



TRABAJO DE FIN DE GRADO

ANÁLISIS DEL BLOQUEO DEL RECICLAJE DE LA PARED CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE β -LACTAMASAS SOBRE EL *FITNESS* Y VIRULENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MODELO INVERTEBRADO

Carlos Ramón Pallín

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-2020



Universitat
de les Illes Balears



ANÁLISIS DEL BLOQUEO DEL RECICLAJE DE LA PARED CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE β -LACTAMASAS SOBRE EL *FITNESS* Y VIRULENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* EN MODELO INVERTEBRADO

Carlos Ramón Pallín

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Islas Baleares

Año Académico 2019-2020

Palabras clave del trabajo:

Pseudomonas aeruginosa, peptidoglicano, β -lactamasa. virulencia

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Carlos Juan Nicolau

Departament de Biologia, Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Física, Química

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	



Universitat
de les Illes Balears



AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al grupo de investigación en Microbiología del Hospital Universitario Son Espases por el excelente trato que me han brindado durante mi periodo de prácticas, en especial al Dr. Carlos Juan Nicolau, tutor del presente Trabajo de Fin de Grado, que desde el primer momento mostró un extraordinario interés en conseguir mi óptimo aprendizaje en este determinante tramo de mi formación universitaria.

Agradecer también la dedicación de todos los profesores que han estado presentes durante mi formación en el Grado de Bioquímica; y a mis compañeros, algunos ya amigos, por hacer más fácil el día a día de estos 4 años.

No quiero olvidarme de todos mis amigos, que han estado en las buenas y en las no tan buenas, siempre alegrando mis días.

Dejo para el final a mi familia, mis padres y mi hermano, que han sido y serán imprescindibles y que me han apoyado en todos los momentos de esta etapa de mi vida.



ÍNDICE

ABSTRACT – RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : características generales.....	3
1.2 Relevancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.3 Resistencia a β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i> : adquisición horizontal de β -lactamasas.....	5
1.4 Resistencia a β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i> : regulación de la β -lactamasa cromosómica AmpC y su relación con el metabolismo de la pared celular (peptidoglicano).....	9
1.5 Relación entre el metabolismo del peptidoglicano, la regulación de β -lactamasas y la virulencia.....	12
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y soluciones utilizadas.....	15
3.2 Extracción de plásmidos y transformación (electroporación) en <i>P. aeruginosa</i>	16
3.3 Comprobación por PCR específicas de los plásmidos transformados.....	18
3.4 Modelo de infección en el invertebrado <i>Galleria mellonella</i>	19
3.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIONES.....	26
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27

ABSTRACT - RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa is one of the main nosocomial Gram-negative pathogens, whose clinical importance is enhanced by its great capacity for antibiotic resistance development. In the current scenario of effective antipseudomonal drugs shortage, is of paramount importance to develop new therapeutic options, among them those oriented to reduce *P. aeruginosa* virulence. It has been previously shown that the simultaneous combination of: i) cell-wall (peptidoglycan) recycling blockade, and ii) hyper-production of the chromosomal AmpC β -lactamase, causes a dramatic impairment in *P. aeruginosa* fitness and virulence. Through the present study we sought to ascertain if these previous observations are exclusively associated to AmpC hyper-production, or could also be linked to other horizontally acquired β -lactamases. PAO1 reference strain [wildtype and NagZ (PA Δ nZ) or AmpG (PA Δ AG) KO mutants, which are blocked in the peptidoglycan recycling] were transformed with the following horizontal β -lactamases cloned in the multicopy plasmid pUCP24: GES-1 (Class A), VIM-1 (Class B), FOX-8 (Class C), OXA-2 (Class D) and its extended spectrum derivatives OXA-144 and OXA-161. The wax moth *Galleria mellonella* was used as infection model to assess virulence: our results indicate that, contrarily to the other tested β -lactamases, the AmpC and OXA-type β -lactamases hyper-expression (mainly the extended-spectrum variants, especially OXA-161) entailed an important impairment for *P. aeruginosa* virulence principally visible in peptidoglycan recycling-defective backgrounds. These data may be useful for future anti-virulence therapies' design in the future.

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales patógenos nosocomiales Gram-negativos, cuya importancia clínica se ve reforzada por su gran capacidad de desarrollo de resistencia a los antibióticos. En el escenario actual de escasez de medicamentos antipseudomónicos efectivos, es de suma importancia desarrollar nuevas opciones terapéuticas, entre ellas aquellas destinadas a reducir la virulencia de *P. aeruginosa*. Se ha demostrado en trabajos previos que la combinación simultánea de: i) bloqueo del reciclaje de la pared celular (peptidoglicano), y ii) hiperproducción de la β -lactamasa cromosómica AmpC, causa un gran descenso en el *fitness* y la virulencia de *P. aeruginosa*. A través del presente estudio buscamos determinar si estas observaciones previas están asociadas exclusivamente a la hiperproducción de AmpC, o también podrían estar vinculadas a otras β -lactamasas adquiridas horizontalmente. La cepa de referencia PAO1 [salvaje y los mutantes KO para NagZ (PA Δ nZ) o AmpG (PA Δ AG), que están bloqueados en el reciclaje de peptidoglicano] se transformaron con las siguientes β -lactamasas horizontales clonadas en el plásmido multicopia pUCP24: GES-1 (Clase A), VIM-1 (Clase B), FOX-8 (Clase C), OXA-2 (Clase D) y sus derivados de espectro extendido OXA-144 y OXA-161. La polilla de la cera *Galleria mellonella* se utilizó como modelo de infección para evaluar la virulencia: nuestros resultados indican que, a diferencia de las otras β -lactamasas probadas, la hiperexpresión de las β -lactamasas AmpC y OXA (principalmente las variantes de espectro extendido, y especialmente OXA-161) conllevó un deterioro importante para la virulencia de *P. aeruginosa* principalmente visible en un *background* defectivo en el reciclado del peptidoglicano. Estos datos pueden ser útiles para el diseño de futuras terapias anti-virulencia en el futuro.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*: características generales.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria clasificada en el filo Proteobacteria, la clase Gammaproteobacteria, el orden Pseudomonadales, la familia Pseudomonadaceae y, finalmente, el género *Pseudomonas*.

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo no formador de esporas con una anchura de 0,5-1 μm y una longitud de 1,5-5 μm . Presenta una morfología ligeramente curvada o recta que habitualmente presenta un flagelo que le proporciona movilidad, si bien es cierto que, sobre todo en cepas procedentes de infección crónica, es frecuente la pérdida del flagelo debido a la selección de ciertas mutaciones ^{1,2}.

Metabólicamente, su versatilidad le permite utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos (más de 80) como fuente de carbono y energía. Presenta un metabolismo respiratorio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque en condiciones de anaerobiosis puntuales es capaz de utilizar el nitrógeno como aceptor alternativo. Es catalasa y oxidasa positivo y no tiene capacidad para fermentar la lactosa. Su temperatura de crecimiento óptima es de 37°C, aunque puede crecer desde los 4°C hasta los 42°C ³.

La secuenciación completa del genoma de PAO1 (en el año 2000), una de las cepas de referencia de *P. aeruginosa*, demostró la gran complejidad de este microorganismo: un tamaño genómico de aproximadamente 6,3 millones de pares de bases, siendo uno de los genomas bacterianos más extensos jamás secuenciados; y la presencia de alrededor de 5.500 marcos abiertos de lectura (ORF), de los cuales se desconoce la función de una gran proporción. Esta complejidad genómica refleja la gran capacidad de *P. aeruginosa* de resistir a antibióticos y otros estreses físicoquímicos. De hecho, el nivel de resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* es una de sus principales características, y es un tema que será abordado en los siguientes apartados ⁴.

En placa, las colonias de *P. aeruginosa* son generalmente grandes, planas, con bordes serrados, con brillo metálico y con un olor dulce similar al de la uva. También podemos encontrarlas con una morfología mucoide o en forma de colonias pequeñas (*small colony variants*, SCV), normalmente asociadas a infecciones pulmonares crónicas. Además, muchas cepas de este microorganismo están caracterizadas por la producción de pigmentos (**Figura 1.1**), como la pioverdina (sideróforo amarillo-verdoso hidrosoluble fluorescente al ser iluminado con luz ultravioleta), la piocianina (pigmento azulado), la piomelanina (pigmento marrón) o la piorrubina (pigmento rojo), si bien es cierto que también existen cepas no productoras de pigmento (por selección de mutaciones), frecuentemente aisladas de infección crónica ¹.

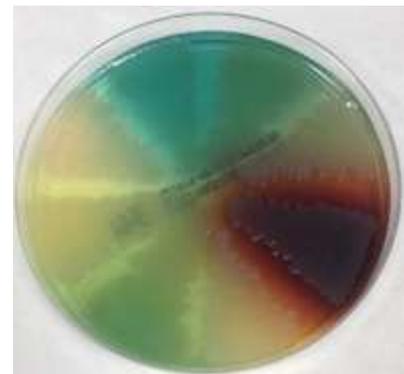


Figura 1.1 Diversidad de pigmentos que produce *P. aeruginosa* en una placa de Müller-Hinton Agar ⁷.

P. aeruginosa es una especie bacteriana prácticamente ubicua, aunque con una gran afinidad por los ambientes húmedos. Presenta una gran capacidad de supervivencia en condiciones físicoquímicas adversas que le permite colonizar multitud de nichos ecológicos ambientales, así como los seres vivos. Su hábitat incluye ambientes naturales (suelos, acumulaciones de aguas...), domésticos (duchas, baños, cosméticos...) y hospitalarios (sistemas de ventilación, equipos de respiración asistida, soluciones de limpieza...). La tasa de colonización en personas sanas es baja, pudiéndose encontrar principalmente formando parte de la

microbiota del tubo digestivo; esta tasa aumenta en pacientes hospitalizados intubados y/o que han sido tratados con antibióticos de amplio espectro, afectando a las vías respiratorias baja ⁵.

1.2 Relevancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista y uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales. En pocas ocasiones *P. aeruginosa* infecta a personas sanas, de manera que uno de los prerequisites para que se produzca la infección es, en general, la pérdida de la integridad epitelial, que permite la entrada del patógeno a regiones corporales teóricamente estériles, hecho muy habitualmente ligado a la aplicación de tratamientos invasivos, tales como cirugías, sondas urinarias o aparatos de respiración asistida, claves en la generación de bacteriemias, infecciones urinarias o neumonías. Las situaciones de inmunodepresión, especialmente cuando se produce un descenso en el número de neutrófilos (neutropenia), son también un claro factor de riesgo para el desarrollo de infección por *P. aeruginosa*.

La virulencia de este microorganismo no se debe a un único determinante, por lo que su patogénesis es multifactorial. La mayoría de cepas son citotóxicas y/o invasivas ya que producen en su superficie factores de virulencia que permiten su adhesión, colonización e invasión de tejidos, además de secreciones que lo dañan e inducen la secreción de citoquinas inflamatorias. Entre los factores de virulencia podemos destacar el flagelo, las diferentes adhesinas, la exotoxina A, las enzimas proteolíticas LasA y LasB y el alginato (parte fundamental de los *biofilms*), entre muchos otros ^{1,5}.

Las infecciones causadas por este microorganismo van desde cutáneas, de poca importancia, hasta sepsis fulminantes. Según el Estudio EPINE (Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España)-EPPS (*European Point Prevalence Survey*) realizado en 2016 (hws.vhebron.net/epine/), *P.aeruginosa* representó el 7,2% de microorganismos aislados en pacientes con infección comunitaria, entre las que destacan como más habituales la foliculitis y la otitis externa, ambas de baja gravedad. También puede causar la otitis externa maligna o necrotizante, una infección ótica más grave que puede llegar a dañar los nervios craneales y los huesos de la base del cráneo; más común en ancianos y enfermos de SIDA ⁶. En cuanto a las infecciones oculares, se da principalmente en usuarios de lentillas con soluciones de limpieza contaminadas y suelen ocasionar queratitis ⁸. Aunque es poco frecuente, *P. aeruginosa* también puede causar neumonía adquirida en la comunidad (NAC), afectando principalmente a fumadores expuestos a aerosoles contaminados ⁹.

Donde adquiere más importancia *P. aeruginosa* es en el ambiente hospitalario, ya que se trata de uno de los principales agentes causales de infecciones nosocomiales. Según el Estudio EPINE-EPPS, representó el 10,5% de los aislamientos en pacientes con infección nosocomial, afectando principalmente al aparato respiratorio en forma de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) que presenta una mortalidad de aproximadamente el 50% ¹⁰. Además, supone un grave problema en la UCI donde es el principal patógeno implicado en infecciones agudas de quemaduras y del aparato respiratorio. *P. aeruginosa* también es responsable de infecciones en pacientes hospitalizados con cáncer u otras patologías de base como la diabetes en las que son tratados con inmunodepresores, donde la mortalidad puede llegar al 50% ¹¹.

En individuos con enfermedades pulmonares crónicas, como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y Fibrosis Quística (FQ), infecta crónicamente hasta el 80% de los pacientes, tapizando el epitelio pulmonar formando un *biofilm*, y siendo prácticamente imposible eliminar su presencia. En estas situaciones no

se produce infección constante de las células, sino más bien una colonización crónica con pocas consecuencias clínicas. Sin embargo, cuando se produce un sobrecrecimiento bacteriano (que ocurre periódicamente), se provoca en el hospedador una situación similar a una infección aguda, conocida como exacerbación, que causa un aumento drástico de la inflamación, finalmente autolesiva que empeora la función pulmonar y el estado clínico del paciente^{12,13}.

Como se ha mencionado anteriormente, la capacidad de resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* es una de sus principales características, obviamente de gran impacto clínico. Podemos distinguir la resistencia intrínseca de la bacteria (aquella causada por genes codificados y funcionales en su genoma, expresados de forma basal), de aquella adquirida durante la vida de la misma a través de distintos mecanismos, y cuya fuerza motora es la presión selectiva ejercida por los tratamientos antibióticos.

En cuanto a la resistencia intrínseca, *P. aeruginosa* presenta altos niveles conseguidos a lo largo de su evolución para poder tener mayor capacidad de competición en el ambiente natural, basados en:

- 1) La inactivación enzimática del antibiótico (en este caso, afectando a los β -lactámicos), a través de la expresión natural de la β -lactamasa cromosómica AmpC, que afecta a amoxicilina, ampicilina y a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, con la excepción de ceftazidima¹⁴.
- 2) Reducción de la concentración intracelular del antibiótico gracias a multitud de sistemas de bombas de expulsión de tóxicos codificadas en el genoma (como MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprM etc.), que en conjunto, e incluso a niveles basales de expresión, afectan en cierta medida a prácticamente todas las familias de antibióticos¹⁵.

En cuanto a la resistencia adquirida, *P. aeruginosa* la puede conseguir a través de dos mecanismos:

- 1) Selección de mutaciones en genes cromosómicos, que conducen por ejemplo a alteraciones en la diana de los antibióticos (como ocurre con las topoisomerasas, diana de las quinolonas), hiperexpresión estable de las previamente mencionadas bombas de expulsión o AmpC (lo cual naturalmente aumenta su rendimiento), o incluso pérdida de la expresión de porinas por las que de forma normal accedería el antibiótico (como el caso de la porina OprD para los carbapenems)¹⁶.
- 2) Adquisición horizontal de genes de resistencia: a través de elementos móviles como plásmidos o transposones, y que permiten adquirir β -lactamasas y/o enzimas modificantes de aminoglucósidos. Este tema se abordará en profundidad en el apartado siguiente.

Además, *P. aeruginosa* presenta la capacidad de desarrollar *biofilms*, sobre todo en pacientes crónicos como los citados de EPOC o FQ. Estos *biofilms* son biopelículas bacterianas formadas por secreciones principalmente de exopolisacáridos y ácidos nucleicos que le confieren otro mecanismo de resistencia y adaptación, ya que dificultan enormemente la difusión del antibiótico y de los componentes del sistema inmunitario¹⁷.

1.3 Resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*: adquisición horizontal de β -lactamasas.

La adquisición horizontal de genes requiere de elementos móviles como transposones o plásmidos que permiten el intercambio genético intraespecie o interespecie. *P. aeruginosa* puede adquirir y transferir horizontalmente principalmente dos tipos de genes: β -lactamasas y enzimas modificantes de aminoglucósidos, que suelen estar localizados en integrones de clase 1, que a su vez están situados en los citados transposones o plásmidos.

Los integrones son una familia de elementos génicos potencialmente móviles, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a antibióticos. Los integrones presentan en sus extremos 5' y 3', delimitando las regiones con genes de resistencia, las secuencias de ADN conservadas: 5' (5'-CS) de aprox. 1,4 kb y 3' (3'-CS) de aprox. 2 kb. La región 5'-CS codifica para el gen de la integrasa (*intI*) que constituye una tirosina-recombinasa y, adyacente a ésta, aparece el sitio de recombinación específico *attI*, donde se integra el casete génico de resistencia por recombinación con su sitio *attC* gracias a la integrasa. Para una recombinación de alta eficiencia, se requiere un sitio *attI* de 65 pb y un lugar de recombinación con la secuencia conservada: GTTRRRY (R: purina, Y: pirimidina), que es compartida con la región *core* situada en el *attC* de los casetes génicos. Entre *intI* y *attI* hay dos promotores divergentes: P_i para expresar la integrasa y P_c para expresar los casetes génicos insertados^{18,19}.

Se han descrito cinco clases de integrones que difieren entre sí básicamente en la secuencia del gen de la integrasa *intI*. En *P. aeruginosa*, predominan los integrones de clase 1 (Figura 1.2). La integrasa de tipo 1

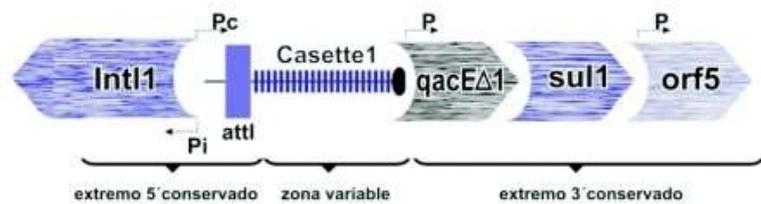


Figura 1.2 Esquema de la estructura de un integrón de clase 1⁵⁶.

(IntI1) es una proteína de 337 aminoácidos que reconoce las regiones de recombinación *attI1*, *attC* y otros secundarios. El extremo 3'-CS presenta tres marcos de lectura abiertos: *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que corresponden a: un derivado truncado del gen *qacE* que confiere resistencia a amonios cuaternarios, un gen que confiere resistencia a sulfonamidas y un gen de función desconocida; respectivamente. Entre los extremos 5'-CS y 3'-CS, se encuentra la zona variable que puede codificar multitud de casetes génicos de resistencia¹⁹.

Las β-lactamasas son enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β-lactámico, inactivándolo, y obviamente confiriendo a la bacteria productora, resistencia al antibiótico en cuestión. Las bacterias, en un proceso adaptativo a lo largo de la evolución, han sido capaces de producirlas y modular su expresión en función de la presencia o no de antibióticos naturales en el medio, habiendo aparecido promotores más eficaces, ciertos sistemas de regulación, e incluso un mayor número de copias del gen de algunas β-lactamasas. Actualmente se han descrito más de 1000 β-lactamasas, por esta razón se han propuesto varias clasificaciones²⁰. Las más importantes son:

- Clasificación funcional: basada en el perfil del sustrato, la sensibilidad a inhibidores de β-lactamasas, la localización cromosómica y/o plasmídica de sus genes codificantes, o la inducibilidad de su expresión²¹.
- Clasificación molecular (o clasificación de Ambler): basada en la interacción enzima-sustrato y la secuencia aminoacídica de las β-lactamasas. Se distinguen cuatro clases: A, B, C y D. Las de clase B son metaloenzimas, por lo que requieren Zn en su centro activo; el resto posee una serina en el centro activo²².

Las β-lactamasas adquiridas horizontalmente que clásicamente se consideraban más frecuentes en *P. aeruginosa* son:

- Tipo PSE (*Pseudomonas-specific enzyme*) (clase A): PSE-1 y -4 son las β-lactamasas más comunes en aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a β-lactámicos, aunque tienen un impacto clínico limitado al hidrolizar preferentemente penicilinas, a las cuales *P. aeruginosa* ya es bastante resistente a través de otros mecanismos intrínsecos²³.

- Tipo OXA (clase D): se han descrito más de cien variantes, de las cuales en *P. aeruginosa* se suelen encontrar las OXA-1, -2, -4 y -10, que afectan preferentemente a aminopenicilinas, oxacilina, cloxacilina y algunas cefalosporinas. Los clásicos inhibidores de β -lactamasas, el ácido clavulánico y el tazobactam, tienen generalmente un nivel bajo de inhibición sobre las OXA; en cambio, el NaCl es un inhibidor fuerte. Todas estas β -lactamasas son conocidas como *narrow spectrum*, dada la relativa estrechez del abanico de β -lactámicos que pueden hidrolizar ²⁴.

A partir de la década de 1990, han aparecido las llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que otorgan un espectro más amplio de resistencia, siendo capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ejemplos: ceftazidima y cefepima, respectivamente) y los monobactámicos (aztreonam), pero generalmente no afectan a los carbapenémicos. Destacan:

- PER-1 (clase A): β -lactamasa que confiere una gran resistencia a ceftazidima y algo menos a penicilinas, cefotaxima y aztreonam. Mantiene su sensibilidad al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam ²⁵.
- Tipo GES (*Guiana extended-spectrum*) (clase A): actualmente hay reconocidas 26 variantes, presentan un perfil hidrolítico similar a otras BLEE de clase A, siendo activas frente a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, pero no frente a cefamicinas y carbapenémicos (excepto GES-2, -4, -5, -6, -11 y -18). Son inhibidas por tazobactam, ácido clavulánico e imipinem ²⁶.
- OXA de espectro extendido (clase D): pequeños cambios en sus secuencias aminoacídicas amplifican su espectro de hidrólisis, afectando a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactámicos y penicilinas antipseudomónicas, aunque no a los carbapenémicos. Además, muestra una débil inhibición por el ácido clavulánico ²⁷.
- Tipo VEB (*Vietnamese extended-spectrum β -lactamases*) (clase A): β -lactamasas con gran actividad hidrolítica frente a ceftazidima, cefotaxima y aztreonam, mucho menor frente a penicilinas, y es inhibible por avibactam ²⁸.
- Tipo BEL (clase A): tipo de β -lactamasas que en su primera variante [descrita en 2004 (BEL-1)] presenta actividad hidrolítica frente a la mayoría de cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam y es inhibida por cefoxitina, ácido clavulánico, imipinem, moxalactam y tazobactam. En 2007, se aisló la variante BEL-2, con una mayor actividad frente a cefalosporinas de espectro extendido. Además, en 2010 se detectó la variante BEL-3 que presenta actividad contra los carbapenémicos ^{29,30}.
- PME (*Pseudomonas aeruginosa ESBL*)-1 (clase A): β -lactamasa que hidroliza ceftazidima, cefotaxima y aztreonam, y es inhibida por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam ³¹.

Actualmente, la creciente aparición de cepas de *P. aeruginosa* portadoras de carbapenemasas supone un grave problema sanitario ya que los carbapenems han sido antibióticos a los que se ha recurrido como recurso de emergencia con mucha frecuencia para tratar las infecciones por esta especie, sobretudo a finales del siglo XX y principios del siglo XXI. Dentro de las carbapenemasas distinguimos:

- Carbapenemasas de clase A:
 - o Tipo GES: solo las GES-2, -4, -5, -6, -11 y -18 presentan actividad carbapenemasa, aunque baja hidrólisis sobre monobactámicos ³².
 - o Tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*): descritas originalmente en *K. pneumoniae* se han descrito las variantes KPC-2 y KPC-5 en *P. aeruginosa*. Su espectro hidrolítico incluye

todos los β -lactámicos, aunque es mucho menos eficaz frente a los monobactámicos y carbapenémicos que contra las penicilinas y cefalosporinas ³³.

- Metalo- β -lactamasas (MBL) (clase B): es el grupo más relevante debido a la gran diversidad en cuanto a variaciones aminoacídicas así como por su diseminación ³⁴. Destacan:
 - o Tipo IMP y VIM: dentro de las metalo- β -lactamasas son las más extendidas. Presentan actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftazidima y cefepima), penicilinas y carbapenémicos (imipinem y meropenem). Ambas son inhibidas por EDTA. Las VIM parecen tener mayor eficiencia hidrolítica que las IMP ^{34,35}. Desde la detección de IMP-1 (en 1991) en *Serratia marcescens* se han descrito más de 50 variantes aminoacídicas, de las cuales al menos 33 se han encontrado en *P. aeruginosa* ³⁶. Por otro lado, desde la primera detección de VIM-1 (en 1997), en *P. aeruginosa* se han descrito más de 45 variantes, alrededor de 25 en esta especie; entre ellas, VIM-13 y su variante VIM-47, que son autóctonas de las Islas Baleares ³⁷.
 - o NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*)-1: una de las β -lactamasas descritas más recientemente (2008) en *K. pneumoniae*, aunque ya se han descrito casos en *P. aeruginosa* ³⁸.
 - o Tipo SPM (*Sao Paulo metallo- β -lactamase*), GIM (*German imipenemase*) y SIM (*Seoul imipenemase*): presentan un único representante por grupo y parecen tener una localización geográfica restringida, solo SPM-1 se ha detectado en brotes más generalizados de cepas portadoras. SPM, GIM y SIM presentan una identidad de secuencia aminoacídica con IMP del 35%, 40 % y 69%; respectivamente ^{39,40,41}.
 - o FIM (*Florence imipenemase*)-1: aislada en 2012 en una cepa multirresistente de *P. aeruginosa* con una identidad del 40% con NDM-1 y caracterizada por una actividad hidrolítica amplia, especialmente sobre carbapenémicos y penicilinas ⁴².
 - o HMB (*Hamburg metallo- β -lactamase*)-1: detectada en 2012 en una cepa multirresistente de *P. aeruginosa*, presentando gran actividad frente a carbapenémicos ⁴³.
- OXA con actividad carbapenemasa (clase D): presentan una acción modesta frente a los carbapenémicos, aunque superior al efecto sobre las cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos. Se trata de un grupo que presenta unas 50 variantes aminoacídicas, y se han subdividido en nueve subfamilias: 1) OXA-23, 2) OXA-24, 3) OXA-51, 4) OXA-58, 5) OXA-55, 6) OXA-48, 7) OXA-50, 8) OXA-60, 9) OXA-62. En *P. aeruginosa* solo se ha detectado la OXA-40 (España) y la OXA-198 (Bélgica) ³³.

Como conclusión, cabe añadir que, si bien es cierto que algunas de las mencionadas β -lactamasas adquiridas tienen una capacidad hidrolítica limitada sobre determinados β -lactámicos *in vitro*, dado el elevado nivel de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, su adquisición por parte de esta bacteria da lugar a niveles clínicamente significativos de resistencia. En otras palabras, la resistencia que confiere una β -lactamasa concreta en *P. aeruginosa* es mayor que el que conferiría a otra especie bacteriana. Ello, unido a la continua detección de nuevas variantes aminoacídicas de las mencionadas β -lactamasas, a menudo con mejoras en su espectro/eficiencia de hidrólisis, pone de manifiesto la gravedad del problema clínico que estos determinantes implican, sobretodo en *P. aeruginosa*.

1.4 Resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*: regulación de la β -lactamasa cromosómica AmpC y su relación con el metabolismo de la pared celular (peptidoglicano).

Pseudomonas aeruginosa, así como las bacterias Gram-negativas, posee una pared celular formada por la membrana externa (a la cual se ancla el lipopolisacárido), el periplasma, y una fina capa de peptidoglicano (PGN). El PGN es una macromolécula constituida por cadenas lineales de disacáridos de N-acetilglucosamina (NAG) y de ácido N-acetilmurámico (NAM), unidos por enlaces β -1,4. Al NAM se le une inicialmente un pentapéptido [L-alanina (L-ala) – D-glutamato – ácido meso-diaminopimélico (DAP) (característico de Gram-negativos) – D-ala – D-ala], que a su vez se enlaza al pentapéptido del NAM de otra cadena de disacáridos (en Gram-negativos esta unión se produce directamente), formándose una estructura muy resistente. El entrecruzamiento peptídico o transpeptidación habitualmente tiene lugar entre el tercer aminoácido del pentapéptido de una cadena [DAP, en Gram-negativos] y la D-ala de la cuarta posición del pentapéptido de otra cadena.

Aproximadamente el 50% del PGN de la mayoría de Gram-negativos se degrada durante cada generación para permitir el aumento de tamaño y la división celular ⁴⁴. En este proceso participan autolisinas periplásmicas, que rompen, entre otros, los enlaces entre D-ala y DAP de las cadenas peptídicas entrecruzadas, y transglicosilasas líticas que escinden los enlaces entre las unidades disacáridicas, produciendo monómeros de anhidromuropéptidos (NAG–1,6-anhidroNAM–péptidos). Por otro lado, únicamente el 10% de los fragmentos generados durante la replicación se libera al medio, siendo el resto de componentes liberados del PGN internalizados al citoplasma para su reutilización, por lo que se produce un proceso de reciclaje, y por tanto, de ahorro de energía, muy eficiente ⁴⁵. Este proceso empieza con el transporte de los NAG-1,6-muropéptidos acumulados en el espacio periplásmico al citoplasma a través de AmpG, una permeasa específica. En el citoplasma, la β -N-acetilglucosaminidasa NagZ elimina las unidades de NAG, generando 1,6-anhidromuropéptidos (1,6-anhidroNAM–péptidos). Finalmente, sobre éstos actúa la amidasa AmpD, obteniéndose péptidos libres y NAM que serán reincorporados a la ruta biosintética del PGN.

Para el reciclaje de los productos generados (sin perjuicio de otras vías anabólicas de síntesis de unidades de PGN), en Gram-negativos encontramos 2 vías principales, representadas en la **Figura 1.3**: 1) la ruta MurQ, que consiste en una biosíntesis de *de novo*, en la que NAG y 1,6-anhidroNAM se convierten en glucosamina-1P para regenerar el uridín difosfato (UDP)-NAG; 2) la ruta MurU, más conservada en *P. aeruginosa*, en la que los 1,6-anhidroNAM se transforman más rápidamente en UDP-NAM.

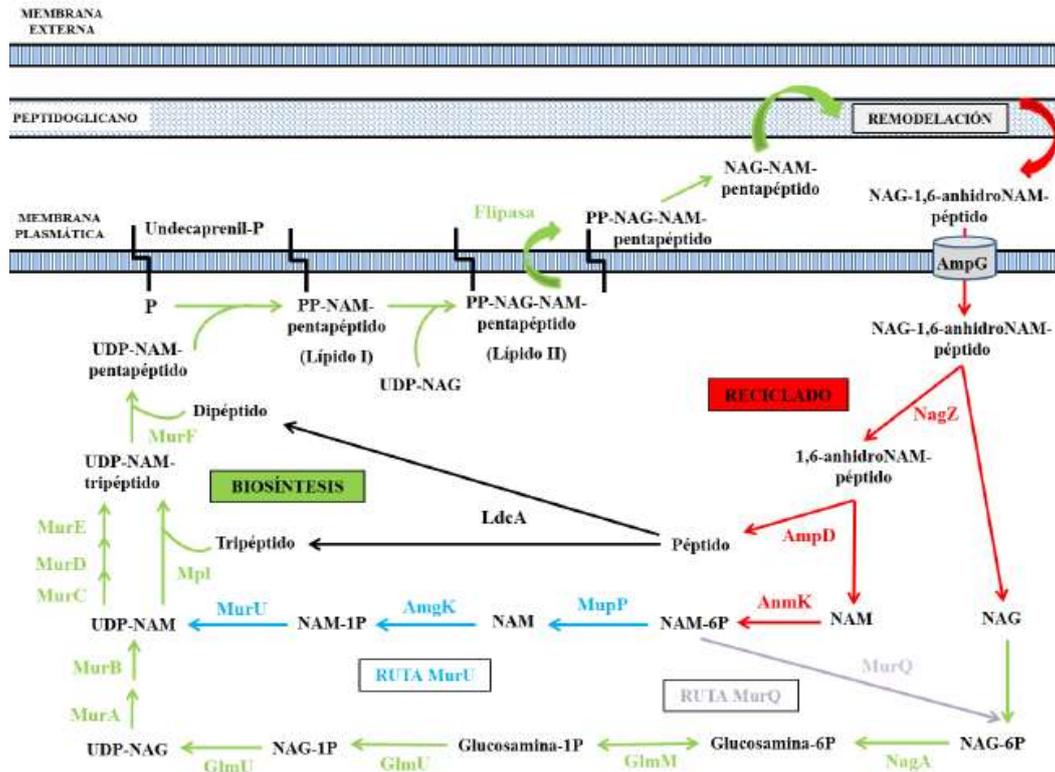


Figura 1.3 Representación de las rutas para la síntesis (flechas y enzimas verdes) y reciclado (flechas y enzimas rojas) del PGN. Se representan las dos posibles rutas para el reciclado de los azúcares procedentes de la remodelación del PGN en Gram-negativos: ruta MurQ (flecha y enzima lila) y ruta MurU (flechas y enzimas celestes)¹⁷.

Se ha demostrado, en *P. aeruginosa* así como en otras especies de Gram-negativos, que el proceso de reciclaje del PGN presenta una estrecha conexión con la regulación de la producción de β -lactamasas intrínsecas, como la cefalosporinasa cromosómica AmpC propia de *P. aeruginosa*.

AmpC es una β -lactamasa de clase C no inhibible por los inhibidores de β -lactamasas clásicos (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), que expresada a nivel basal confiere resistencia a amoxicilina y a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, con la excepción de ceftazidima. El comportamiento de AmpC frente a un β -lactámico está condicionado por la capacidad de inducción del antibiótico y por la eficacia con la que lo hidroliza. La ceftoxitina, cefalotina y ampicilina son capaces de inducir la producción de AmpC (a través de los mecanismos que se verán a continuación), además de ser hidrolizables por ella, y por tanto son inútiles frente a *P. aeruginosa*. Ocurre lo contrario con las carboxi- y ureidopenicilinas, la ceftazidima, las cefalosporinas de cuarta generación (como cefepima) y los monobactámicos (aztreonam), que a pesar de ser buenos sustratos de AmpC, conservan su actividad antipseudomónica ya que no inducen su producción (que quedará a nivel basal a no ser que se seleccionen determinadas mutaciones causantes de hiperproducción estable, tema que será abordado más adelante). Los carbapenémicos, como imipenem y meropenem, son activos contra *P. aeruginosa*, ya que son estables frente a la hidrólisis de AmpC, a pesar de ser también buenos inductores de su expresión⁴⁶.

La expresión de *ampC*, en condiciones normales, es baja; pero en presencia de un β -lactámico inductor su expresión aumenta notablemente. A continuación, se describen los componentes principales que participan en la regulación de la expresión de *ampC* y que aparecen representados en la **Figura 1.4**⁴⁷:

- **AmpG**: permeasa de la membrana plasmática que actúa como transportador específico del NAG-1,6-anhidroNAM-péptidos procedentes de la degradación del PGN, desde el espacio periplásmico al citoplasma. Es por tanto un elemento esencial para permitir el reciclaje del PGN
- **NagZ**: glucósido hidrolasa, también llamada β -N-acetilglucosaminidasa, que procesa los fragmentos transportados por AmpG al citoplasma liberando unidades de NAG y anhidromuropéptidos. Por ello, es un elemento esencial para el reciclaje del PGN, y para la generación de fragmentos de PGN potencialmente inductores de *ampC*, como se verá a continuación.
- **AmpD**: N-acetilmuramil-L-alanina amidasa citoplasmática con la función de hidrolizar el enlace entre el péptido y el NAM de los 1,6-anhidromuropéptidos para que ambas moléculas puedan ser recicladas.
- **AmpR**: regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR, que controla la expresión de múltiples genes, incluyendo *ampC*. Es clave en la inducción de la expresión de *ampC*, pues este regulador puede adoptar dos conformaciones en función del muropéptido que se le une: si se le unen UDP-NAM-pentapéptidos (componentes que, como se ha citado anteriormente, son resultado de rutas anabólicas citosólicas del PGN) actúa como represor de *ampC*; si se le unen 1,6-anhidromuropéptidos actuará como inductor, pudiendo provocar una expresión de *ampC* hasta cientos e incluso miles de veces mayor que la expresión basal.
- **PBP4**: se trata de una proteína fijadora de penicilina codificada por el gen *dacB*. Su función consiste en actuar como sensor de β -lactámicos, ya que al ser bloqueado por ellos, induce una compleja respuesta que activa la hiperexpresión de *ampC* dependiente de AmpR.

Cabe decir que el proceso de inducción es totalmente reversible, reestableciéndose la expresión basal de *ampC* cuando el β -lactámico inductor desaparece. En definitiva, el mecanismo de regulación de la expresión de *ampC* en *P. aeruginosa* en condiciones basales y en presencia de un inductor consiste en (**Figura 1.4**)⁴⁵:

- **En condiciones basales**: la degradación del PGN genera NAG-1,6-anhidromuropéptidos en el espacio periplásmico que pasan al citoplasma gracias a la permeasa AmpG. Ahí se generan unidades de NAG y 1,6-anhidromuropéptidos por la acción de NagZ, y posteriormente, sobre éstos últimos actúa AmpD liberándose así las cadenas peptídicas laterales. Los productos generados son reincorporados a la ruta biosintética del PGN, transformándose en UDP-NAM-pentapéptidos y exportándose al espacio periplásmico. Por otro lado, parte de estos productos se unen a AmpR manteniéndolo en una conformación represora y produciendo unos niveles de expresión de *ampC* bajos. En este sentido, se puede decir que AmpD, aparte de ser importante para el reciclado del PGN, actúa como represor indirecto de *ampC*, pues lleva a cabo una reacción esencial para la síntesis de los UDP-NAM-pentapéptidos.
- **En presencia de un β -lactámico inductor (cefoxitina o imipinem)**: se produce un mayor transporte de NAG-1,6-anhidromuropéptidos al citoplasma que producen unos niveles de 1,6-anhidromuropéptidos que acaban saturando a AmpD (los péptidos y NAM, productos normales de la actividad de esta amidasa cuando no está saturada, carecen de capacidad para unirse a AmpR). Los 1,6-anhidromuropéptidos desplazan los UDP-NAM-pentapéptidos unidos a AmpR, provocando el cambio de conformación a su forma activa e induciendo la expresión de *ampC*, que será exportada al espacio periplásmico y degradará al β -lactámico inductor. Además, el β -lactámico inductor inhibe a PBP4, activándose así el sistema regulador de dos componentes CreBC, que aumenta la eficiencia de la producción de AmpC.

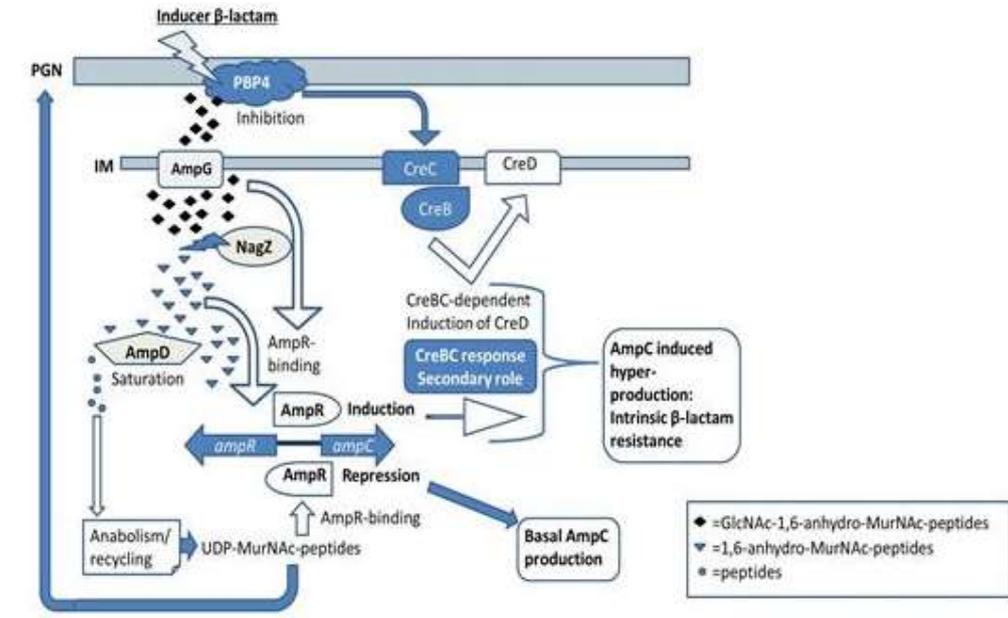


Figura 1.4 Representación esquemática de la interacción entre el reciclaje de PGN, la regulación de *ampC* en presencia de un β -lactámico inductor y la resistencia intrínseca a β -lactámicos en *P. aeruginosa* ⁴⁷.

Como se ha mencionado anteriormente, la presión selectiva ejercida por los tratamientos antibióticos puede favorecer la selección de mutaciones cromosómicas que desemboquen en la hiperproducción estable de AmpC (no reversible), causando niveles clínicamente relevantes de resistencia a β -lactámicos, a los que de forma basal AmpC no podría afectar significativamente como por ejemplo ceftazidima, aztreonam o cefepime. Por ejemplo, la inactivación mutacional (por inserciones o deleciones de nucleótidos que hacen perder el marco de lectura, o causan la aparición de codones stop prematuros) de AmpD conlleva un aumento citoplasmático de 1,6-anhidromuropéptidos provocando la activación conformacional de AmpR y, consecuentemente, la hiperexpresión constante de *ampC* ⁴⁸. También se ha descrito la inactivación mutacional de *dacB*, gen que codifica para la PBP4. Esta inactivación conlleva la puesta en marcha constitutiva del sistema regulador de dos componentes CreBC que aumenta el rendimiento, en términos de nivel de resistencia obtenido, de la hiperexpresión de *ampC* a través de una compleja respuesta que implica a CreD, la proteína de membrana efectora del sistema CreBC ⁴⁹. Por otro lado, también se han descrito cambios de aminoácidos puntuales en *ampR* que le hacen adquirir constitutivamente una conformación activadora de la expresión de *ampC* ⁵⁰. Por el contrario, la inactivación *in vitro* de determinados componentes de la ruta de regulación de AmpC/reciclaje del PGN, causa un bloqueo en la capacidad de hiperexpresión de *ampC*, pues se imposibilita la llegada de fragmentos de PGN al citosol o la generación de muropéptidos activadores de AmpR. Ello ocurre, respectivamente, mediante la inactivación de *ampG* o *nagZ*, que obviamente también conllevan el bloqueo del reciclaje del PGN ⁵¹.

1.5 Relación entre el metabolismo del peptidoglicano, la regulación de β -lactamasas y la virulencia.

La capacidad de infección de un microorganismo está condicionada por la potencia de sus factores de virulencia, así como por la capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos que se administren al paciente (en caso de tratamiento). En el metabolismo bacteriano existen complejas interconexiones, de tal manera que la adquisición de un fenotipo de resistencia puede producir cambios en la fisiología bacteriana que a menudo conllevan un coste

biológico. De esta manera, la eficacia biológica (*fitness*) de un mutante resistente sería más baja que la de una bacteria sensible, algo que ocurre frecuentemente en la naturaleza, aunque no siempre.

La producción de β -lactamasas intrínsecas o adquiridas es el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos en Gram-negativos patógenos, pero no parece haber consenso en el efecto que produce la expresión de β -lactamasas sobre el *fitness* y/o virulencia de estos microorganismos. Por un lado, se han descrito trabajos en los que se determina que la expresión de β -lactamasas no produce ningún hándicap importante para la bacteria. Pero por otro lado, hay estudios que sí que la relacionan con una reducción de *fitness*/virulencia. En un trabajo con cepas de *Escherichia coli*, se demostraron grandes costes biológicos que se relacionaron con cambios cuantitativos en la composición del PGN (disminución de entrecruzamientos en los muropéptidos, así como un aumento en la longitud media de las cadenas del PGN), posiblemente debidos a la actividad endopeptidasa de las β -lactamasas adquiridas (OXA-10, OXA-24 y SFO-1). Este coste biológico pone de manifiesto la importancia de la interacción entre las β -lactamasas y el metabolismo del PGN ⁵².

El PGN realiza un papel esencial en la viabilidad celular por lo que es necesario para cualquier tipo de virulencia. Además del papel que ejerce para contrarrestar los cambios osmóticos, de entre otras funciones básicas y estructurales, se han encontrado evidencias de la conexión específica entre el PGN y la virulencia. Hay trabajos que indican que hay enzimas remodeladoras del PGN esenciales para el ensamblaje del inyectisoma (componente esencial de determinados sistemas de secreción de toxinas) y del flagelo, dos importantes determinantes de virulencia ¹⁷.

También hay estudios que correlacionan el metabolismo del PGN con la virulencia y con la regulación de la actividad β -lactamasa intrínseca. Se ha visto que mutantes *knockout* en *AmpD* en *Salmonella enterica* sv. *Thyphimurium* presentan una acumulación citoplasmática de muropéptidos procedentes del PGN, que conlleva una reducción de su invasividad y una mejor activación de la ruta del óxido nítrico de los macrófagos, por lo que se disminuye su virulencia. Este dato indica la pérdida de virulencia asociada a la alteración del reciclado del PGN en enterobacterias, que es de gran interés ya que éstas comparten genes de rutas de reciclado del PGN y de regulación de β -lactamasas intrínsecas con *P. aeruginosa*. A este interés hay que sumar la creciente presencia, en el ambiente hospitalario, de β -lactamasas adquiridas horizontalmente. También se ha visto que el sistema CreBC de *P. aeruginosa* afecta al *fitness*, la formación del *biofilm* y la respiración anaerobia ya sea en respuesta al uso de β -lactámicos o no. Además, se ha demostrado en *P. aeruginosa* el papel de *NagZ* tanto en el reciclaje del PGN como en la regulación de la expresión de la β -lactamasa cromosómica *AmpC* y su consecuente efecto en su patogenicidad ⁵³.

En infecciones crónicas, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de modificar su PGN así como su lipopolisacárido (LPS), disminuyendo su capacidad proinflamatoria en fases tardías, produciendo una menor activación de la respuesta inmune innata del hospedador, lo cual a su vez favorece la presencia crónica de la bacteria, al pasar más desapercibida. Otra estrategia evasiva consiste en la amidación de los residuos de ácido *meso*-diaminopimélico, reduciendo el reconocimiento del PGN por los receptores celulares.

Así pues, todo ello pone de manifiesto la relación existente entre el metabolismo del PGN, la expresión de β -lactamasas y la virulencia, interconexión en la que pretendemos profundizar con el presente trabajo ⁵⁴.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el trabajo *Impact of AmpC Derepression on Fitness and Virulence: the Mechanism or the Pathway?* se demuestra que la suma de bloquear el reciclaje del PGN y la hiperproducción de la β -lactamasa intrínseca AmpC, resulta en un dramático descenso de la virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, mucho más destacado que cuando solo se da una de las dos circunstancias ⁵⁵.

Teniendo en cuenta el aumento de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* en los últimos años, la gran diseminación horizontal de β -lactamasas adquiridas, y la necesidad de búsqueda de nuevas dianas que eliminen el microorganismo o reduzcan su virulencia, este trabajo tiene como objetivo general visualizar si los resultados expuestos anteriormente se reproducirían en presencia de diferentes β -lactamasas horizontales de clase A, B, C o D, en lugar de AmpC. Los objetivos específicos serán:

1. Transformar diferentes representantes de β -lactamasas horizontales (clase A: GES-1; clase B: VIM-1; clase C: FOX-8; clase D: OXA-2, -144 y -161) en la cepa tipo de *P. aeruginosa* PAO1 y en sus mutantes derivados defectivos en el reciclaje del PGN (*knockouts* en *ampG* o *nagZ*).
2. Analizar la virulencia de las diferentes cepas obtenidas, por medio de la determinación de la dosis letal 50 sobre el modelo invertebrado *Galleria mellonella*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y soluciones utilizadas.

En la **Tabla 3.1** se muestran las cepas y plásmidos utilizados para construir las cepas de interés para este trabajo.

Tabla 3.1 Cepas y plásmidos utilizados.

CEPA/PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
PAO1	Cepa de referencia de <i>P.aeruginosa</i> , considerada invasiva, con genoma completo secuenciado.	57
PAΔAG	PAO1 Δ <i>ampG:lox</i> (<i>ampG</i> codifica para la permeasa específica AmpG que permite el paso al citoplasma de derivados periplásmicos del PGN).	58
PAΔnZ	PAO1 Δ <i>nagZ</i> (<i>nagZ</i> codifica para la β-N-acetilglucosaminidasa que procesa los fragmentos transportados por AmpG al citoplasma liberando unidades de NAG y anhidromuropéptidos.	59
pUCP24	Vector puente multicopia <i>Escherichia-Pseudomonas</i> basado en pUC18; confiere resistencia a Gentamicina (GEN ^r).	60
pUCPAC	pUCP24 con el gen salvaje <i>ampC</i> de PAO1 clonado. Confiere una expresión de <i>ampC</i> aprox. 1000 veces superior a la basal.	61
pUCPGES-1	pUCP24 con el gen de la β-lactamasa GES-1 (clase A) clonado.	62
pUCPVIM-1	pUCP24 con el gen de la β-lactamasa VIM-1 (clase B) clonado.	63
pUCPFOX-8	pUCP24 con el gen de la β-lactamasa FOX-8 (clase C) clonado.	64
pUCPOXA-2	pUCP24 con el gen de la β-lactamasa OXA-2 (clase D, <i>narrow spectrum</i>) clonado.	65
pUCPOXA-144	pUCP24 con el gen de la β-lactamasa OXA-144 (BLEE de clase D) clonado.	66
pUCPOXA-161	pUCP24 con el gen de la β-lactamasa OXA-161 (BLEE de clase D) clonado.	67
NP OXA-161	Plásmido natural obtenido de cepa clínica de <i>P. aeruginosa</i> conteniendo en gen <i>blaOXA-161</i> .	67

Medios de cultivo:

- **LB**: para la elaboración de 200 mL en H₂O_d se requirieron: 2 g de triptona, 1 g de extracto de levadura y 1 g de NaCl. *Para elaborar placas de LB se añadieron 3 g de agar bacteriológico. Una vez disueltos los ingredientes, se procedió a su autoclavado.

- GEN 30: para la elaboración de placas de LB con una concentración de Gentamicina de 30 $\mu\text{g/mL}$, a los 200 mL de LB (explicados anteriormente) se le añadieron 0,3 mL del Stock de Gentamicina (20 mg/mL) siempre después de haber autoclavado el medio y haberlo dejado enfriar para no degradar el antibiótico.

*Para realizar placas se utilizaron ≈ 20 mL/placa.

Soluciones utilizadas:

- SMEB: para la elaboración de 1 L en H_2O_d se requirieron: 102 g de sacarosa, 1 mL de MgCl_2 (1 M) y 1 mL de HEPES (0,5 M). Una vez disueltos los componentes, se procedió a su autoclavado. Una vez autoclavado, esta solución se guardó a 4°C y siempre se usó a esta temperatura para la electroporación.
- PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Biowest®).
- TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X: se utilizaron 54 g de TRIS, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 7,6) y se enrasó a 1 L con H_2O_d . Antes de usar para geles de agarosa y electroforesis se realizó una dilución 1/10 con H_2O_d .

3.2 Extracción de plásmidos y transformación (electroporación) en *P. aeruginosa*.

Para la extracción del plásmido se utilizó el Kit Comercial NZYMiniprep (Nzytech genes & enzymes) y, siguiendo las instrucciones del fabricante, el protocolo consistió en:

- Los plásmidos se encontraban en la cepa XL1 *blue* de *E. coli* (XL1). Cada cepa de *E. coli* conteniendo cada plásmido fue descongelada y crecida en placas de LB, incubadas *overnight* a 37°C .
- Al día siguiente, se cogió con un asa de siembra una pequeña cantidad de masa bacteriana (equivalente a aproximadamente medio grano de arroz) y se resuspendió con 250 μL del buffer A1, hasta que no quedaron acúmulos visibles, en un tubo *ependorf*.
- Se añadieron 250 μL del buffer A2 y se mezcló por inversión.
- Se incubó a temperatura ambiente durante 4 minutos.
- Se añadieron 300 μL del buffer A3 y se mezcló por inversión.
- Se centrifugó el contenido a máxima velocidad (13000 x g) y temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se recogió el sobrenadante y se introdujo en una columna del Kit.
- Se centrifugó 1 minuto a 11000 x g y se eliminó el contenido que pasó al tubo colector.
- Se añadió a la columna 500 μL del buffer AY.
- Se centrifugó 1 minuto a 11000 x g y se eliminó el contenido que pasó al tubo colector.
- Se añadieron 600 μL del buffer A4.
- Se centrifugó 1 minuto a 11000 x g y se eliminó el tubo colector.
- Se colocó un nuevo tubo colector y se centrifugó 2 minutos a 11000 x g.
- Se tiró el tubo y se colocó la columna en un tubo *ependorf*.
- Se añadieron 40 μL de H_2O_d y se dejó 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifugó 1 minuto a 11000 x g quedando el plásmido eluído en el volumen final que atravesó la columna. Gracias a este protocolo se obtuvieron aproximadamente 20 μg de plásmido por extracción.

El protocolo de electroporación consistió en:

- Fase de preparación de las células (electrocompetentes):
 - En un matraz autoclavado se introdujeron 50 mL de LB y 1 mL de inóculo de bacteria de la cepa en cuestión (PAO1, PAΔAG o PAΔnZ), procedente de un cultivo líquido crecido *overnight* a 37°C, y se incubó en agitación (180 rpm) a la misma temperatura durante \approx 2 horas, hasta que se obtuvo una densidad óptica (DO_{600}) de \approx 0,5 (aprox. $0,5 \cdot 10^9$ unidades formadoras de colonias/mL [UFC/mL]).
 - Se incubó el matraz 10 minutos en hielo para detener el crecimiento y mantener las células en fase exponencial.
 - Se vertió el contenido del matraz en un tubo de 50 mL y se centrifugó 15 minutos a 3000 x g y 4°C.
 - Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 25 mL de SMEB mediante vórtex.
 - Se centrifugó 15 minutos a 3000 x g y 4°C.
 - Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 10 mL de SMEB mediante vórtex.
 - Se centrifugó 15 minutos a 3000 x g y 4°C.
 - Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 500 μ L de SMEB mediante vórtex. En este punto se obtuvieron las células electrocompetentes.

- Fase de electroporación:
 - Se realizaron alícuotas de 100 μ L de células electrocompetentes en tubos *ependorf* a los que se le añadieron 3 μ L del plásmido de interés (extraído según el protocolo previamente indicado) y se mezclaron con la pipeta.
 - Las alícuotas se dejaron 10 minutos en hielo.
 - Todo el volumen se depositó dentro de la cubeta de electroporación Gene Pulser® Cuvette (Bio-Rad).
 - A estas cubetas, que tienen 0,2 cm de separación entre electrodos, se añadieron las alícuotas de las cepas mezcladas con los correspondientes plásmidos. Se empleó el aparato Gene Pulser Xcell (Bio-Rad; Hercules, California, EE.UU.), con pulsos de 5 ms y 2,5 kV de voltaje.
 - El contenido se vertió en un tubo que contenía 1 mL de LB.
 - Se incubaron \approx 1 hora a 37°C en agitación para su crecimiento.

- Fase de selección:
 - Se utilizaron volúmenes de 200 μ L y de 10 μ L del contenido bacteriano electroporado para plaquear en 2 placas GEN 30, de tal manera que solo las bacterias que hubieran incorporado el plásmido con la β -lactamasa crecerían.
 - Las placas se cultivaron *overnight* a 37°C para ver los resultados al día siguiente, y se utilizaron aquellas en las que se podían observar colonias aisladas. En este punto se dieron pases a placas GEN 30, de varias colonias para cada cepa y plásmido electroporado, para su comprobación final por PCR.
 - En todas las electroporaciones se realizaron siempre controles negativos, es decir, células electrocompetentes pero sin adición de plásmido, para asegurar la corrección de los medios

usados y ensayos llevados a cabo, y la ausencia de contaminaciones con bacterias resistentes a GEN.

3.3 Comprobación por PCR específicas de los plásmidos transformados.

Para la comprobación de los plásmidos transformados en las cepas de *P. aeruginosa*, se realizaron PCR específicas del gen correspondiente al inserto (β -lactamasas) con los reactivos (volumen final de 50 μ L) que se muestran en la **Tabla 3.2** y los cebadores recogidos en la **Tabla 3.3**:

Tabla 3.2 Composición de la mezcla de reacción para PCRs de comprobación.

REACTIVOS	VOLUMEN (μ L) POR REACCIÓN
Buffer 10X	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP (10 mM cada uno)	1
Cebador F (100 μ M)	0,5
Cebador R (100 μ M)	0,5
Taq polimerasa (5 unidades/ μ L) AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems)	0,5
H ₂ O _d	39,5
ADN molde	1 μ L del plásmido en cuestión como control positivo, o bien 1 μ L de H ₂ O _d como control negativo. De aquellas cepas/plásmidos que se pretendían comprobar, se picó una colonia y se disolvió en el tubo de reacción

Las condiciones de la PCR fueron: 94 °C, 10 minutos + [94 °C, 1 minuto / T° hibridación, 1 minuto / 72 °C, 1 minuto] x 35 ciclos + 72 °C, 10 minutos.

Tabla 3.3 Características de los *primers* utilizados para las PCRs de comprobación.

CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')	T ^a HIBRIDACIÓN	GEN AMPLIFICADO	TAMAÑO PRODUCTO
GES-1 - F	TCGAATTCGATAATTT CCATCTCAAGGGATC	62°C	blaGES-1	863 pb
GES-1 - R	TCAAGCTTCTATTTGT CCGTGCTCAGGAT			
VIM-1 -F	ATGTTAAAAGTTATTA GTAGTTTATT	56°C	blaVIM-1	801 pb
VIM-1 -R	CTACTCGGCGACTGAG C			

FOX-8 - F	ATGCAACAACGACGT GCGTTC	62°C	blaFOX-8	1150 pb
FOX-8 - R	TCACTCGGCCAACTGA CTCA			
OXA-2 - F	ATGGCAATCCGAATCT TCGC	60°C	blaOXA-2 y sus derivados BLEE*	827 pb
OXA-2 - R	TTATCGCGCAGCGTCC GAG			

*OXA-144 presenta el polimorfismo Trp159Arg respecto a OXA-2 ⁶⁶; en cambio, OXA-161 presenta el polimorfismo Asn148Asp también respecto a OXA-2 ⁶⁷. Ambas variaciones no afectan a las secuencias de unión de los *primers*.

Finalmente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1% para la comprobación de los productos de la PCR. Para ello, se cargaron 10 µL de muestra + 1 µL de tampón de carga, y se dejó correr la electroforesis a 100V durante 30 minutos. Se confirmó el tamaño correcto de los amplicones por comparación con los controles positivos correspondientes, y el marcador de peso molecular SmartLadder MW-1700-10 (Eurogentec)

Dado que PAO1 ya posee *ampC* de forma intrínseca, para comprobar que se electroporó el plásmido multicopia pUCPAC, no se pudo realizar la PCR del gen, sino que se tuvo que hacer un ensayo fenotípico. Así pues, se realizó un E-test de ceftazidima (bioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta forma se pudo comprobar cómo la concentración mínima inhibitoria de ceftazidima se incrementaba de 1 mg/L en la cepa salvaje, a 24 mg/L en los transformantes con pUCPAC (debido a la expresión en multicopia de la cefalosporinasa AmpC desde el plásmido, llegando a aprox. 1000 veces la expresión basal), en concordancia con la literatura previa ⁵⁵.

Las cepas construidas durante este trabajo aparecen específicamente en el apartado de resultados, pero en pocas palabras, consistieron en las cepas de tres *backgrounds* diferentes: salvaje (PAO1), defectivo en *ampG* (PAΔAG) y defectivo en *nagZ* (PAΔnZ), transformadas respectivamente con el plásmido pUCP24 salvaje, o conteniendo clonadas las β-lactamasas AmpC, GES-1, VIM-1, FOX-8, OXA-2, OXA-144 u OXA-161, así como el plásmido natural del cual se aisló por primera vez OXA-161, procedente de una cepa clínica ⁶⁷.

3.4 Modelo de infección en el invertebrado *Galleria mellonella*.

Para analizar la virulencia de las diferentes cepas obtenidas se utilizaron larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* como modelo invertebrado de infección (Bio Systems Technology | TruLarv™). Tras comprobar el buen estado de las larvas por su reacción al contacto y su color pálido uniforme, se escogieron las larvas de tamaño similar (≈ 1.5 cm de longitud). Para los experimentos se siguió el siguiente protocolo ⁶⁸:

- Se realizaron cultivos *overnight* de las cepas a utilizar en LB a 37 °C y en agitación.
- Se realizó una dilución 1:50, en matraz estéril, de los cultivos en LB y se incubaron 2-3 horas en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ≈ 0,4 - 0,5 (0,4 - 0,5 · 10⁹ UFC/mL), en la que los cultivos bacterianos están en crecimiento exponencial.
- Se centrifugaron los cultivos a 3000 x g y 4 °C, durante 15 minutos.

- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 10 mL de PBS.

*Una vez alcanzado el crecimiento exponencial, las muestras se mantuvieron en hielo para frenar el crecimiento bacteriano.

- A partir de estas suspensiones bacterianas se realizaron diferentes diluciones en función de la cepa y la dosis deseada, que se comprobaron mediante plaques y recuentos de colonias al día siguiente.
- Para cada cepa y dilución, se inyectaron 10 μ L con una jeringa *Hamilton* en el último propodio izquierdo de 10 larvas. Para tener un grupo control, que se utilizó en cada réplica experimental, a 10 larvas se les inyectaron 10 μ L de PBS estéril.
- Las larvas se incubaron 20 horas a 37°C y se realizó un recuento del número de vivas y muertas. Las larvas muertas dejan de responder al contacto y suelen adquirir una coloración muy oscura.
- En primer término, siempre se realizó un ensayo piloto, con rangos amplios de UFCs inyectadas para acotar un margen razonable de diluciones y finalmente determinar la dosis letal 50 (LD₅₀). Por ejemplo, en primer lugar, se inyectaron grupos de 10 larvas con 1000, 100, 10 y 2 UFCs/10 μ L respectivamente. Una vez recontadas las larvas muertas, se pudo acotar el rango de nuevas diluciones a inyectar, por ejemplo: 500, 250, 125 y 60 UFCs/10 μ L. Una vez acotadas las diluciones, se realizaron 3 experimentos independientes con las mismas.

3.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico.

La proporción de larvas muertas para cada dosis bacteriana de los tres mencionados experimentos independientes se modelizó mediante un *Probit análisis*, calculándose la LD₅₀ \pm desviación estándar se determinó con el *software* R (versión 3.2.2), siguiendo protocolos descritos anteriormente ⁵⁵.

El *software* *GraphPad Prism 5* se utilizó para la representación gráfica y el análisis estadístico de los datos. Cada gráfico incluye, para cada cepa: la media de las LD₅₀ obtenidas, las desviaciones estándar y las diferencias significativas entre ellas, relacionadas con líneas rectas y un asterisco. Se usó la prueba t de Student para comparar las variables cuantitativas, considerándose como estadísticamente significativo un p-valor < 0,05.

4. RESULTADOS

Una vez realizadas las electroporaciones y comprobaciones por PCR para obtener las cepas de interés recogidas en este apartado, para el análisis del impacto del bloqueo del reciclaje del PGN y la expresión de β -lactamasas sobre la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en *Galleria mellonella*, se realizaron las gráficas que serán comentadas a continuación.

Como puede apreciarse en la **Figura 4.1**, la LD₅₀ de la cepa PAO1 fue de 19,1 UFCs. La expresión en la cepa salvaje del plásmido pUCP24 conteniendo el gen *ampC* clonado, no tuvo un impacto significativo en la LD₅₀, que se mantuvo estable (24 UFCs). En cambio, el bloqueo del reciclaje del PGN por la inactivación de los genes *ampG* o *nagZ* sí que implicó un aumento significativo en las LD₅₀, alcanzando valores de 46 UFCs y 60 UFCs, respectivamente. La expresión del vector pUCP24 en los mutantes *ampG* no tuvo ningún efecto sobre la LD₅₀ (59 UFCs); en cambio, la expresión de pUCPAC tuvo un efecto todavía más marcado sobre la LD₅₀. Así, la cepa PA Δ nZ pUCPAC mostró una LD₅₀ de 263 UFCs, y la cepa PA Δ AG pUCPAC, una LD₅₀ de 226 UFCs.

En la **Figura 4.2**, se puede observar que la expresión, por adquisición horizontal, de las β -lactamasas GES-1 (clase A), VIM-1 (clase B) o FOX-8 (clase C) en las cepas PA Δ AG no tuvieron un impacto estadísticamente significativo ($p > 0,05$) sobre la LD₅₀ (46, 59 y 110 UFCs; respectivamente), aunque la expresión de FOX-8 ocasionó un apreciable aumento.

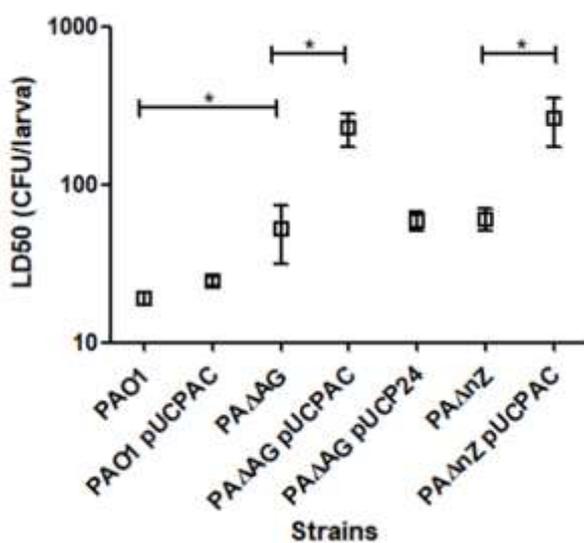


Figura 4.1 Ensayos de mortalidad de *G. mellonella* con la cepa salvaje PAO1 o mutantes con bloqueo del reciclaje de la pared celular, expresando la β -lactamasa AmpC clonada en el plásmido pUCP24. Los valores son las medias (cajas) \pm SD (barras de error) obtenidas de al menos tres experimentos independientes (escala logarítmica). *P-valor < 0,05 en la prueba t de Student.

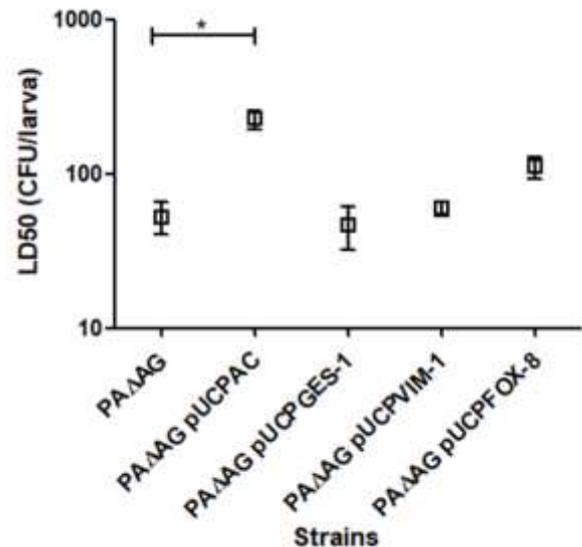


Figura 4.2 Ensayos de mortalidad de *G. mellonella* con el mutante knockout AmpG expresando diferentes β -lactamasas clonadas en el plásmido pUCP24. Los valores son las medias (cajas) \pm SD (barras de error) obtenidas de al menos tres experimentos independientes (escala logarítmica). *P-valor < 0,05 en la prueba t de Student.

La **Figura 4.3** muestra como la adquisición horizontal de la β -lactamasa OXA-2 (clase D) en la cepa PAO1 supuso un ligero aumento de la LD₅₀ (34 UFCs), aunque de manera no estadísticamente significativa. Por otro lado, en PA Δ G la adquisición de OXA-2 sí que tuvo un impacto significativo sobre la LD₅₀ (120 UFCs) respecto a la cepa control PAO1 e incluso respecto a la cepa PA Δ G. En cambio, en la cepa con la inactivación de NagZ, la expresión de OXA-2 no supuso un aumento significativo en la LD₅₀ (30 UFCs) respecto a PAO1.

Tal y como se muestra en la **Figura 4.4**, la expresión de la β -lactamasa de clase D OXA-144 (de espectro extendido, derivada de OXA-2) ya supuso un aumento significativo de la LD₅₀ (51 UFCs) respecto a la cepa control PAO1. Además, la adquisición de esta β -lactamasa en las cepas que presentaban la inactivación de NagZ y AmpG (PA Δ nZ pUCPOXA-144 y PA Δ G pUCPOXA-144) causó un aumento significativo aún más drástico de la LD₅₀ (102 y 173 UFCs, respectivamente) respecto a la cepa PA Δ G.

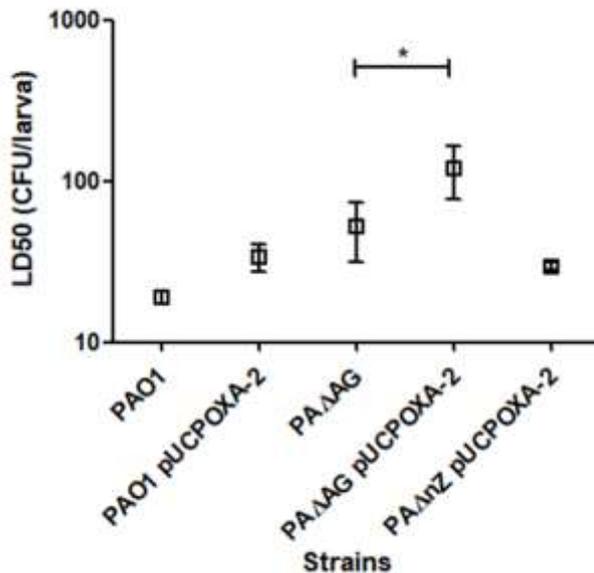


Figura 4.3 Ensayos de mortalidad de *G. mellonella* con la cepa salvaje PAO1 o mutantes con bloqueo del reciclaje de la pared celular expresando la β -lactamasa OXA-2 (clase D). Los valores son las medias (cajas) \pm SD (barras de error) obtenidas de al menos tres experimentos independientes (escala logarítmica). *P-valor < 0.05 en la prueba t de Student.

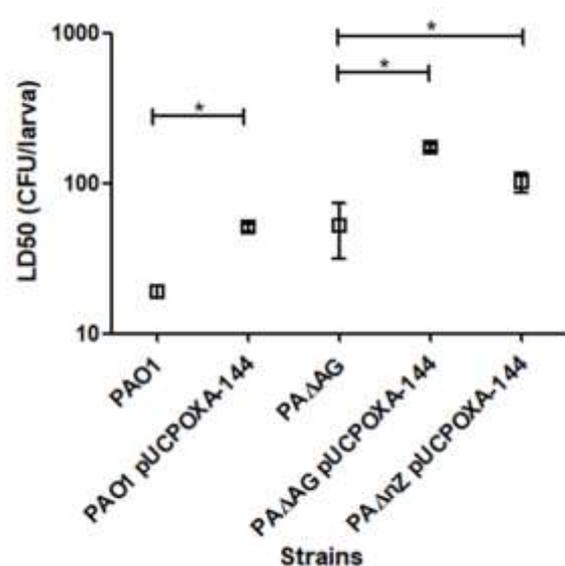


Figura 4.4 Ensayos de mortalidad de *G. mellonella* con la cepa salvaje PAO1 o mutantes con bloqueo del reciclaje de la pared celular expresando la β -lactamasa OXA-144 (clase D). Los valores son las medias (cajas) \pm SD (barras de error) obtenidas de al menos tres experimentos independientes (escala logarítmica). *P-valor < 0.05 en la prueba t de Student.

Por último, en la **Figura 4.5** se observa como la expresión de la β -lactamasa de clase D OXA-161 (de espectro extendido, derivada de OXA-2), tanto por la adquisición horizontal del vector puente pUCP24 con el gen clonado (PAO1 pUCPOXA-161) como por la adquisición del plásmido natural (PAO1 NP OXA-161), supuso el mayor aumento significativo de la LD₅₀ (139 y 176 UFCs, respectivamente) en la cepa PAO1. Además, la expresión de esta β -lactamasa en las cepas que presentaban la inactivación de NagZ o AmpG (PA Δ nZ pUCPOXA-161 y PA Δ G pUCPOXA-161) causó un aumento significativo aún más drástico de la LD₅₀ (502 y 589 UFCs, respectivamente) respecto a la cepa PA Δ G.

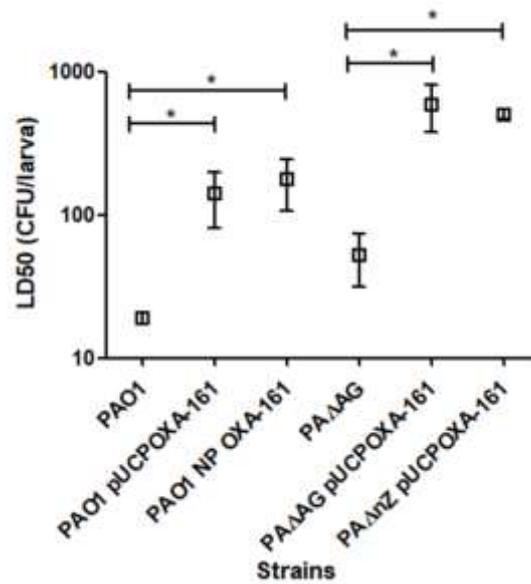


Figura 4.5 Ensayos de mortalidad de *G. mellonella* con la cepa salvaje PAO1 o mutantes con bloqueo del reciclaje de la pared celular expresando la β -lactamasa OXA-161 (clase D). Los valores son las medias (cajas) \pm SD (barras de error) obtenidas de al menos tres experimentos independientes (escala logarítmica). *P-valor < 0,05 en la prueba t de Student.

5. DISCUSIÓN

Los resultados comentados en el apartado anterior sugieren que el bloqueo del reciclaje del PGN, ya sea por la inactivación de la permeasa AmpG como por la inactivación de la β -N-acetilglucosaminidasa NagZ, reduce la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* respecto a la cepa control PAO1. El impacto sobre la virulencia es mayor si al bloqueo del reciclaje del peptidoglicano se le suma la hiperexpresión de la β -lactamasa cromosómica AmpC. Estos resultados concuerdan con los resultados previamente publicados ⁵⁵.

En cuanto al impacto de la adquisición de β -lactamasas de clases A, B, C o D sobre la virulencia de cepas de *P. aeruginosa* con bloqueo del reciclaje del PGN, los resultados obtenidos indican que:

La adquisición horizontal de las β -lactamasas GES-1, VIM-1 y FOX-8 (clases A, B y C; respectivamente) no reducen de manera estadísticamente significativa la virulencia en cepas de *P. aeruginosa* con bloqueo del reciclaje del PGN, si bien es cierto que se apreció un aumento notable en la LD₅₀ de la cepa PAΔG pUCPFOX-8.

Por otro lado, la adquisición horizontal de OXA-2 (clase D) en las cepas con la inactivación de la permeasa AmpG supone una reducción significativa de la virulencia y el *fitness*, algo que no se apreció en los *backgrounds* salvaje y defectivo en NagZ. El mismo efecto se produce en las cepas que han adquirido pUCPOXA-144, aunque en este caso también afectando al mutante defectivo en NagZ. El mayor impacto sobre el *fitness* y la virulencia, en cepas de *P. aeruginosa* que presentan inactivación de NagZ o AmpG, se da mediante la producción de OXA-161, tanto en su plásmido natural (en el que se aisló por primera vez esta β -lactamasa, procedente de una cepa clínica ⁶⁸) como clonada en el plásmido pUCP24, viéndose reflejado con el drástico aumento de la LD₅₀. Además, es interesante remarcar que la expresión de pUCPOXA-144 y pUCPOXA-161 (que como se ha mencionado, son BLEE derivadas de OXA-2), ya tiene un impacto significativo en las LD₅₀, incluso en la cepa salvaje, al contrario que el resto de β -lactamasas.

El simple bloqueo del reciclaje (por inactivación de AmpG o de NagZ) afecta a la virulencia, probablemente porque la síntesis *de novo* del PGN, en lugar de su reciclaje, conlleva un malgasto de energía. Ello implicaría que las cepas con reciclaje bloqueado crecen más lentas, lo cual tiene un obvio impacto en la virulencia. Para confirmar esta idea, son necesarios futuros experimentos para ver la tasa de crecimiento *in vitro* de las diferentes cepas. Tampoco se puede descartar que el bloqueo del reciclaje implique defectos estructurales en el PGN, al no ser suficiente la síntesis *de novo* para completar un PGN estructuralmente pleno y correcto. En otras palabras, que la actividad de degradación y remodelado del PGN, que ocurren constitutivamente para permitir el crecimiento y la división celular, no se vería compensada por una actividad de síntesis de PGN suficiente debido al bloqueo de una vía de entrada de material nuevo a la pared, tan importante como es el reciclaje. Todo ello implicaría una menor viabilidad celular, por ser las células más sensibles a la lisis por presión osmótica. De hecho, hay estudios que demuestran que la inactivación de enzimas implicadas en el metabolismo del PGN conducen a defectos estructurales de éste que conllevan una pérdida de *fitness*/virulencia, un ejemplo sería la amidasa periplásmica AmiB, esencial en la separación celular durante la división celular, cuya inactivación supone defectos estructurales y de permeabilidad en las membranas celulares de *P. aeruginosa* ⁶⁹.

Los resultados sugieren que la inactivación de AmpG junto a la expresión de algunas β -lactamasas parece tener un efecto más drástico que la inactivación de NagZ. Ello es lógico, pues al inactivar AmpG se bloquea toda la vía del reciclaje, ya que no pueden entrar los fragmentos de NAG-1,6-anhidromurámico-péptidos procedentes de la

degradación del PGN al citosol ⁴⁵; en cambio, la inactivación de NagZ supone el bloqueo de solo una parte del reciclaje, en concreto, del componente disacárido de los muropéptidos ⁷⁰.

La atenuación de la virulencia es incluso más drástica cuando al bloqueo del reciclaje del PGN se suma la hiperexpresión de AmpC, probablemente debido a una posible actividad residual de AmpC (y también de las OXAs testadas) sobre el PGN, ya que ésta (y otras β -lactamasas) tienen ancestros comunes con enzimas que modifican el PGN. En concreto, debido a este origen común, AmpC podría funcionar también como una LD-endopeptidasa ⁷¹. Por ello, es posible que en condiciones de hiperexpresión, la actividad residual acabe teniendo un impacto sobre el PGN, causando cierta degradación sobre éste y haciéndolo más sensible a lisis por cambios osmóticos o por agresiones del sistema inmune del hospedador. Si el reciclaje está intacto, esta actividad residual de AmpC no tendría consecuencias, pero en un *background* defectivo en reciclaje, en el cual el PGN está probablemente alterado estructuralmente, esa actividad residual acaba por degradar significativamente al PGN, debilitándolo decisivamente. Es decir, si el reciclaje está intacto, sirve para compensar la degradación controlada por autolisinas y/o por hiperexpresión de β -lactamasas con actividad PGN-asa residual. Pero si el reciclaje no funciona, el balance del PGN se desvía hacia una mayor destrucción frente a la síntesis, lo cual debilita al mismo frente a la lisis.

La hiperexpresión de las OXAs de espectro ampliado parecen implicar un mayor coste biológico que la OXA-2. Probablemente, la ampliación del espectro hidrolítico hacia más β -lactámicos también puede implicar un incremento de su actividad residual degradativa sobre el PGN propio. Ello es incluso apreciable en el *background* salvaje, lo cual sugiere el gran coste biológico que implica la expresión de estas variantes de BLEE. Además, el coste energético derivado de expresar una β -lactamasa en multicopia, no puede ser la única causa de la bajada de virulencia, ya que en el resto de β -lactamasas este impacto no se produce en PAO1. El elevado coste biológico ligado a la expresión de OXA-144 y OXA-161 explicaría la poca dispersión que tienen estas variantes a nivel global, mientras que OXA-2 se aísla muy habitualmente en cepas clínicas a pesar de que confiere una resistencia más modesta ⁶⁵. Es decir, a pesar de que expresar OXA-144 u OXA-161 otorgan una ventaja en forma de mayor capacidad de hidrólisis de β -lactámicos y, por lo tanto, de resistencia, también implica una contrapartida en forma de pérdida de virulencia que limita su selección positiva ^{66,67}.

Se requieren más estudios que permitan dilucidar el por qué algunas β -lactamasas como las VIM, GES e incluso FOX (aun siendo de clase C como AmpC), no muestran efectos tan atenuadores de la virulencia. Podría deberse a haber tenido una evolución diferente a AmpC o las OXA, habiendo perdido su capacidad de degradar el PGN. Además, faltan futuros estudios que comprueben experimentalmente que las OXA y AmpC son capaces de degradar el PGN *in vitro*, tal y como se propone como explicación a los resultados obtenidos.

Los interrogantes que abre este trabajo son objeto de futuros proyectos del Grupo de Investigación de la Resistencia Antibiótica y Patogenia de las Infecciones Bacterianas, perteneciente al Hospital Son Espases y al IdISBa (Instituto de Investigación Sanitaria de las Islas Baleares). El conocimiento de las bases moleculares que determinan las bajadas en la virulencia vistas en este trabajo, comportaría estar un paso más cerca del diseño de terapias destinadas a atenuar la virulencia de *P. aeruginosa*. Un ejemplo sería el uso de inhibidores de NagZ, como el compuesto derivado del ciclofelitol descrito en 2018 que no afectaba a las enzimas humanas y que bloquearía el reciclaje del PGN ⁷², junto a proteínas que mimeticen la degradación que ejercen AmpC y OXAs sobre el PGN, que resultarían en una drástica reducción de la virulencia de *P. aeruginosa*, basada en el debilitamiento de su pared celular.

6. CONCLUSIONES

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- 1) El bloqueo del reciclaje del peptidoglicano en *P. aeruginosa*, mediante la inactivación de los genes AmpG y NagZ, implican una pérdida de virulencia sobre el invertebrado *Galleria mellonella*. Ello está probablemente basado en motivos energéticos y de desbalance entre la degradación constitutiva del PGN por enzimas endógenos, y el empobrecimiento del aporte de la síntesis *de novo* ligada al mencionado bloqueo de reciclaje, que debilitarían la pared celular haciendo a la bacteria más sensible a la lisis.
- 2) La adquisición horizontal de las β -lactamasas GES-1, VIM-1 y FOX-8 (clases A, B y C; respectivamente) no conllevan un impacto estadísticamente significativo sobre la virulencia de *P. aeruginosa*.
- 3) La hiperexpresión de las β -lactamasas de tipo AmpC y OXA (principalmente las variantes de espectro extendido, y especialmente OXA-161) conlleva un alto coste biológico y, por tanto, una desventaja importante para la patogénesis de *P. aeruginosa*, principalmente visible en *backgrounds* defectivos en el reciclaje del PGN. Estos resultados podrían deberse a una actividad residual de las enzimas AmpC y OXA, degradativa del peptidoglicano que reducirían la viabilidad celular durante la infección.
- 4) Estos datos pueden ser útiles para el diseño futuro de terapias contra la virulencia de *P. aeruginosa*, basadas en el debilitamiento del PGN mediado por el bloqueo del reciclaje y la expresión de enzimas con actividad residual lítica sobre la pared celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (2004) Manual of Clinical Microbiology. Clin. Infect. Dis. 38: 1199–1200.
2. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej. 71 78–91.
3. Kersters K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Scliefer KH, (1996). Recent changes in the classification of the pseudomonads: An overview. Syst. Appl. Microbiol. 19: 465–477.
4. Stover CK, Pham XQ, Olson MV (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 406: 959–964.
5. Prats G. Libros de Microbiología y Parasitología (2013)
6. Bhandary S, Karki P, Sinha BK (2002). Malignant otitis externa: a review. Pac Health Dialog; 9(1): 64-67.
7. Mulet Aguiló, F (2015) Caracterización del mutante nfxB de *Pseudomonas aeruginosa*: papel en la resistencia antibiótica de los biofilms e interacción con los mecanismos de resistencia intrínsecos.
8. Lakhundi S, Siddiqui R, Khan NA (2017). Pathogenesis of microbial keratitis. Microb Pathog; 104: 97-109.
9. Hatchette TF, Gupta R, Marrie TJ (2000). *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. Clin Infect Dis; 31(6): 1349-1356.
10. Lynch JP (2001). Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology and treatment. Chest; 119(suppl 2): S373-S384.
11. Maschmeyer G, Braveny I (2000). Review of the incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 19(12): 915-925.
12. Cantón R, Máiz L, Escribano A, Olveira C, Oliver A, Asensio O, Gartner S, Roma E, Quintana-Gallego E, Salcedo A, Girón R, Barrio MI, Pastor MD, Prados C, Martínez-Martínez MT, Barberán J, Castón JJ, Martínez-Martínez L, Poveda JL, Vázquez C, de Gracia J, Solé A (2015). Spanish consensus on the prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bronchial infections in cystic fibrosis patients. Arch Bronconeumol; 51(3): 140-150.
13. Gilligan PH (1991). Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev; 4(1): 35-51.
14. Lodge JM, Minchin SD, Piddock LJV, Busby SJW (1990). Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal Amp-C β -lactamase. Biochem J; 272(3): 627-632.
15. Piddock LJ (2006). Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. Nat Rev Microbiol; 4(8): 629-636.
16. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science; 288(5469): 1251-1254.
17. Pérez-Gallego M (2019). Conexión entre metabolismo del peptidoglicano, resistencia a beta-lactámicos y virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*.
18. Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RH (2000). Definition of the attI1 site of class 1 integrons. Microbiology; 146(Pt 11): 2855-2864.
19. González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez M (2004). Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials. Rev Med Chil; 132(5): 619-626.
20. Livermore DM (1997). Beta-lactamases: quantity and resistance. Clin Microbiol Infect; 3(suppl 4): S10-S19.
21. Bush K, Jacoby GA (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother; 54(3): 969-976.
22. Ambler RP (1980). The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci; 289(1036): 321-331.
23. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N (2002). Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother; 50(1): 11-18.
24. Krasauskas R, Labeikytė D, Markuckas A, Povilonis J, Armalytė J, Plančiūnienė R, Kavaliauskas P, Sužiedėlienė E (2015). Purification and characterization of a new β -lactamase OXA-205 from *Pseudomonas aeruginosa*. Ann Clin Microbiol Antimicrob; 14(52): 1-8.
25. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Dupont C, Michel-Briand Y, Labia R (1993). Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 37(5): 962-969.
26. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, De Castro RZ, Glupczynski Y, Hoffmann KM (2013). GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. Antimicrob Agents Chemother; 57(1): 396-401.
27. Bradford PA (2001). What's new in beta-lactamases? Curr Infect Dis Rep; 3(1): 13-19.
28. Akinci E, Vahaboglu H (2010). Minor extended-spectrum β -lactamases. Expert Rev Anti Infect Ther; 8(11): 1251-1258.

29. Pozzi C, De Luca F, Benvenuti M, Poirel L, Nordmann P, Rossolini GM, Mangani S, Docquier JD (2016). Crystal structure of the *Pseudomonas aeruginosa* BEL-1 extended-spectrum β -lactamase and its complexes with moxalactam and imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*; 60(12): 7189-7199.
30. Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Ge Y, Oliver A (2010). Activity of a new antipseudomonal cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against carbapenem-resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*; 54(2): 846-851.
31. Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Wang HN, Doi Y (2011). PME-1, an extended-spectrum β -lactamase identified in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 55(6): 2710-2713.
32. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P (2005 [b]). Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49(8): 3593-3597.
33. Juan C, Oliver A (2010). Carbapenemas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 28(Supl 1): 19-28.
34. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K (2015). Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*; 47(2): 81-97.
35. Livermore DM, Woodford N (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*; 3(5): 489-495.
36. Tada T, Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Phuong DM, Anh NQ, Ohmagari N, Kirikae T (2015). IMP-51, a novel IMP-type metallo- β -lactamase with increased doripenem- and meropenem-hydrolyzing activities, in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*; 59(11): 7090-7093.
37. Zamorano L, Mulet X, Garau M, Gallegos C, Juan C, Pérez JL, Oliver A (2016). VIM-47, a new variant of the autochthonous metallo- β -lactamase VIM-13 from the Balearic Islands in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; 60(5): 3251-3252.
38. Paul D, Dhar D, Maurya AP, Mishra S, Sharma GD, Chakravarty A, Bhattacharjee A (2016). Occurrence of co-existing blaVIM-2 and blaNDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*; 15(31): 1-6.
39. Salabi A, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR (2010). First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*; 54(1): 582.
40. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*; 48(12): 4654-4661.
41. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y (2005). Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*; 49(11): 4485-4491.
42. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM (2013). FIM-1, a new acquired metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*; 57(1): 410-416.
43. Pfennigwerth N, Lange F, Belmar Campos C, Hentschke M, Gatermann SG, Kaase M (2017). Genetic and biochemical characterization of HMB-1, a novel subclass B1 metallo- β -lactamase found in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother*; 72(4): 1068-1073.
44. Park JT (1993). Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of *Escherichia coli*; indirect evidence for an alternative permease system and for a monolayered sacculus. *J Bacteriol*; 175(1): 7-11.
45. Chahboune A, Decaffmeyer M, Brasseur R, Joris B (2005). Membrane topology of the *Escherichia coli* AmpG permease required for recycling of cell wall anhydromuropeptides and AmpC β -lactamase induction. *Antimicrob Agents Chemother*; 49(3): 1145-1149.
46. Henderson TA, Young KD, Denome SA, Elf PK (1997). AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; 179(19): 6112-6121.
47. Juan C, Torrens G, Barceló IM, Oliver A (2018). Interplay between Peptidoglycan Biology and Virulence in Gram-Negative Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*. 12;82(4).
48. Torrens G, Hernández SB, Ayala JA, Moya B, Juan C, Cava F, Oliver A (2019). Regulation of AmpC-Driven β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Different Pathways, Different Signaling. *mSystems* 3;4(6).
49. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(12): 6349-57.
50. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A (2009). Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog* 5(3).
51. Torrens G, Sánchez-Diener I, Jordana-Lluch E, Barceló IM, Zamorano L, Juan C, Oliver A (2019). In Vivo Validation of Peptidoglycan Recycling as a Target to Disable AmpC-Mediated Resistance and Reduce Virulence Enhancing the Cell-Wall-Targeting Immunity. *J Infect Dis*. 22;220(11):1729-1737.
52. Fernández A, Pérez A, Ayala JA, Mallo S, Rumbo-Feal S, Tomás M, Poza M, Bou G (2012). Expression of OXA-type and SFO-1 beta-lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother*; 56(4): 1877-1884.

53. Zamorano L, Miró E, Juan C, Gómez L, Bou G, González-López JJ, Martínez-Martínez L, Aracil B, Conejo MC, Oliver A, Navarro F (2015). Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from Enterobacteriaceae: findings from a multicenter study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; 59(9): 5260-5266.
54. Vijayarajratnam S, Pushkaran AC, Balakrishnan A, Vasudevan AK, Biswas R, Mohan CG (2016). Bacterial peptidoglycan with amidated meso-diaminopimelic acid evades NOD1 recognition: an insight into NOD1 structure-recognition. *Biochem J*; 473(24): 4573-4592.
55. Pérez-Gallego M, Torrens G, Castillo-Vera J, Moya B, Zamorano L, Cabot G, Hultenby K, Albertí S, Mellroth P, Henriques-Normark B, Normark S, Oliver A, Juan C (2016) Impact of AmpC Derepression on Fitness and Virulence: the Mechanism or the Pathway? *mBio*. 7(5).
56. Pinilla G, Muñoz L, Gallego EA, Chavarro BB, Fandiño J (2006). Presencia de Integrines Clase 1 en Aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* de las unidades de neonatología del Instituto Materno Infantil de Bogotá.
57. Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith S, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*; 406: 959-964.
58. Zamorano L, Reeve TM, Juan C, Moyá B, Cabot G, Voadlo DJ, Mark BL, Oliver A (2011). AmpG Inactivation Restores Susceptibility of Pan- β -Lactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 55(5): 1990-1996.
59. Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, Voadlo DJ, Mark BL, Oliver A (2010) NagZ Inactivation Prevents and Reverts β -Lactam Resistance, Driven by AmpD and PBP 4 Mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 54(9): 3557-3563.
60. West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen- Janecky LJ (1994). Construction of improved Escherichia- *Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*; 148, 81-86.
61. Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moyá B, Juan C, Haussler S, Oliver A (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Ceftolozane-Tazobactam Resistance Development Requires Multiple Mutations Leading to Overexpression and Structural Modification of AmpC *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 58(6); 3091-3099.
62. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A (2009). Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; 53(11): 4930-4933.
63. Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, Bou G, Oliver A (2008). Characterization of the New Metallo- β -Lactamase VIM-13 and Its Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52(10): 3589-3596.
64. Pérez-Llarena FJ, Kerff F, Zamorano L, Carmen-Fernandez M, Luz-Nuñez M, Miró E, Oliver A, Navarro F, Bou G (2013). Characterization of the new AmpC β -lactamase FOX-8 reveals a single mutation, Phe313Leu, located in the R2 loop that affects ceftazidime hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother*; 57(10): 5158-5161.
65. Juan C, Mulet X, Zamorano L, Albertí S, Pérez JL, Oliver A (2009). Detection of the novel extended-spectrum beta-lactamase OXA-161 from a plasmid-located integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; 53(12):5288-5290.
66. Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Ge Y, Oliver A (2010). Activity of a New Antipseudomonal Cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 54(2): 846-851;
67. Juan C, Mulet X, Zamorano L, Albertí S, Pérez JL, Oliver A (2009). Detection of the novel extended-spectrum beta-lactamase OXA-161 from a plasmid-located integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; 53(12): 5288-5290.
68. Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, 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. *Infect Immun*; 71(5): 2404-2413.
69. Yakhnina AA, McManus HR, Bernhardt TG (2015). The cell wall amidase AmiB is essential for *Pseudomonas aeruginosa* cell division, drug resistance and viability. *Mol Microbiol*; 97(5): 957-973.
70. Fisher JF, Mobashery S (2014). The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Chem*; 56: 41-48. Erratum in: *Bioorg Chem* (2014); 55: 78.
71. Bishop RE, Weiner JH (1992). Coordinate regulation of murein peptidase activity and AmpC beta-lactamase synthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*; 304(2-3): 103-108.
72. Ho LA, Winogrodzki JL, Debowski AW, Madden Z, Voadlo DJ, Mark BL, Stubbs KA (2018). A mechanism-based GlcNAc-inspired cyclophellitol inactivator of the peptidoglycan recycling enzyme NagZ reverses resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Commun (Camb)*; 54(75): 10630-10633.