrones durante la respiración y en la defensa contra el estrés oxidativo. El secuestro de ion férrico Fe^{3+} por portadores de hierro proteícos en el huésped es un mecanismo de defensa innato que limita la disponibilidad de hierro para los microbios patógenos por lo tanto previene la infección aguda y crónica. Los mecanismos de defensa del huésped limitan los niveles de hierro, y dada la importancia del hierro en la infección, la estrategia para alterar el metabolismo del hierro podría ser interesante para combatir microorganismos invasores. Sin embargo, la exploración del metabolismo del hierro como factor de vulnerabilidad de bacterias demuestra ser muy difícil. La terapia que utiliza la quelación de metal ha demostrado ser ineficaz, ya que algunos microorganismos son capaces de utilizar el hierro aún quelado[12].

Experimentalmente el Ga tiene una acción antimicrobiana debida a la capacidad para internalizarse en los microorganismos a través de sus mecanismos de transporte de hierro, lo que interfiere con el metabolismo del hierro y la síntesis de ADN y proteínas. Una estrategia reciente emplea el uso de Ga como un "caballo de Troya" para alterar el metabolismo bacteriano de

Fe. Se ha demostrado que el galio inhibe el crecimiento de las bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, previene la formación de biopelículas y tiene acción bactericida[12].

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, el galio interfiere con el transporte de Fe^{3+} , en condiciones limitantes de este metal. Este transporte se lleva a cabo mediante el sideróforo pioverdina, al cual adhiere Fe^{3+} con gran afinidad y lo transporta a la membrana donde es reducido a Fe^{2+} , para ser liberado por la pioverdina e internalizado, quedando la pioverdina libre para participar en un nuevo ciclo de transporte. El Ga también es capaz de unirse a la pioverdina y de secuestrarla impidiendo que ésta internalice hierro (Anexo A, Figura A1a)[13].

Además de este efecto extracelular, el galio en *P. aeruginosa* puede ser internalizado mediante el sistema transportador de hierro HitAB. Este sistema consta de dos proteínas: HitA, una proteína periplasmática que une Fe^{3+} y muy probablemente Ga^{3+} y HitB, una permeasa de membrana interna que transporta el hierro o galio unido a HitA al interior de la célula (Anexo A, Figura 1Ab) [13].

1.5 PIOVERDINA

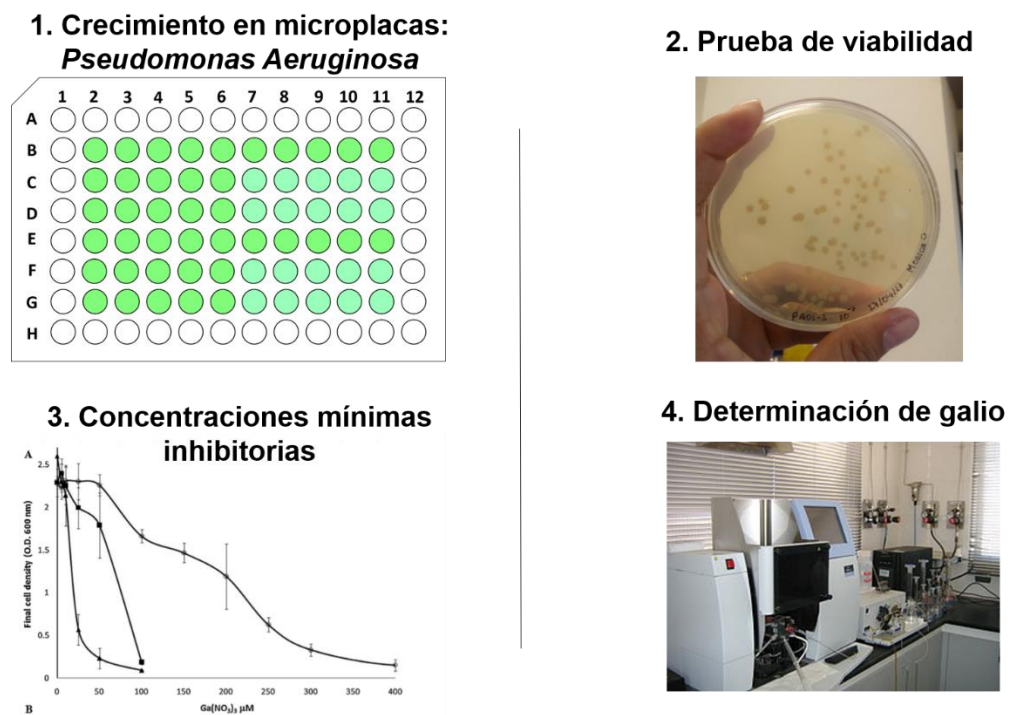
Pioverdina es el nombre genérico que se le da a una gran familia de pigmentos fluorescentes de color verde amarillento producidos por la especie de *Pseudomonas aeruginosa* [14].

P. aeruginosa es muy difícil de erradicar debido a una resistencia adaptativa a una amplia variedad de antibióticos clásicos. Cuando se someten a condiciones de inanición de hierro, la bacteria *Pseudomonas* sintetiza las pioverdinas, sus sideróforos primarios, para adquirir hierro del medio extracelular. Estas moléculas son transportadores de Fe^{3+} eficientes. Tres partes estructurales distintas constituyen las pioverdinas, es decir, (i) el cromóforo fluorescente, derivado de una dihidroxiquinolina, unido a través de su grupo carbonilo a (ii) un péptido específico de tipo compuesto de 6 a 14 aminoácidos y (iii) una pequeña cadena lateral correspondiente a un derivado de ácido carboxílico. Su estructura química muestra tres sitios quelatantes bidentados que incluyen un catecol y dos hidroxamatos, que conducen a una geometría octaédrica cuando forman complejos con el Fe^{3+} . Si bien el grupo cromóforo es común a todas las pioverdinas, su parte peptídica difiere entre las cepas y especies por el número, la longitud, la composición y la configuración de los aminoácidos [14].

2. METODOLOGÍA

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en cuatro fases. Las cuales se presentan en la Figura 1.

FIGURA 1. Metodología usada en el desarrollo del proyecto.



2.1 CRECIMIENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MICROPLACAS

2.1.1 Microorganismos y cultivo. Se utilizaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PA01, PA14, TC5 y E12. Se realizaron precultivos de cada cepa a partir de colonias individuales en 5 mL de medio LB (Anexo B), durante 16 horas, a 37°C y 200 rpm, se calculó la densidad óptica de cada pre-cultivo,

haciendo diluciones 1:10 (900 μL de agua destilada + 100 μL de muestra); esta dilución se vertió en una celda para leer la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro UV/Vis 1800 (Shimadzu, Japón).

Se realizaron cultivos de PA01, PA14 y TC5 en microplacas de 96 pozos con concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ de 20 μM y 200 μM en medio CAA (Anexo B) y cultivos de las cepas TC5 y E12 a 6 diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (40 μM , 60 μM , 80 μM , 100 μM , 120 μM y 150 μM), además de controles sin bacteria y sin Ga (extremos de la microplaca) y controles de las mismas concentraciones NaNO_3 en el mismo medio con el fin de confirmar que el nitrato no hace ningún aporte inhibitorio y una DO inicial de 0,05; las microplacas se inocularon a 37°C durante 72 horas sin agitación, haciendo mediciones de DO utilizando el espectrofotómetro especializado de ELISA cada 2 horas en ; Cada 24 horas se realizó un nuevo cultivo en una nueva microplaca con un volumen de 10 μL de inóculo del pase anterior y se incubó a las mismas condiciones de temperatura y concentración (microplaca anterior). En total se realizaron 10 pases para cada cepa estudiada.

2.2 PRUEBA DE VIABILIDAD

Para determinar la viabilidad de las células de *Pseudomonas aeruginosa* al finalizar las 24 horas de cultivo, se tomaron muestras de 100 μL de cada cultivo y se introdujeron en tubos eppendorf estériles, con 900 μL de solución salina NaCl 0.9% (ésteril), para realizar diluciones seriadas en factores de 10^{-1} hasta 10^{-10} . Posteriormente se colocaron 50 μL de muestra de cada dilución en cajas de Petri con LB- agar y se llevaron a incubación a 37°C durante 24 horas, pasado este tiempo se hizo conteo de unidades formadoras de colonias, lo cual indicó presencia de células vivas en el cultivo.

2.3 CÁLCULO DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.

2.3.1 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación. Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento se tomaron los datos de DO y se les aplicó logaritmo natural Ln, posteriormente estos nuevos valores se graficaron vs el tiempo de incubación, determinando gráficamente la fase exponencial y a ésta se le halló una línea de tendencia, generando así una regresión lineal y obteniendo la mejor ecuación de la recta teniendo en cuenta el coeficiente de determinación R². La pendiente de la recta se define como la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t) se calculó utilizando la ecuación 1.

$$t = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (1)$$

2.3.2 Número de generaciones. Partiendo de N células, a un tiempo determinado to se obtuvieron un número de células No. En la primera generación se duplicó el número de células 2No y así sucesivamente, al cabo de un tiempo determinado t el número de células determinadas fue $N = N_0 2^n$, siendo n el número de generaciones, por tanto esta dato se calculó utilizando la ecuación 2.

$$n = \frac{\log\left(\frac{N}{N_0}\right)}{\log(2)} \quad (2)$$

2.4 CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

Al finalizar los cultivos secuenciales, se tomó una azada de bacteria de cada pozo de la microplaca y se sembraron en cajas de Petri, se incubaron por 16 horas a 37°C; posteriormente se tomaron colonias individuales y se realizaron

precultivos en 5 mL de LB a 37°C durante 16 horas. Se prepararon tubos con medio de CAA a diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (0, 25, 50, 100, 200, 300 y 500 μM) y se inocularon con bacteria a una DO inicial de 0,05 y se incubaron a 37°C, 200 rpm durante 24 horas, finalizado este tiempo se procedió a la lectura de DO, se analizaron los datos estimando el MIC50 y el MIC100 graficamente para confirmar si se generó resistencia o sensibilidad.

2.5 DETERMINACIÓN DE GALIO

Al observar que algunas células del cultivo secuencial generaron resistencia según la prueba de concentraciones minimas inhibitorias, éstas se criopreservaron.

Para proceder con el protocolo de la determinación de galio, se sembraron las cepas resistentes en cajas de Petri con LB-agar, posteriormente se realizaron precultivos a partir de colonias individuales (37°C, 200 rpm durante 16 horas) en 5 mL de LB y se utilizaron para inocular microplacas de 12 pozos con una DO inicial de 0,05 en 5 mL de medio CAA en cada pozo, con 100 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a 37°C durante 24 a 48 horas.

Al finalizar el tiempo de incubación de cada microplaca, se procedió a leer la DO y se realizó el protocolo de la determinación de galio.

Las muestras se procesaron en un espectrofotómetro de absorción atómica AA240 (Agilent, USA) y estas fueron: Sobrenadante, lavado y pellet o pastilla, los cuales se obtuvieron de la siguiente manera.

Se tomaron 30 mL de cada cultivo y se llevaron a centrifugar en una microcentrífuga PRISMTM (Labnet, USA) por 1 minuto a 13000 rpm, de esta manera se obtuvo el sobrenadante, el cual se separó en un tubo diferente, quedando así el pellet para el tratamiento posterior.

Las pastillas se lavaron con 5 mL de amortiguador Tris 20 mM y pH 8,0 y se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto, quedando nuevamente un sobrenadante que en este caso es el lavado y la pastilla; este procedimiento se realizó con el fin de obtener la mayor cantidad de galio extracelular.

Finalmente el pellet se resuspendió en 1.5 mL de medio CAA fresco.

Cada muestra fue sometida a un procedimiento de digestión el cual está descrito en la tabla 1. Posteriormente se incubaron a 80°C durante 24 horas.

Al cumplir las 24 horas de incubación se verificó que las muestras se veían totalmente homogéneas, en caso contrario se incubaron por 1 hora más a 60°C. Posteriormente se filtraron las muestras con filtros de pirinola 0,22-0,44 µm de diámetro de poro, después de este procedimiento se realizó la medición.

TABLA 1. Digestión de muestras.

MUESTRAS	CANTIDAD	ACIDO NITRICO CONCENTRADO 96%
		CANTIDAD
SOBRENADANTE	5 mL	2,5 mL
LAVADO	5 mL	2,5 mL
PELLET	1,5 mL	1,5 mL

2.5.1 Espectrometría de absorción atómica: para la obtención de la curva de calibración se hizo pasar por el espectrofotómetro de absorción atómica AA240 (Agilent, USA) una muestra patrón de galio con diferentes concentraciones (0,5 ppm, 3 ppm, 7 ppm, y 10 ppm). Para cada medición se obtuvo curva de calibración (Anexo C).

Para la determinación de la presencia de galio, cada muestra fue sometida al tratamiento de digestión descrita anteriormente y medidas en el espectrómetro de absorción atómica.

3. RESULTADOS

3.1 CRECIMIENTO CELULAR *Pseudomonas aeruginosa*

El comportamiento de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para cada concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y sus respectivos controles con nitrato de sodio NaNO_3 , se muestran en las Figuras 2 , Figura 3, Figura 4 y Figura 5. En cada una de las curvas se especifica la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3 nombradas con las letras mayúsculas G(galio) C(control) acompañadas de números que indican la concentración de Ga y NO_3 a las que fueron expuestas las cepas. Se muestran únicamente las curvas de crecimiento del día 1 y del día 10 las cuales se indentifican con D1 y D10 respectivamente, con el fin de hacer una comparación de la actividad que realiza el galio al inicio y al final de cada experimento.

En cada uno de los experimentos se evidenció un cambio en el medio de cultivo (turbidez) lo que demuestra el crecimiento bacteriano. En las Figuras 2,3 y 4 se puede observar que los controles a diferentes concentraciones no comprometió el crecimiento bacteriano y tampoco las bacterias que fueron expuestas a 20 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

Las bacterias expuestas a 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, evidencia un bajo crecimiento comparado con su control a la misma concentración; este comportamiento confirma que el Ga sirve de agente antimicrobiano.

En la Figura 5 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa TC5, la cual se cultivó a diferentes concentraciones (40, 60, 80, 100, 120 y 150 μM de

Ga(NO₃)₃, en donde se evidencia que a bajas concentraciones de galio, la bacteria metaboliza el hierro presente en el medio de cultivo; mientras que a las concentraciones de 100, 120 y 150 μM de Ga(NO₃)₃ el crecimiento es bajo a lo largo de todos los pases, así como lo evidencia la gráfica del pase 10 en donde el crecimiento es casi nulo. En el Anexo D se muestran las curvas de crecimiento de la cepa E12 cultivada a las mismas condiciones.

FIGURA 2. Curvas de crecimiento PA01 expuestas a 20 μM y 200 μM de Ga(NO₃)₃ y NaNO₃.

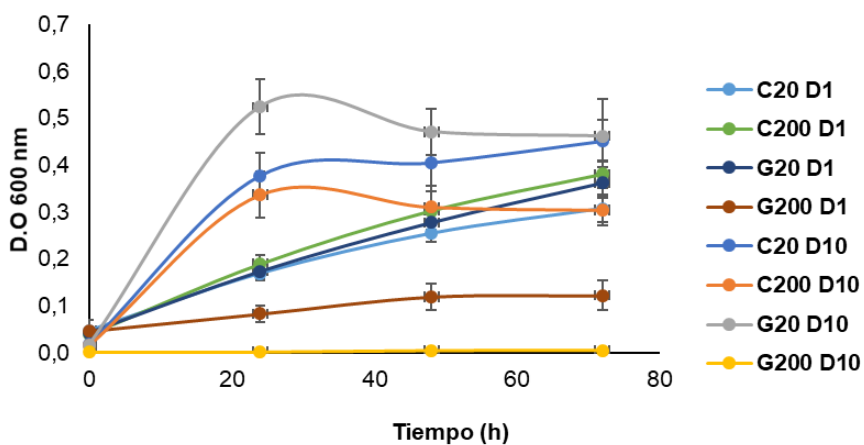


FIGURA 3. Curvas de crecimiento PA14 expuestas a 20 μM y 200 μM de Ga(NO₃)₃ y NaNO₃.

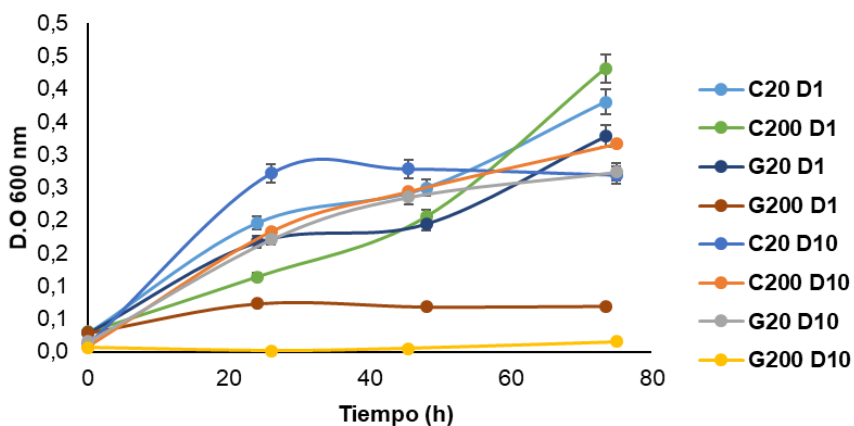


FIGURA 4. Curvas de crecimiento TC5 expuestas a 20 μM y 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3 .

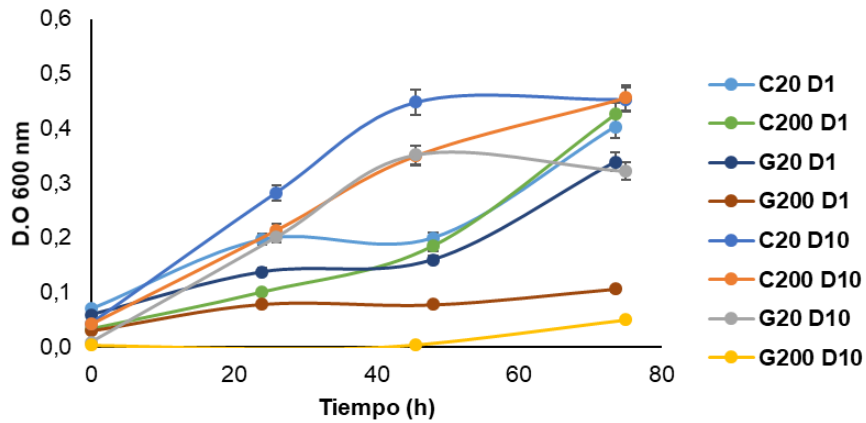
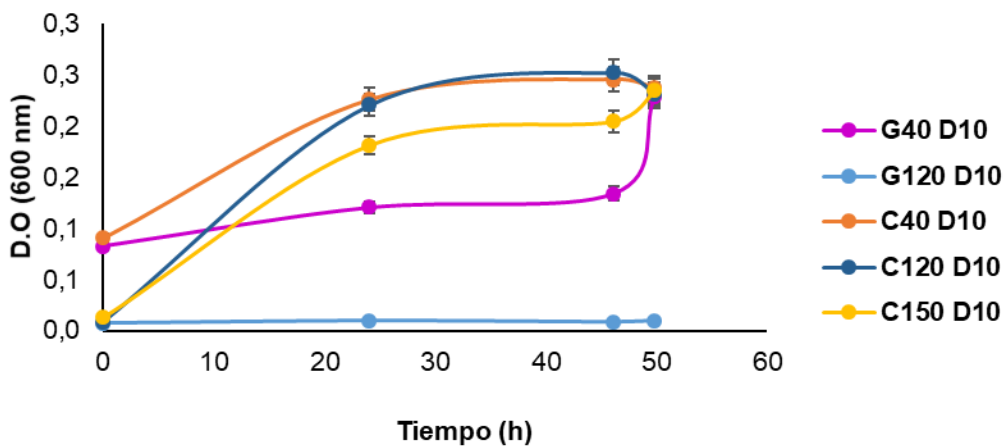
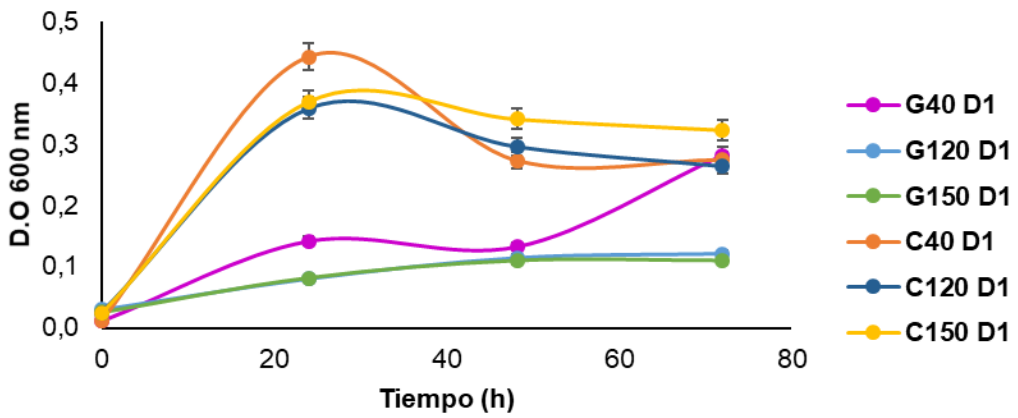


FIGURA 5. Curvas de crecimiento TC5 expuestas a diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3

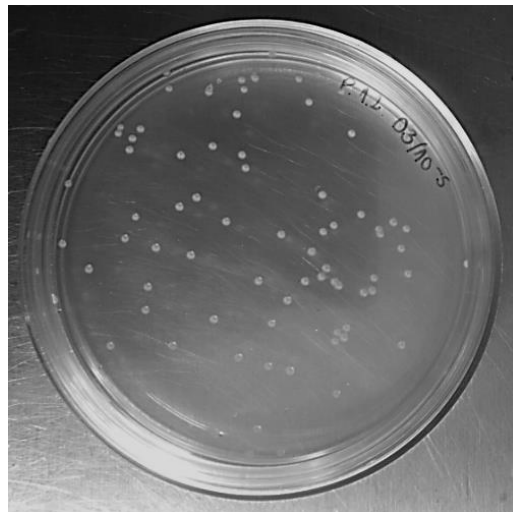


3.2 PRUEBA DE VIABILIDAD

La prueba de viabilidad se llevó a cabo con la técnica de conteo bacteriano, el cual señala la magnitud de la población total bacteriana comprobando que la actividad metabólica de cada bacteria seguía activa. En consecuencia se realizaron soluciones seriadas manteniendo constante el factor de dilución en cada paso, con el fin de que el conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) sea confiable.

Posteriormente se estimó el número de CFU en las cajas de Petri y se registraron, con el fin de verificar la presencia de células vivas en el cultivo.

FIGURA 6. Prueba de viabilidad. Técnica CFU

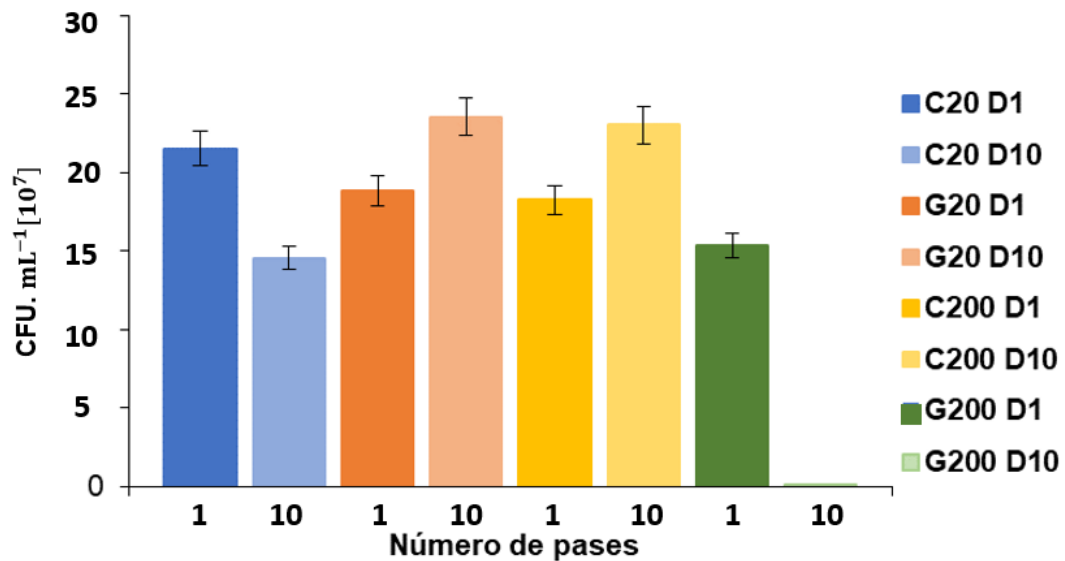


En la Figura 7 y 8 se muestra las células viables estimadas de las cepas PA01 y TC5 para los pases 1 y 10 de cada experimento. Cada valor está nombrado por una letra mayúscula correspondiente a control (C), Galio (G), un número

correspondiente a la concentración de NaNO_3 y $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 y 200 μM) y D1 y D10 que indican el número de pase.

Las cuentas viables registradas confirman lo que se evidenció en cada una de las curvas de crecimiento, en donde se muestra que la concentración de NaNO_3 no interfiere con el crecimiento y el metabolismo de las células tratadas, mientras que las altas concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ generan una disminución en el crecimiento.

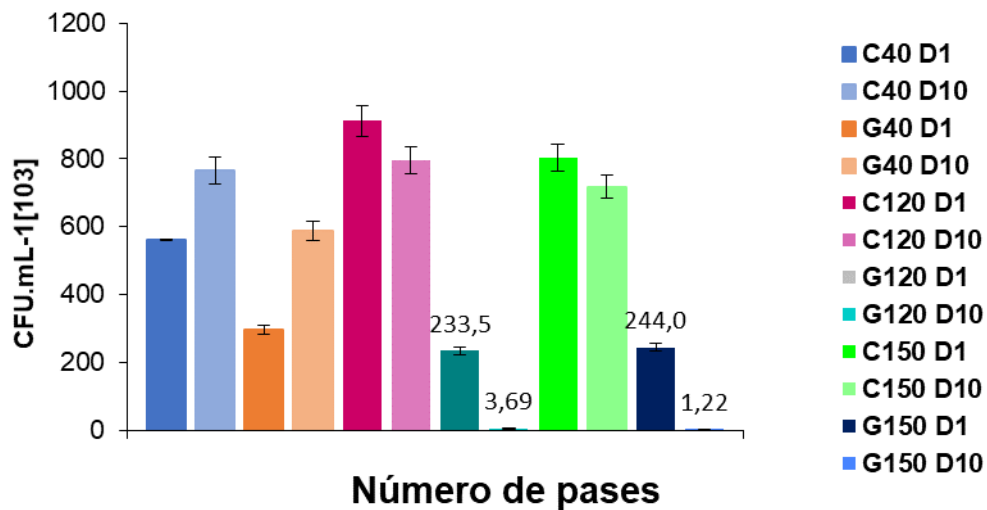
FIGURA 7. Cuentas viables cepa PA01



En la Figura 8 se graficaron los valores registrados de las cuentas viables de la cepa TC5 expuesta a diferentes concentraciones de NaNO_3 y su respectivo control a las mismas concentraciones. En donde se evidencia nuevamente que el nitrato no interfiere en el crecimiento y las bacterias que fueron expuestas a nitrato de galio se vieron altamente afectadas desde el pase 1, por ejemplo las células que fueron expuestas a 120 y 150 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ tuvieron células

viables en el rango de 10^3 de 233.5 CFU y 244 CFU respectivamente, las mismas concentraciones en el mismo rango en el pase 10 tiene una clara disminución llegando a 3.69 CFU con 120 μM y de 1.22 CFU con 150 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

FIGURA 8. Cuentas viables cepa TC5



El mismo comportamiento se evidencia en las cuentas viables de las cepas PA14 y E12 las cuales se muestran en el Anexo E.

3.3 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

3.3.1 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación: en el Anexo F se presentan los valores calculados correspondientes a velocidad específica y tiempo de duplicación, en donde se evidencia que en la cepa PA01 expuesta a 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en el pase 1, la velocidad específica y el tiempo de duplicación es de 0,2002 h⁻¹ y 3,462 h respectivamente, el control

a la misma concentración presenta una velocidad específica de 0,1667 h⁻¹ y tiempo de duplicación de 4,158 h, en este pase no se ve directamente afectada la cepa mientras que en los siguientes pases el crecimiento es bajo, esto se demuestra en el pase 10 ya que a la misma concentración la velocidad específica y el tiempo de duplicación fueron de 0,0263 h⁻¹ y 26,355 h respectivamente; los controles no se vieron afectados.

3.3.2 Número de generaciones: en la Tabla 2 se presentan de manera simplificada el número total de generaciones de cada una de las bacterias de los experimentos realizados. Los datos de número de generaciones especificados para cada uno de los pases y cada una de las cepas estudiadas, se encuentran en el Anexo G.

TABLA 2. Número de generaciones finales

NaNO ₃	PA01	PA14	TC5	E12	Ga(NO ₃) ₃	PA01	PA14	TC5	E12
[20uM]	42,96	52,12	31,78	-	[20uM]	43,60	49,95	60,00	-
[40 uM]	-	-	39,57	48,31	[40 uM]	-	-	47,03	52,80
[60 uM]	-	-	45,01	47,88	[60 uM]	-	-	48,12	43,61
[80 uM]	-	-	45,88	48,43	[80 uM]	-	-	38,11	31,22
[100 uM]	-	-	44,56	49,88	[100 uM]	-	-	27,87	21,61
[120 uM]	-	-	45,19	50,01	[120 uM]	-	-	16,83	17,60
[150 uM]	-	-	44,74	48,30	[150 uM]	-	-	12,62	14,13
[200 uM]	43,82	45,79	53,70	-	[200 uM]	12,28	33,47	53,70	-

Los cultivos con concentraciones bajas de Ga(NO₃)₃ no se vieron directamente afectados en el número de generaciones comparados con sus respectivos controles, mientras que los que se expusieron a concentraciones altas tales como 100, 120, 150 y 200 μM de Ga(NO₃)₃ tuvieron una disminución comparado con los cultivos de cada uno de los controles, lo que puede

significar que el Ga esta jugando un papel inhibitorio para el crecimiento de las bacterias.

3.4 CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

A continuación se muestran las concentraciones minimas inhibitoras de las cepas que se sometieron a diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Estas pruebas se realizaron al finalizar los 10 pases.

En la Figura 9 se muestran las curvas de las concentraciones minimas inhibitorias de PA01 parental y PA01 expuesta a $200\mu\text{M}$ de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. En donde se ve que la expuesta a galio genera un tipo de resistencia, ya que el MIC_{50} de la cepa parental es $\text{MIC}_{50}>100$ y un $\text{MIC}_{100}>200$ mientras que la cepa expuesta a galio durante los 10 pases muestra un $\text{MIC}_{50}>200$, por lo tanto se demuestra aparición de resistencia.

En la Figura 10 se presentan las MIC de las cepas PA14 Y TC5 expuestas a 20 y $200\mu\text{M}$ de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, a cada una de las cepas se les estimó el MIC_{50} y MIC_{100} y se muestran en la tabla 3 evidenciando selección de resistencia.

FIGURA 9. Concentraciones mínimas inhibitorias PA01

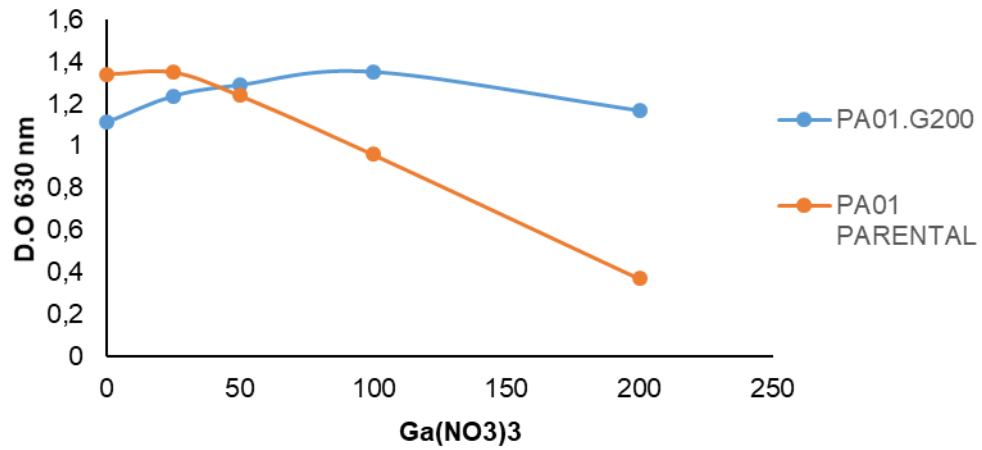
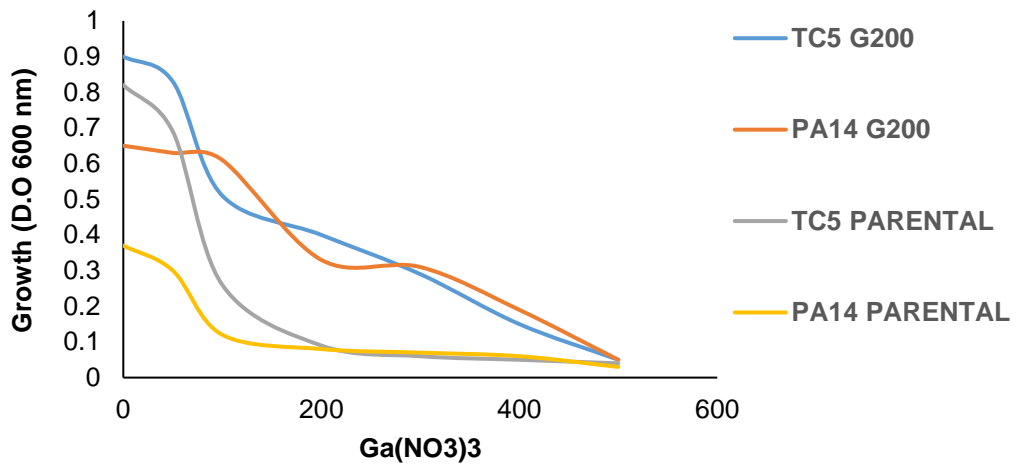


FIGURA 10. Concentraciones mínimas inhibitorias PA14 y TC5



A las cepas TC5 y E12 expuestas a diferentes concentraciones de Ga(NO₃)₃, no se les realizaron MIC.

Tabla 3. Concentraciones minimas inhibitorias PA14 y TC5

CEPA	MIC 50	MIC100
TC5 parental	<100	300
TC5 expuesta a 200µM de Ga(NO ₃) ₃	>100	500
PA14 parental	<100	500
PA14 expuesta a 200µM de Ga(NO ₃) ₃	>100	500

3.5 DETERMINACIÓN DE GALIO

Se determinó experimentalmente en donde se encontraba el galio al finalizar cada experimento por medio de espectrofotometría de absorción atómica, y los resultados se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Determinación de galio

CEPAS	PA01 C.	PA01 Ga	PA14 C.	PA14 Ga	TC5 C.	TC5 Ga	E12 C.	E12 Ga
	Ga							
Sobrenadante	ND	38,020	ND	19,297	ND	19,2252	ND	45,0502
Lavado	ND	ND	ND	2,511	ND	3,8737	ND	3,2999
Pellet	ND	59,397	ND	14,538	ND	17,4079	ND	63,8929
Total	-	96,7719	-	36,35	-	40,51	-	112,24

Las cepas PA01, PA14, TC5 Y E12 se inocularon con una DO inicial de 0,05, 37°C y 100µM de Ga(NO₃)₃ durante 24 (PA01) y 48 horas (PA14, TC5 y E12),

con el fin de determinar si el Ga estaba presente intra y/o extracelularmente. En todas las muestras expuestas a $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ el galio tiene presencia intra y extracelularmente, ya que en el sobrenadante y en el pellet se visualizan valores positivos, lo cual indica la presencia de Ga. Se inocularon controles con NaNO_3 correspondientes a cada una de las cepas a las mismas condiciones de cultivo en donde el resultado de galio fue no detectado ND, lo que indica la ausencia de galio en ellas.

4. CONCLUSIONES

La sobrevivencia de *Pseudomonas aeruginosa* está limitada por la concentración de hierro presente en el medio de cultivo, el cual se controló con 100 µg/L de transferrina humana que es una proteína transportadora específica de hierro y la cantidad de galio en el medio dependió de la concentración a la cual se expusieron cada una de las cepas. Al finalizar los 10 pases consecutivos se realizaron pruebas de viabilidad que demostraron que a altas concentraciones de galio la sobrevivencia de la bacteria es baja.

El número de generaciones de las cepas expuestas a galio, son bajas con respecto a cada control. El galio genera un efecto “inhibitorio” al secuestrar la pioverdina, pero se concluye que finalmente las células seleccionan resistencia, tal y como lo demuestra el aumento en las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas expuestas a galio.

Se demostró experimentalmente que las células internalizan galio ya que en la prueba de espectrofotometría de absorción atómica, se encuentra galio en el pellet lo que indica presencia de éste en el interior de las células.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] O'NEILL, Jim. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. En: Review on Antimicrobial Resistance. 2014
- [2] POOLE, Keith. Pseudomonas aeruginosa: resistance to the max. En: Frontiers Spotlight. 2011
- [3] KANEKO, Yukihiro; THOENDEL, Matthew; OLAKANMI, Oyebode; BRITIGAN, Bradley and SINGH, Pradeep. The Transition metal gallium disrupts Pseudomonas aeruginosa iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity.2017
- [4] GARCIA CONTRERAS, Rodolfo; LIRA SILVA, Elizabeth; JASSO CHAVEZ, Ricardo; HERNANDEZ GONZÁLEZ, Ismael L; MAEDA, Toshinari; HASHIMOTO, Takahiro; BOOGERD, Fred C; SHENG, Lili; WOOD, Thomas K; MORENO SÁNCHEZ, Rafael. Isolation characterization of gallium resistant Pseudomonas aeruginosa mutants. En: International Journal of Medical Microbiology. 2013
- [5] BONCHI,C; IMPERI,F; MINANDRI,F; VISCA,P; FRANGIPANI,E. Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy. En: BioFactors 40, 303-312. 2014
- [6] HIJAZI, Sarah; VISCA, Paolo; FRANGIPANI, Emanuela. Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits Pseudomonas aeruginosa Growth by Targeting Cytochromes. En: Frontiers Spotligh. 2017
- [7] BROOKS, Geo; CARROLL, Karen; BUTEL, Janet; MORSE, Stephen; MIETZNER, Timothy. Microbiología médica. Mc Graw hill, 2001. p. 227
- [8] SAAVEDRA, Sandra Yamile; DUARTE, Carolina; González, María Nilse; REALPE, María Elena. Caracterización de aislamientos de

Pseudomonas aeruginosa productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. En: Biomédica [en línea].2014

- [9] GARBAYO HERMOSO, Laura "¿Qué es la Resistencia Bacteriana y cómo afecta a nuestra salud". {En línea} {14 septiembre 2018} disponible en (www.ceac.es/blog/que-es-la-resistencia-bacteriana-y-como-afecta-nuestra-salud).
- [10] BAENE FÉREZ, Ivan. Resistencia Bacteriana: Principios Fundamentales para la Práctica Quirúrgica. En: Revista Colombiana de cirugía.
- [11] ANDREWS, Jennifer. Determination of minimum inhibitory concentrations. En: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volumen 48, 2001. p. 5-16.
- [12] BERALDO, Hebisa. Uso de galio como antibiótico: Mecanismos de acción.
- [13] GARCIA CONTRERAS, Rodolfo; GONZÁLEZ TINOCO, Yael; ANGARITA ZAPATA, Vanesa; FLOREZ DUARTE, Monica Paola; PEREZ ERETZA, Fabiola Berenice; HERNANDEZ PORRAS, Yahira; SANCHEZ TORRES, Viviana. El galio como un nuevo antimicrobiano para combatir infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. Mensaje Bioquímico. 2018
- [14] CÉZARD, C; FARVACQUES, N; SONNET,P. Chemistre and biology of pyoverdines, Pseudomonas primary siderophores. En: NCBI, Curr Med Chem.2015

[15] GILLESPIE, Adin Ross; WEIGERT, Michael; BROWN, Sam P; KUMMERLI, Rolf. Gallium-mediated siderophore quenching as an evolutionarily robust anticacterial treatment. En: Evolution Medicine, & Public Health. 2014

BIBLIOGRAFÍA

ANDREWS, Jennifer. Determination of minimum inhibitory concentrations. En: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volumen 48, 2001. p. 5-16.

BERALDO, Hebisa. Uso de galio como antibiótico: Mecanismos de acción.

BONCHI,C; IMPERI,F; MINANDRI,F; VISCA,P; FRANGIPANI,E. Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy. En: BioFactors 40, 303-312. 2014

CÉZARD, C; FARVACQUES, N; SONNET,P. Chemistre and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. En: NCBI, Curr Med Chem.2015

GARCIA CONTRERAS, Rodolfo; LIRA SILVA, Elizabeth; JASSO CHAVEZ, Ricardo; HERNANDEZ GONZÁLEZ, Ismael L; MAEDA, Toshinari; HASHIMOTO, Takahiro; BOOGERD, Fred C; SHENG, Lili; WOOD, Thomas K; MORENO SÁNCHEZ, Rafael. Isolation characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants. En: International Journal of Medical Microbiology. 2013

GILLESPIE, Adin Ross; WEIGERT, Michael; BROWN, Sam P; KUMMERLI, Rolf. Gallium-mediated siderophore quenching as an evolutionarily robust anticacterial treatment. En: Evolution Medicine, & Public Health. 2014

HIJAZI, Sarah; VISCA, Paolo; FRANGIPANI, Emanuela. Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes. En: Frontiers Spotlighth. 2017

KANEKO, Yukihiro; THOENDEL, Matthew; OLAKANMI, Oyebode; BRITIGAN, Bradley and SINGH, Pradeep. The Transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity.2017

ANEXOS

ANEXO A. Mecanismos antibacterianos del galio

FIGURA A 1. Mecanismos antibacterianos del galio

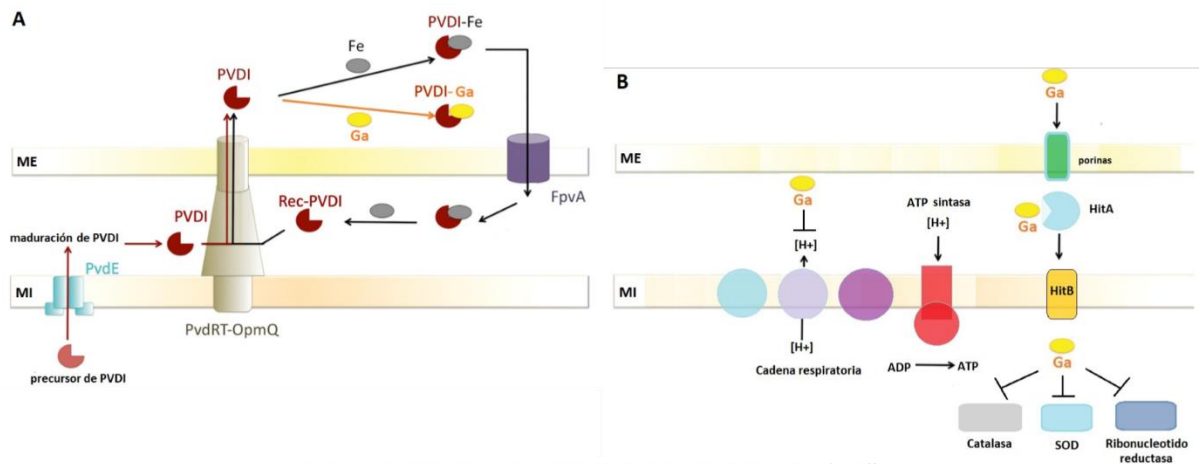


Figura 1 Mecanismos antibacterianos del galio. a) El galio extracelular puede secuestrar a la pioverdina [PVDI] sideróforo principal de *P. aeruginosa*, interfiriendo con su función transportadora de hierro. ME [membrana externa], MI [membrana interna], PvdE [transportador del precursor de pioverdina al espacio periplásmico], PvdRT-OpmQ [bomba transportadora de pioverdina del espacio periplásmico al exterior de la célula], Rec-PVDI [pioverdina reciclada], FpvA [Receptor transportador de ferri-pioverdina]. b) El galio se internaliza al espacio periplásmico mediante porinas y es capaz de incorporarse e inhibir a la cadena respiratoria. Se internaliza al citoplasma mediante el sistema HitAB e intracelularmente se incorpora e inhibe a enzimas importantes para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno como la catalasa y la superóxido dismutasa [SOD] y para la síntesis de ADN [ribonucleotido reductasa].

Fuente [13]

ANEXO B. Medios de cultivo

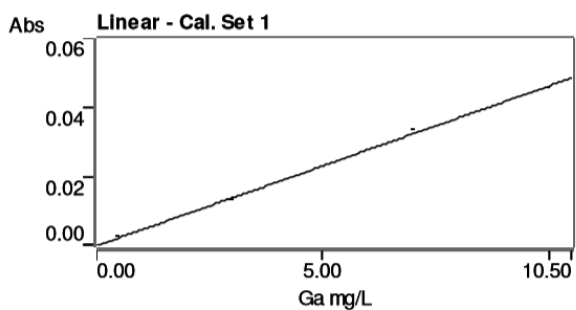
NOMBRE	COMPONENTE	CANTIDAD (1 Litro)
Luria Bertani (LB)	NaCl	10 gramos
	Extracto de levadura	5 gramos

	Triptona	10 gramos
--	----------	-----------

NOMBRE	COMUPUESTO	CANTIDAD
Casaminoácidos (CAA)	Casaminoácidos	5 g/L
	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1.18 g/L
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g/L
	Transferrina humana	100 μ g/ml
	$NaHCO_3$	20 mM
	Buffer HEPES	25 mM

ANEXO C. Curva de calibración

Sample ID	Conc mg/L	%RSD	Mean Abs		
CAL ZERO	0.00	11.0	-0.0007		
	Readings				
	-0.0006	-0.0007	-0.0008	24/07/2018	11:13:46 AM
STANDARD 1	0.50	7.0	0.0026		
	Readings				
	0.0028	0.0025	0.0026	24/07/2018	11:14:02 AM
STANDARD 2	3.00	1.4	0.0133		
	Readings				
	0.0131	0.0133	0.0135	24/07/2018	11:14:22 AM
STANDARD 3	7.00	0.6	0.0334		
	Readings				
	0.0335	0.0331	0.0334	24/07/2018	11:14:40 AM
STANDARD 4	10.00	0.4	0.0452		
	Readings				
	0.0451	0.0454	0.0452	24/07/2018	11:14:58 AM

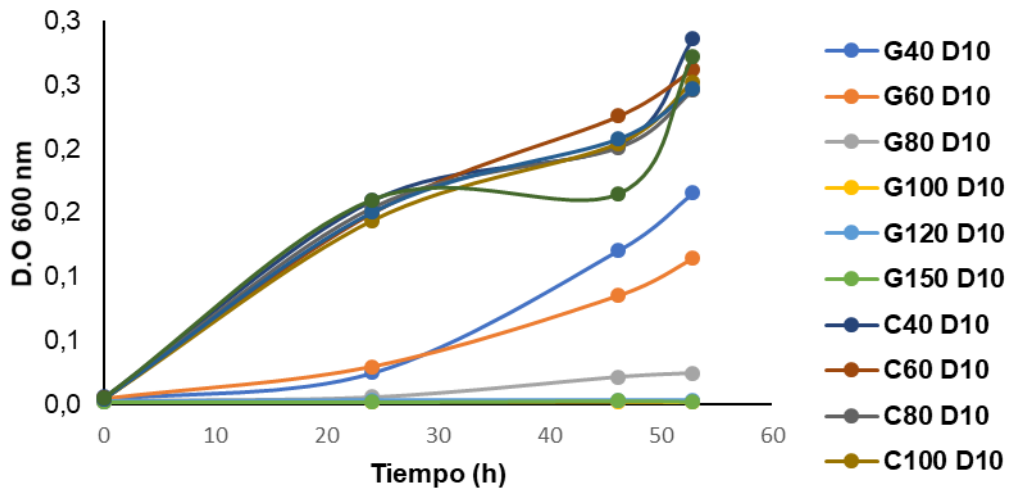
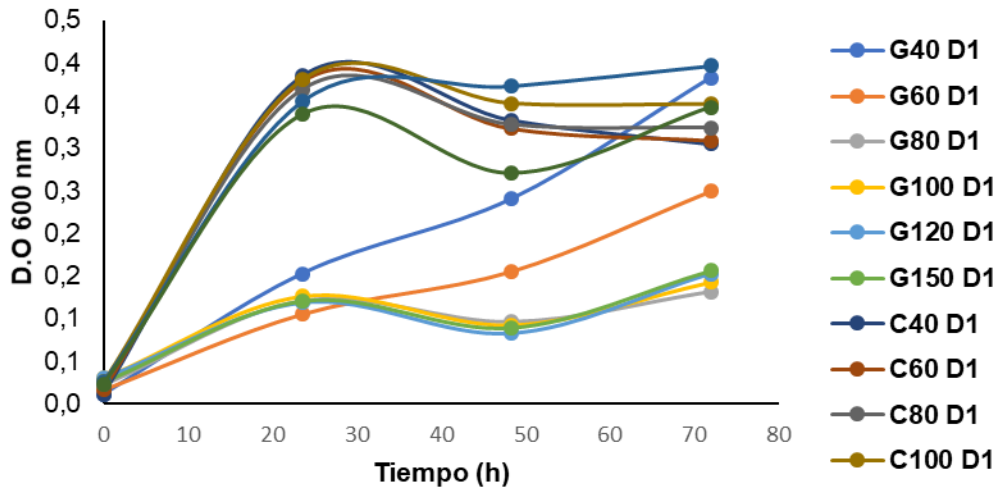


Curve Fit = Linear
 Characteristic Conc = 0.98 mg/L
 r = 0.9991
 Calculated Conc = -0.12 0.60 2.92 7.26 9.83
 Residuals = 0.12 -0.10 0.08 -0.26 0.17

$$\text{Abs} = 0.00461 \times C - 0.00014$$

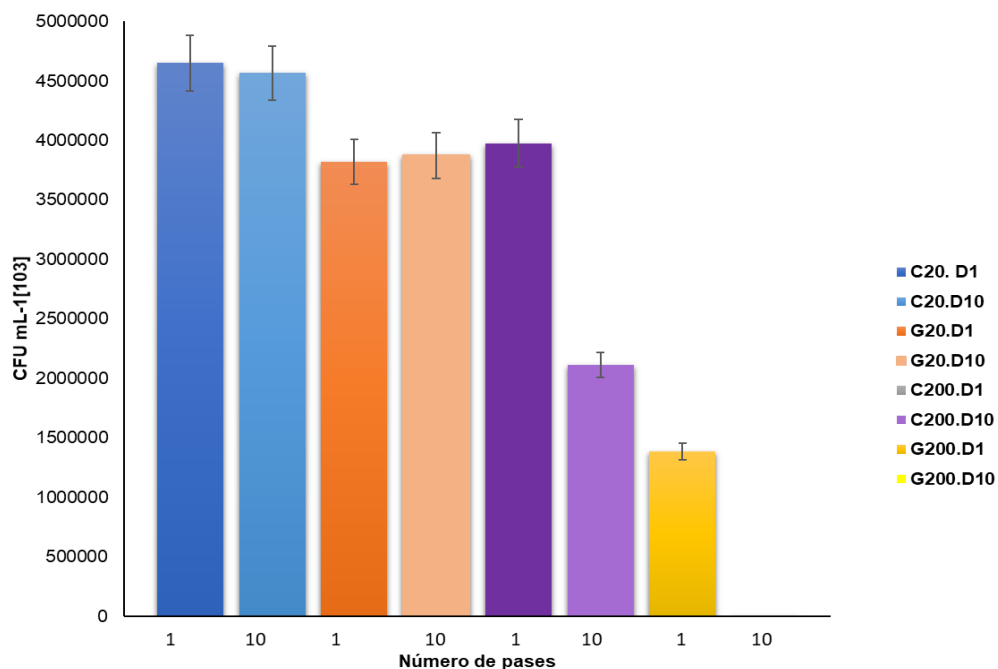
ANEXO D. Curvas de crecimiento cepa E12

FIGURA D 1. Curvas de crecimiento E12 a diferentes concentraciones

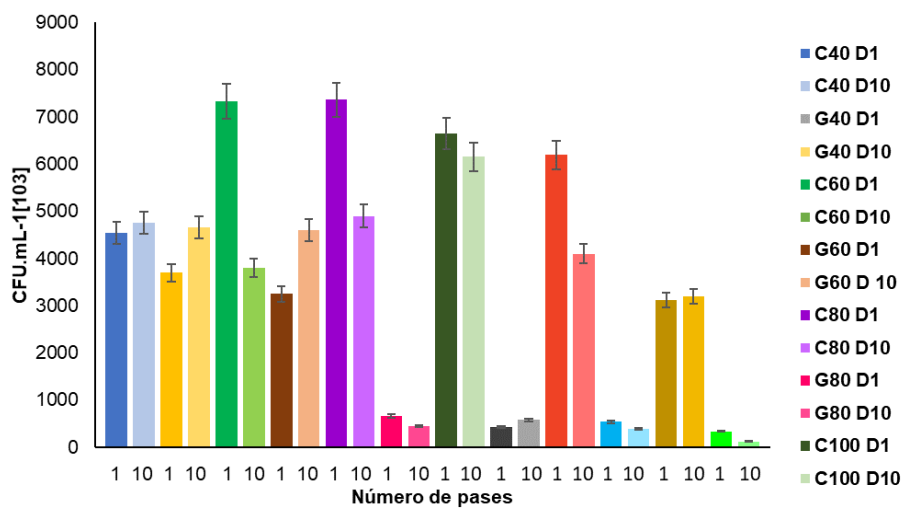


ANEXO E. Cuentas viables

FIGIRA E 1. Cuentas viables PA14 20 Y 200 μM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3



FIGIRA E 2. Cuentas viables E12 a diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y NaNO_3



ANEXO F. Velocidad específica y tiempo de duplicación

PASE 1			
CEPA	VELOCIDAD ESPECIFICA	TIEMPO DE DUPLICACION	R^2
PA01 + NaNO3 [20uM]	0.1509	4.593	0.9992
PA01 + Ga(NO3)3 [20uM]	0.1418	4.888	0.9792
PA01 + NaNO3 [200uM]	0.1667	4.158	0.9919
PA01 + Ga(NO3)3 [200uM]	0.2002	3.462	1
PA14 + NaNO3 [20uM]	0.2873	2.413	1
PA14 + Ga(NO3)3 [20uM]	0.1922	3.606	0.9645
PA14 + NaNO3 [200uM]	0.2809	2.468	0.9242
PA14 + Ga(NO3)3 [200uM]	0.2628	2.638	1
TC5 + NaNO3 [20uM]	0.0418	16.582	0.9869
TC5 + Ga(NO3)3 [20uM]	0.1648	4.206	0.8893
TC5 + NaNO3 [40uM]	0.4908	1.412	0.9653
TC5 + Ga(NO3)3 [40uM]	0.2687	2.580	0.9593
TC5 + NaNO3 [60uM]	0.6088	1.139	0.987
TC5 + Ga(NO3)3 [60uM]	0.179	3.872	0.9275
TC5 + NaNO3 [80uM]	0.3622	1.914	0.9636
TC5 + Ga(NO3)3 [80uM]	0.2048	3.385	0.9796
TC5 + NaNO3 [100uM]	0.3323	2.086	0.9642
TC5 + Ga(NO3)3 [100uM]	0.1556	4.455	0.9755
TC5 + NaNO3 [120uM]	0.3218	2.154	0.9665
TC5 + Ga(NO3)3 [120uM]	0.1627	4.260	0.9343
TC5 + NaNO3 [150uM]	0.3222	2.151	0.9527
TC5 + Ga(NO3)3 [150uM]	0.2169	3.196	0.9893
PA14 + NaNO3 [200uM]	0.1252	5.536	0.9229
PA14 + Ga(NO3)3 [200uM]	0.0715	9.694	0.995
E12 + NaNO3 [40uM]	0.132	5.251	0.937
E12 + Ga(NO3)3 [40uM]	0.0835	8.301	0.8890
E12 + NaNO3 [60uM]	0.1211	5.724	0.9649
E12 + Ga(NO3)3 [60uM]	0.0594	11.669	0.8916
E12 + NaNO3 [80uM]	0.1098	6.313	0.9696
E12 + Ga(NO3)3 [80uM]	0.057	12.160	0.8614
E12 + NaNO3 [100uM]	0.1047	6.620	0.9654
E12 + Ga(NO3)3 [100uM]	0.0491	14.117	0.8971

E12 + NaNO3 [120uM]	0.1007	6.883	0.9553
E12 + Ga(NO3)3 [120uM]	0.0462	15.003	0.8757
E12 + NaNO3 [150uM]	0.1014	6.836	0.9441
E12 + Ga(NO3)3 [150uM]	0.0534	12.980	0.8504

	PASE 10		
CEPA	VELOCIDAD ESPECIFICA	TIEMPO DE DUPLICACION	R^2
PA01 + NaNO3 [20uM]	0.1084	6.394	0.8686
PA01 + Ga(NO3)3 [20uM]	0.1215	5.705	0.9862
PA01 + NaNO3 [200uM]	0.12	5.776	0.8419
PA01 + Ga(NO3)3 [200uM]	0.0263	26.355	0.9191
PA14 + NaNO3 [20uM]	0.1249	5.550	0.8494
PA14 + Ga(NO3)3 [20uM]	0.1004	6.904	0.9688
PA14 + NaNO3 [200uM]	0.1252	5.536	0.9229
PA14 + Ga(NO3)3 [200uM]	0.0715	9.694	0.995
TC5 + NaNO3 [20uM]	0.0821	8.443	0.9744
TC5 + Ga(NO3)3 [20uM]	0.1325	5.231	0.9785
TC5 + NaNO3 [40uM]	0.3223	2.151	0.9837
TC5 + Ga(NO3)3 [40uM]	0.1065	6.508	0.9625
TC5 + NaNO3 [60uM]	0.322	2.153	0.9937
TC5 + Ga(NO3)3 [60uM]	0.1027	6.749	0.9994
TC5 + NaNO3 [80uM]	0.107	6.478	0.8862
TC5 + Ga(NO3)3 [80uM]	0.0264	26.256	0.8764
TC5 + NaNO3 [100uM]	0.3386	2.047	0.936
TC5 + Ga(NO3)3 [100uM]	0.0861	8.050	0.9757
TC5 + NaNO3 [120uM]	0.3089	2.244	0.963
TC5 + Ga(NO3)3 [120uM]	0.0444	15.611	0.9407
TC5 + NaNO3 [150uM]	0.245	2.829	0.9646
TC5 + Ga(NO3)3 [150uM]	0.1384	5.008	0.8538
PA14 + NaNO3 [200uM]	0.0809	8.568	0.9899
PA14 + Ga(NO3)3 [200uM]	0.0985	7.037	0.9813
E12 + NaNO3 [40uM]	0.1306	5.307	0.9643
E12 + Ga(NO3)3 [40uM]	0.1013	6.843	0.9499
E12 + NaNO3 [60uM]	0.1344	5.157	0.9443

E12 + Ga(NO ₃) ₃ [60uM]	0.0639	10.847	0.9516
E12 + NaNO ₃ [80uM]	0.1285	5.394	0.8974
E12 + Ga(NO ₃) ₃ [80uM]	0.0489	14.175	0.9801
E12 + NaNO ₃ [100uM]	0.1545	4.486	0.9534
E12 + Ga(NO ₃) ₃ [100uM]	-	-	-
E12 + NaNO ₃ [120uM]	0.1423	4.871	0.8238
E12 + Ga(NO ₃) ₃ [120uM]	0.0178	38.941	0.9995
E12 + NaNO ₃ [150uM]	0.4002	1.732	0.9628
E12 + Ga(NO ₃) ₃ [150uM]	-	-	-

ANEXO G. Número de generaciones

PASES	PA01 + NaNO3 [20]	PA01 + Ga(NO3)3 [20]	PA01 + NaNO3 [200]	PA01 + Ga(NO3)3 [200]
1	2.7027644	3.28850021	3.08484019	1.40622711
2	5.27781262	5.34924504	5.48565666	0.81308754
3	4.43700297	4.94516184	4.75461977	0.38765601
4	4.28209559	4.64077067	4.26287343	1.7249879
5	4.30476021	3.68309391	4.33969096	2.08953251
6	3.69924876	3.78510202	3.70076001	-0.84396258
7	4.42687926	4.22937495	4.34686621	1.05136118
8	4.67306704	5.22389797	4.67678016	1.55281624
9	4.44235804	4.1536167	4.32436514	1.99637665
10	4.71132154	4.29878252	4.84050136	2.09770687
TOTAL	42.9573104	43.5975458	43.8169539	12.2757894

PASES	PA14 USA + NaNO3 [20uM]	PA14 USA + Ga(NO3)3 [20uM]	PA14 USA + NaNO3 [200uM]	PA14 USA + Ga(NO3)3 [200uM]
1	3.7483	3.8440	3.5049	1.2968
2	5.6052	5.8990	5.3956	4.0245
3	5.2738	6.4760	1.5387	5.5155
4	5.4607	5.8318	5.5580	4.1248
5	5.7366	5.1093	5.3374	3.5825
6	5.8737	4.1228	4.4440	3.3141
7	5.3487	5.1720	5.0821	4.4072
8	6.0217	4.5524	5.0779	3.1236
9	4.5737	4.7933	4.6146	2.8310
10	4.4741	4.1537	5.2392	1.2509
TOTAL	52.1166	49.9543	45.7925	33.4707

PASES				

	TC5 + NaNO3 [20uM]	TC5 + Ga(NO3)3 [20uM]	TC5 + NaNO3 [200uM]	TC5 + Ga(NO3)3 [200uM]
1	2.5322	3.7116	2.5227	1.8337
2	3.2803	6.9569	2.8907	4.8342
3	3.3049	6.4690	3.2998	7.0663
4	1.9732	7.0857	3.5667	9.3331
5	3.2875	6.5507	3.3749	1.4723
6	3.6130	6.5685	3.6184	6.4813
7	3.4212	6.2640	3.3848	7.0364
8	3.6363	6.1257	3.3683	6.5667
9	3.3235	5.0362	3.1745	5.3015
10	3.4123	5.2354	3.4552	3.7717
TOTAL	31.7844	60.0036	32.6559	53.6971

TC5						
PASES	NaNO3					
	[40 uM]	[60 uM]	[80 uM]	[100 uM]	[120 uM]	[150 uM]
1	4.6039	4.0713	3.6238	3.3504	3.3938	3.8010
2	5.3614	5.3961	5.4434	4.9865	4.4988	4.5117
3	4.9016	4.7664	5.1325	4.8153	4.8575	5.2606
4	3.6282	4.3379	3.1920	3.3223	3.3975	3.9790
5	3.3191	3.8904	4.9466	4.9070	5.1565	5.8390
6	3.5369	5.4353	5.5491	6.0990	6.1672	5.6957
7	4.9186	4.9997	5.2593	4.4917	4.9066	4.0359
8	4.6125	3.5423	4.9791	4.7363	4.7717	4.6706
9	3.2997	3.5890	3.5383	3.2706	3.3323	2.7738
10	1.3880	4.9805	4.2150	4.5816	4.7127	4.1776
TOTAL	39.5700	45.0089	45.8792	44.5609	45.1946	44.7448
PASES	Ga(NO3)3					
	[40 uM]	[60 uM]	[80 uM]	[100 uM]	[120 uM]	[150 uM]
1	4.6839	3.4011	2.1654	1.6229	2.0179	2.1075
2	6.7256	6.6023	6.5207	3.2062	2.4981	2.2571
3	5.9506	6.2454	6.7765	6.3431	5.3586	5.1480
4	4.9753	4.6213	3.1333	3.3325	1.2908	0.4891
5	5.5254	5.6475	5.7382	4.0458	2.4298	0.3197

6	4.2502	4.9026	4.0843	1.4399	0.7976	-0.0181
7	3.5554	4.3350	4.4057	3.1481	0.5563	0.4531
8	5.1835	5.9357	3.4413	0.6734	0.4181	0.3084
9	4.7117	1.8230	0.4958	0.6716	1.0382	1.3855
10	1.4644	4.6031	1.3530	3.3914	0.4205	0.1682
TOTAL	47.0261	48.1170	38.1142	27.8749	16.8260	12.6185

E12						
PASE	NaNO3					
	[40 µM]	[60 µM]	[80 µM]	[100 µM]	[120 µM]	[150 µM]
1	4.7532	4.2415	3.8802	3.8059	3.9773	3.9056
2	5.2577	5.1901	5.6465	5.9485	5.9606	5.3129
3	4.7537	4.7268	4.8763	4.8631	4.7480	4.9265
4	4.6707	3.7790	4.5785	4.0472	4.0043	3.7820
5	3.9196	4.2980	4.4677	5.0112	4.9835	5.1294
6	4.9591	5.6799	4.9151	5.4013	5.4304	5.6677
7	4.6725	4.7394	4.8790	4.9600	5.1540	4.8954
8	4.9884	4.8761	4.8931	4.8813	5.1101	4.2032
9	4.7437	4.6717	4.5826	5.1778	4.8938	4.8213
10	5.5890	5.6818	5.7098	5.7857	5.7524	5.6578
TOTAL	48.3077	47.8843	48.4290	49.8822	50.0144	48.3017
PASE	Ga(NO3)3					
	[40 µM]	[60 µM]	[80 µM]	[100 µM]	[120 µM]	[150 µM]
1	5.1214	3.9801	2.6224	2.2553	2.3492	2.6216
2	6.6532	6.8460	5.0949	4.1267	3.7428	3.2287
3	5.5120	6.4228	6.5987	6.4496	5.7926	5.2921
4	4.9006	3.7012	2.3401	2.5631	2.1500	0.6800
5	5.3998	5.4719	3.0211	0.0870	-0.4319	-0.4859
6	5.3402	4.2947	0.3855	0.7787	0.7146	0.8561
7	5.4334	0.0385	0.2506	0.3547	-0.0158	0.1930
8	5.0354	4.9120	5.6984	4.2103	1.5026	0.6432
9	4.0602	3.3575	2.2378	0.8572	1.3547	1.0589
10	5.3453	4.5856	2.9745	-0.0680	0.4414	0.0422
TOTAL	52.8014	43.6103	31.2240	21.6146	17.6003	14.1299