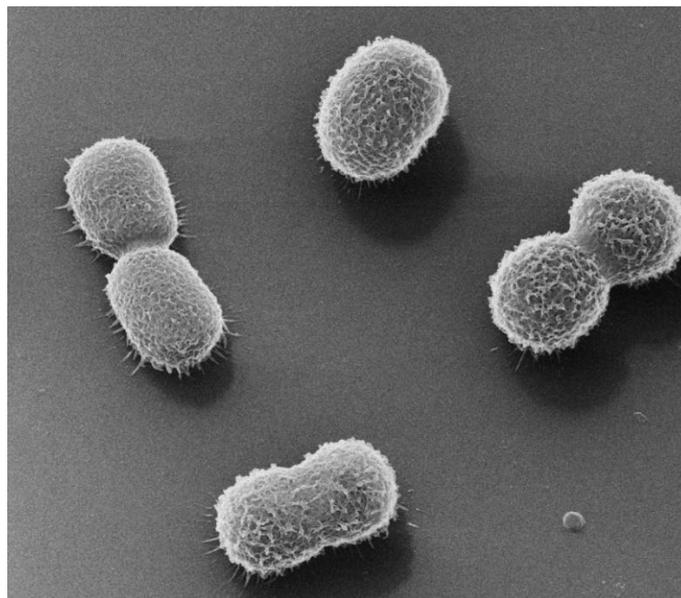




## **Sistema de biosíntesis de acinetobactina en *Acinetobacter baumannii*. Implicación en virulencia y caracterización de nuevas dianas terapéuticas**

Acinetobactin biosynthesis system in *Acinetobacter baumannii*. Implication on virulence and characterization of new therapeutic targets

Sistema de biosíntese de acinetobactina en *Acinetobacter baumannii*. Implicación en virulencia e caracterización de novas dianas terapéuticas



**Noelia Trigo Tasende**

**Trabajo de Fin de Máster**

**Julio 2018**

**Directores: Alejandro Beceiro Casas y Margarita Poza Domínguez**



La Dra. Margarita Poza Domínguez, Doctora en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña y profesora asociada de la Universidad de A Coruña y el Dr. Alejandro Beceiro Casas, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de A Coruña e Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, certifican que Noelia Trigo Tasende ha realizado, bajo su dirección, el Trabajo de Fin de Máster **“Sistema de biosíntesis de acinetobactina en *Acinetobacter baumannii*. Implicación en virulencia y caracterización de nuevas dianas terapéuticas”** y que es apto para su defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, Julio de 2018.

Margarita Poza Domínguez

Alejandro Beceiro Casas

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores, Marga y Álex, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y orientarme a lo largo de la realización de este trabajo. Gracias por vuestra dedicación y apoyo.

A mis compañer@s de laboratorio, en especial a Juan Carlos, Marta, Laura y Kelly. Gracias por vuestra paciencia y por el tiempo que me habéis dedicado, por explicarme las cosas una y mil veces, siempre con una sonrisa en la cara.

A mi mejor amiga, Sandra. Convivir juntas este año me aportó muy buenos momentos, aunque para ti supuso soportar mis quejas diarias y mi mal humor día y noche. A pesar de eso, siempre supiste animarme y hacerme reír. Sin ti no sería posible. Gracias por tu gran apoyo.

A mi prima, Leticia, por proporcionarme la cafeína suficiente para conseguir llevar adelante todo este trabajo y por estar ahí cuando necesitaba un respiro y evadirme del trabajo. Gracias por contagiarme tu alegría.

A mis compañeros del Máster. Fue una gran suerte para mí poder conocer a personas tan maravillosas como vosotros.

A mis padres y a mi hermana, por apoyarme siempre en todas mis decisiones.

A mis biólogas favoritas, Alba y Alejandra, por estar a mi lado siempre y por animarme hasta el último momento.

# ÍNDICE

## 1. RESUMEN

## 2. RESUMO

## 3. ABSTRACT

## 4. INTRODUCCIÓN

4.1. El género *Acinetobacter* spp.

4.1.1. Caracteres taxonómicos

4.1.2. Identificación de especies

4.1.3. Ambiente natural o reservorio

4.2. El patógeno *Acinetobacter baumannii*

4.2.1. Importancia clínica del patógeno *A. baumannii*

4.3. Mecanismos de resistencia de *A. baumannii*

4.4. Patogénesis y factores de virulencia

4.4.1. Adherencia y formación de *biofilm*

4.4.2. Captación de hierro

## 5. OBJETIVO

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y plásmidos

6.2. Construcción de las cepas mutantes

6.3. Modelo de sepsis en ratón

6.4. Ensayo de virulencia en *Galleria mellonella*

6.5. Análisis de curvas de crecimiento

6.6. Ensayo de susceptibilidad en suero

6.7. Análisis bioinformáticos

## 7. RESULTADOS

7.1. Modelo de sepsis en ratón

7.2. Ensayo de virulencia en *Galleria mellonella*

7.3. Análisis de curvas de crecimiento

7.4. Ensayo de susceptibilidad en suero

## 8. DISCUSIÓN

## 9. CONCLUSIONES

## 10. BIBLIOGRAFÍA



## 1. RESUMEN

*A. baumannii* es el microorganismo oportunista más conocido dentro del género *Acinetobacter* y está considerado como uno de los microorganismos más peligrosos dentro del ambiente hospitalario. Las infecciones y brotes nosocomiales causadas por este patógeno nosocomial se han incrementado notablemente en los últimos años debido a su capacidad para sobrevivir y propagarse rápidamente por el ambiente hospitalario. Su elevada plasticidad genética le permite desarrollar de forma rápida mecanismos de resistencia, lo cual favorece la aparición de cepas multirresistentes a diversas clases de antibióticos. En el presente trabajo se evalúa el papel que desempeñan los genes implicados en la ruta de síntesis del sideróforo acinetobactina en la patogénesis de *A. baumannii*. La acinetobactina es el principal sistema de captación de hierro presente en esta especie y, además, factor clave en el establecimiento de la infección bacteriana y generación de daño celular. Para estudiar la relevancia de estos genes se construyeron cepas mutantes derivadas de la cepa ATCC 17978 que fueron posteriormente analizadas en diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*.

## 2. RESUMO

*A. baumannii* é o microorganismo oportunista máis coñecido dentro do xénero *Acinetobacter* e considerado como un dos microorganismos máis perigosos dentro do ambiente hospitalario. As infeccións e brotes nosocomiais causadas por este patóxeno nosocomial incrementáronse notablemente nos últimos anos debido á súa capacidade para sobrevivir e propagarse rapidamente polo ambiente hospitalario. A súa elevada plasticidade xenética permítelle desenvolver de forma rápida mecanismos de resistencia, o que favorece a aparición de cepas multirresistentes a diversas clases de antibióticos. No presente traballo evalúase o papel que desempeñan os xenes implicados na ruta de síntesis do sideróforo acinetobactina na patoxénesis de *A. baumannii*. A acinetobactina é o principal sistema de captación de ferro presente nesta especie e, ademais, factor clave no establecemento da infección bacteriana e xeración de dano celular. Para estudar a relevancia destes xenes construíronse cepas mutantes derivadas da cepa ATCC 17978 que foron posteriormente analizadas en diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo*.

### **3. ABSTRACT**

*A. baumannii* is the most well-known opportunistic microorganism within the genus *Acinetobacter* and considered one of the most dangerous microorganisms within the hospital environment. Infections and nosocomial outbreaks caused by this nosocomial pathogen have increased markedly in recent years due to their ability to survive and spread rapidly through the hospital environment. Its high genetic plasticity allows it to develop rapid mechanisms of resistance, which favors the appearance of multiresistant strains to a variety of classes of antibiotics. In the present work the role played by the genes involved in the pathway of synthesis of the siderophore acinetobactin in the pathogenesis of *A. baumannii* is evaluated. Acinetobactin is the main iron uptake system present in this species and, furthermore, a key factor in the establishment of bacterial infection and generation of cell damage. To study the relevance of these genes, mutant strains derived from the strain ATCC 17978 were constructed and subsequently analyzed in different in vitro and in vivo assays.

### **4. INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades infecciosas representan un grave problema a nivel sanitario especialmente debido a que originan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, así como importantes costes económicos para el sistema sanitario.

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming marcó un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Desde entonces se han desarrollado nuevas familias de antibióticos que han conseguido disminuir la morbilidad y mortalidad causada por infecciones bacterianas, aunque, en las últimas décadas, el ritmo de desarrollo de estas moléculas se ha ralentizado. Debido a su elevada plasticidad genética, las bacterias han adquirido resistencias a la mayor parte de antibióticos. Además, han aparecido cepas multirresistentes o MDR (resistentes a dos o más familias de antibióticos), lo cual supone un grave problema de salud pública actualmente (Torres, 2012). Por este motivo es necesario buscar nuevas dianas terapéuticas que permitan diseñar alternativas para combatir los microorganismos multirresistentes.

Los pacientes de las unidades de cuidados intensivos (UCI) son los más susceptibles a este tipo de infecciones y proporcionan un nicho para los microorganismos oportunistas.

Estos resultan inofensivos en el caso de personas sanas, pero pueden propagarse de forma epidémica entre los pacientes. Además, su erradicación del entorno hospitalario requiere medidas específicas como pueden ser el aislamiento de los pacientes y el cierre temporal o reconstrucción de las salas (Dijkshoorn y col., 2007).

## **4.1. El género *Acinetobacter* spp.**

### **4.1.1. Caracteres taxonómicos**

La historia del género *Acinetobacter* se remonta a comienzos del siglo XX con el descubrimiento del microorganismo *Micrococcus calcoaceticus*. En 1954, Brisou y Prevot propusieron la designación actual del género *Acinetobacter* con el fin de separar los microorganismos móviles de los inmóviles, aunque no fue hasta 1968 cuando esta designación empezó a ser ampliamente aceptada. El género *Acinetobacter* fue reconocido oficialmente en 1971 por el “Subcomité sobre la taxonomía de *Moraxella* y bacterias relacionadas” (Lessel, 1971). En 1991 se propuso clasificar a los miembros del género *Acinetobacter* en la nueva familia *Moraxellaceae*, dentro del orden *Gammaproteobacteria*, que incluye géneros como *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y organismos relacionados (Rossau y col., 1991). El género *Acinetobacter* engloba 73 especies, de las cuales 58 están validadas (<https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>, último acceso Junio del 2018).

En la actualidad, dentro del género *Acinetobacter* se incluyen las especies: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (antiguamente conocida como *Acinetobacter* especie genómica 3), *A. nosocomialis* (antiguamente conocida como *Acinetobacter* especie genómica 13 TU), *A. seifertii* y *A. dijkschoorniae*. Están altamente relacionadas entre sí y son difíciles de distinguir a nivel fenotípico, por lo cual se ha propuesto incluir a estas especies dentro del denominado complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB). Este grupo representa las cepas de *Acinetobacter* que frecuentemente están relacionadas con infecciones humanas y brotes hospitalarios, pero también incluye a la especie típicamente ambiental *A. calcoaceticus* (Peleg y col., 2008).

### **4.1.2. Identificación de especies**

El género *Acinetobacter* comprende un grupo heterogéneo de microorganismos Gram-negativos, aerobios estrictos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no flagelados, no

fermentadores y con un contenido de guanina y citosina en su ADN de entre el 39% y el 47%.

Las especies que componen el género crecen bien en medios de cultivo sólidos utilizados de forma rutinaria en el laboratorio, en condiciones de aerobiosis y a una temperatura de incubación de 37°C. Estos microorganismos forman colonias lisas o con aspecto mucoso y de un color blanco o grisáceo. Las colonias del complejo ABC presentan un diámetro de 1,5 a 3 mm después ser incubadas durante la noche. Sin embargo, otras especies del género forman colonias de menor tamaño y translúcidas.

#### **4.1.3. Ambiente natural o reservorio**

La mayoría de las especies del género *Acinetobacter* se consideran ubicuas, se aíslan a partir de una gran variedad de nichos ecológicos como la piel humana (Seifert y col., 1997), el suelo o el agua (Baumann, 1968).

Ejemplos de *Acinetobacter* distribuidos ampliamente en la naturaleza son: *A. calcoaceticus*, presente en el agua, el suelo y sobre vegetales; *Acinetobacter* especie genómica 3, presente en el agua, el suelo, en las verduras y en la piel humana; *A. johnsonii*, presente en el agua, el suelo, en la piel y heces humanas; *A. lwoffii* y *A. radioresistens*, presentes en la piel humana y *Acinetobacter* especie genómica 11, presente en agua, el suelo, en vegetales y en el tracto intestinal humano (Peleg y col., 2008). Hay pocas evidencias de que *A. baumannii* sea un organismo típico del suelo y su presencia en el ambiente es rara (Dijkshoorn, 2007).

#### **4.2. El patógeno *Acinetobacter baumannii***

*A. baumannii* es el patógeno oportunista más conocido dentro del género *Acinetobacter*. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) ha incluido a este patógeno dentro del término ESKAPE, el cual engloba a los microorganismos más peligrosos que se encuentran en hospitales de todo el mundo y que a lo largo del tiempo han adquirido una gran variedad de mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos (Towner, 2009). *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y la familia Enterobacteriaceae se incluyen en este grupo (Talbot y col., 2006).

#### **4.2.1. Importancia clínica del patógeno *A. baumannii***

Esta especie posee una elevada capacidad para sobrevivir y propagarse rápidamente por el ambiente hospitalario y de desarrollar mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Esto explica el hecho de que las infecciones y brotes nosocomiales causadas por este patógeno se hayan incrementado notablemente en los últimos años. Cada vez es más frecuente que estas infecciones sean causadas por cepas multirresistentes (Cisneros y Pachón, 2003).

Los factores de riesgo que conllevan a la colonización o infección del paciente por *A. baumannii* no son diferentes a los descritos para otros microorganismos MDR. Se pueden clasificar en:

- Factores del propio paciente: cirugía mayor, traumas, enfermedades graves subyacentes o bebés prematuros.
- Factores relacionados con la exposición: estancia hospitalaria larga, estancia en la UCI, estancia en un habitáculo con *A. baumannii* endémico o la exposición a equipo médico contaminado.
- Factores relacionados con el tratamiento médico: ventilación mecánica, presencia de dispositivos invasivos (catéteres o tubos de drenaje), número de procedimientos invasivos realizados y terapia previa antimicrobiana.
- Otros factores de riesgo específicos para un entorno particular son la hidroterapia (empleada para tratar pacientes quemados) y el tratamiento de lavado pulsátil (para el desbridamiento de la herida) (Dijkshoorn y col., 2007).

*A. baumannii* produce una gran variedad de infecciones tales como neumonías, bacteriemias, endocarditis, infecciones de la piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario y meningitis. Las manifestaciones clínicas más comunes y con las tasas de mortalidad más altas son la neumonía adquirida en el hospital y las bacteriemias (Dijkshoorn y col., 2007). La neumonía adquirida en el hospital suele estar asociada a ventilación mecánica y se produce por la colonización de las vías respiratorias del paciente (Peleg y col., 2008).

*A. baumannii* también puede causar lo que se conoce como neumonía comunitaria. Se ha observado casi exclusivamente en climas tropicales, en particular en el sudeste de Asia y Australia tropical. Suele estar relacionada con otro tipo de problemas previos, como el

alcoholismo, el tabaquismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la diabetes mellitus. Se caracteriza por una alta incidencia de bacteriemia y una alta tasa de mortalidad (entre el 40% y el 64%), lo cual dificulta poder determinar el verdadero impacto clínico del microorganismo y calcular la mortalidad debida exclusivamente a la infección y no a las enfermedades subyacentes (Peleg y col., 2008).

La bacteriemia causada por *A. baumannii* se debe principalmente a infecciones del tracto respiratorio inferior y raramente es producida por heridas e infecciones del tracto urinario. Los factores de riesgo que predisponen a sufrir bacteriemias son la inmunosupresión, el uso de ventilación asociada a fallo respiratorio, la terapia antimicrobiana previa, la colonización por *A. baumannii* y los procedimientos invasivos. La tasa de mortalidad asociada a bacteriemia oscila entre el 28% y el 43% (Seifert y col., 1997).

Las infecciones en quemaduras producidas por *A. baumannii* son muy difíciles de tratar debido a la baja capacidad de penetración del antibiótico en la zona quemada. Esta especie fue identificada como la causa más común de este tipo de infecciones en personal militar (McConnell y col., 2013). Además, piojos, pulgas y garrapatas pueden funcionar como vectores en la transmisión de la neumonía adquirida en la comunidad (Giamarellou y col., 2008), aunque es muy poco frecuente.

### **4.3. Mecanismos de resistencia de *A. baumannii***

Los factores implicados en el concepto de resistencia clínica son el tipo de bacteria infectante y su localización en el cuerpo, la distribución del antibiótico en el cuerpo y su concentración en el lugar de la infección, así como el estado inmunológico del paciente. La resistencia a agentes antimicrobianos se clasifica en dos tipos: intrínseca o adquirida. La primera ocurre de forma natural debido a la baja permeabilidad de membrana y a las bombas de expulsión. La segunda ocurre fundamentalmente debido a mutaciones o captación de ADN foráneo (Hawkey, 1998).

La gran plasticidad genética *A. baumannii* explica su capacidad para adquirir de forma rápida gran variedad de mecanismos de resistencia, lo cual favorece la aparición de cepas multirresistentes a diversas clases de antibióticos (Giamarellou y col., 2008). El notable aumento de la resistencia a agentes antimicrobianos experimentado por *A. baumannii* a lo largo de las últimas décadas ha generado una reducción del número de tratamientos eficaces frente a estas infecciones.

Entre los factores que favorecen la adquisición de la multirresistencia en *A. baumannii* destacan: la capacidad de subsistir en el ambiente y en el cuerpo humano, facilitando la transferencia de material genético entre microorganismos; la capacidad de adquirir elementos genéticos como plásmidos, integrones o transposones y la baja permeabilidad de membrana a ciertos antibióticos o la expresión de bombas de expulsión (Vila y col., 2007).

La edad de oro de los antimicrobianos comenzó a partir del descubrimiento de la penicilina. Los antibióticos beta-lactámicos son la familia más numerosa y los más empleados en la práctica clínica. Su estructura se caracteriza por la presencia de un anillo beta-lactámico esencial para ejercer su función. Los principales mecanismos de resistencia a antibióticos beta-lactámicos descritos en *A. baumannii* incluyen la modificación de la diana del antibiótico (PBPs), la inactivación enzimática, el descenso de expresión de proteínas de membrana externa y las bombas de expulsión. Las proteínas de unión a penicilina (PBPs) están implicadas en los últimos pasos de la biosíntesis de la capa de peptidoglicano, por tanto, son necesarias para la formación de la pared bacteriana (McConnell y col., 2013). Su modificación reduce la afinidad de unión por el antibiótico causando una disminución de su actividad (Zapun y col., 2008).

Las porinas son proteínas que establecen canales en las membranas permitiendo el transporte de ciertas moléculas. Cambios en su estructura o la regulación de su expresión constituyen un mecanismo de resistencia en presencia del antibiótico. *A. baumannii* presenta un número muy bajo de porinas y, por tanto, una baja permeabilidad de membrana. Esta característica, junto con la expresión constitutiva de algunas bombas de eflujo explican la resistencia intrínseca a antibióticos de *A. baumannii* (Vila y col., 2007).

Las bombas de expulsión son mecanismos de membrana que regulan la salida de compuestos tóxicos de la célula, como es el caso de los antibióticos, impidiendo ejercer su efecto bactericida en el interior de la célula. La multirresistencia bacteriana suele estar asociada a la sobreexpresión de estos transportadores de eflujo. Los antibióticos que son expulsados al exterior de la célula tienen que atravesar la membrana externa de baja permeabilidad para volver a entrar. Por ello, se dice que las bombas de expulsión trabajan de forma sinérgica con la baja permeabilidad de membrana externa (Vila y col., 2007).

El mecanismo de resistencia mayoritario frente a los antibióticos es la inactivación enzimática mediada por las beta-lactamasas. Estas enzimas actúan hidrolizando el anillo beta-lactámico del antibiótico provocando su inactivación. Se trata de enzimas codificadas por un gen con localización cromosómica o plasmídica que puede diseminarse a través de diversos mecanismos. Su expresión puede ser inducible o constitutiva (Merino, 2016).

#### **4.4. Patogénesis y factores de virulencia**

La patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad. Con el aumento de las infecciones producidas por *A. baumannii* en los últimos años, se ha profundizado más en el estudio de los factores de virulencia que le permiten a la bacteria colonizar o infectar el huésped con éxito. El éxito de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario se atribuye a diversos factores, entre los que destacamos su capacidad para formar *biofilm* y de adherirse, colonizar e invadir células epiteliales humanas, así como también se incluyen los mecanismos de resistencia a antibióticos citados antes (Cerqueira y Peleg, 2011).

Se han descrito pocos factores de virulencia en *A. baumannii* en comparación con otros patógenos Gram-negativos. Sin embargo, en los últimos años, estudios basados en análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos y el uso de modelos animales han permitido identificar factores de virulencia implicados en el proceso de patogénesis de *A. baumannii* (McConnell y col., 2013). Entre ellos se incluyen: proteínas de membrana externa (OmpA, Omp33-36, Omp22), lipopolisacárido (LPS), polisacárido capsular, fosfolipasas (PLC y PLD), vesículas de membrana externa, proteína de unión a penicilina (PBP7/8), sistemas de secreción tipo II, V y VI y el sistema de captación de hierro de acinetobactina (Lee y col., 2017).

##### **4.4.1. Adherencia y formación de *biofilm***

*A. baumannii* presenta una capacidad intrínseca para interactuar con diferentes tipos de superficies bióticas y abióticas y de adherirse a ellas. Puede colonizar superficies inertes como material hospitalario (catéteres y equipos respiratorios), y también superficies bióticas, como células epiteliales humanas o filamentos de *Candida albicans* (McConnell y col., 2013).

La adherencia de las bacterias a estas superficies genera la formación de *biofilm* o biopelículas en los cuales las bacterias se dividen para formar microcolonias y terminar generando comunidades microbianas bien estructuradas. El *biofilm* es un complejo multicelular basado en la asociación tridimensional de células bacterianas en contacto íntimo y embebidas en una matriz extracelular sintetizada por ellas mismas. La composición de esta matriz incluye exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. Este estado sésil le confiere a la bacteria una barrera protectora que le permite sobrevivir en ambientes hostiles. Las bacterias que constituyen el *biofilm* son más resistentes al estrés o antibióticos que las de vida libre o planctónica. Por este motivo, la capacidad de formar *biofilm* es un importante factor de virulencia.

La disponibilidad de nutrientes, la presencia de apéndices bacterianos, los componentes superficiales de la bacteria (adhesinas o proteínas de membrana externa), el *quorum sensing* y la secreción de moléculas al exterior son algunos de los factores implicados más comúnmente en la formación del *biofilm* (Roca y col., 2012).

Se distinguen tres etapas en la formación del *biofilm* bacteriano. La primera consiste en la adhesión de las bacterias a superficies abióticas o bióticas. En la segunda etapa se produce la maduración del *biofilm* y consiste en la formación de una estructura tridimensional y bien organizada en la que están implicados factores de adhesión y proliferación. En esta etapa también se establecen canales que permiten la entrada de nutrientes. La tercera y última etapa es el desprendimiento del *biofilm*, en el cual las células se liberan dispersando la infección (O'Toole y col., 2000).

#### **4.4.2. Captación de hierro**

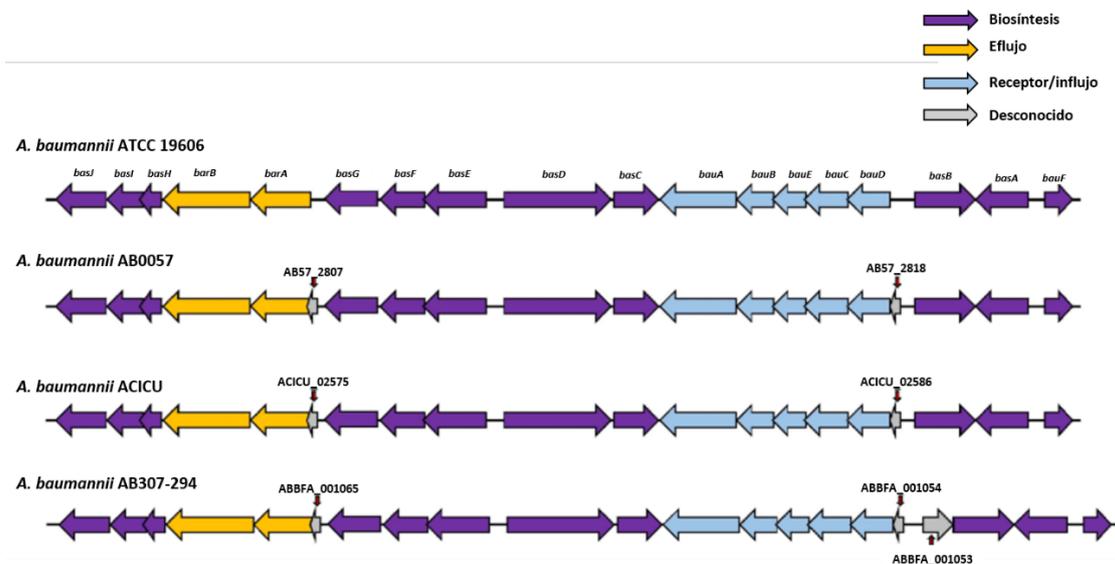
El hierro es un micronutriente esencial para el huésped y las bacterias patógenas debido a su participación en muchas reacciones vitales, actuando como cofactor de una gran variedad de enzimas. Es uno de los principales factores limitantes de las bacterias patógenas y, por este motivo, la mayoría de ellas desarrollaron estrategias de captación de hierro en su competencia con el huésped con el fin de llegar a colonizar al ser humano.

Estudios realizados con el gen A1S\_0242 (*feoA*), implicado en la captación de hierro de *A. baumannii*, revelan una sobreexpresión de este durante el curso de una neumonía (Álvarez-Fraga y col., 2018). Se demuestra la contribución de este gen a la patogénesis de la bacteria y su importante papel en adherencia, resistencia al estrés oxidativo,

formación de *biofilm* y virulencia, encontrando una potencial diana terapéutica para combatir la multirresistencia.

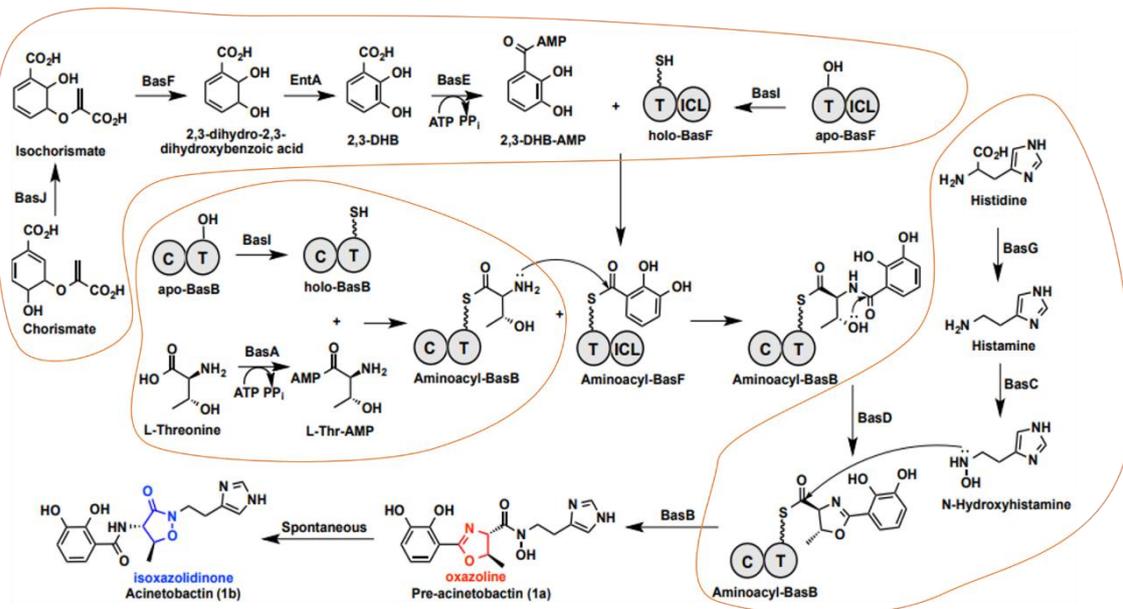
En condiciones limitantes de hierro, *A. baumannii* expresa sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad denominados sideróforos, quelantes del hierro. El mejor caracterizado en esta especie se denomina acinetobactina y fue identificado por primera vez en la cepa tipo ATCC 19606 (Yamamoto y col., 1994). Su estructura molecular está muy relacionada con la anguibactina, un quelante del hierro de alta afinidad secretado por el patógeno de peces *Vibrio anguillarum* 775 (Dorsey y col., 2004).

Los genes implicados en la biosíntesis y el transporte de acinetobactina se agrupan dentro del genoma de *A. baumannii* (Hasan y col., 2015). En concreto, se conocen 18 regiones codificantes en el cromosoma de la cepa ATCC 19606 (Fig. 1).



**Figura 1.** Mapa del *cluster* de genes de acinetobactina en diferentes cepas de *A. baumannii*. Cada color indica una función biológica; biosíntesis, transporte y recepción de acinetobactina. Las flechas rojas representan los genes que fueron añadidos al *cluster* de genes de acinetobactina (Hasan y col., 2015).

Dentro del grupo de genes de acinetobactina se habla de tres sistemas diferentes implicados en la biosíntesis, transporte y recepción de este compuesto. La biosíntesis de acinetobactina está mediada por las proteínas codificadas por los genes *basA*, *basB*, *basC*, *basE*, *basD*, *basF*, *basG*, *basH*, *basI* y *basJ* (Fig. 2). Del transporte se encarga un sistema de eflujo de la superfamilia ABC compuesto por las proteínas codificadas por los genes *barA* y *barB*. Por último, la recepción de acinetobactina está codificada por los genes *bauA*, *bauB*, *bauC*, *bauD*, *bauE* y *bauF*.



**Figura 2.** Esquema de biosíntesis de acinetobactina. Figura modificada de la referencia (Shapiro y Wenciewicz, 2016).

Estudios realizados con mutantes de los genes *basD*, *bauA* y *bauD* (Gaddy y col., 2012) y resultados obtenidos de ensayos de sepsis en ratón confirmaron que el sistema de captación de hierro mediado por acinetobactina es un factor esencial para la supervivencia de *A. baumannii* en condiciones limitantes de hierro y, además, es fundamental en el establecimiento de la infección bacteriana y generación de daño celular (Hasan y col., 2015).

## 5. OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo consistió en llevar a cabo un estudio de la implicación en virulencia de los genes de la ruta de síntesis de acinetobactina presentes en la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, con el fin de encontrar nuevas dianas terapéuticas para combatir la multiresistencia de este patógeno nosocomial.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y plásmidos

Las cepas *A. baumannii* ATCC 17978 (código de acceso Genbank NC\_009085.1) y *E. coli* TG1 se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB). Para el cultivo en placas se suplementó el medio con un 2% de agar. Las cepas se crecieron a 37°C y en continua agitación (180 rpm). Posteriormente, se conservaron a -80°C en LB con 10% de

glicerol. El medio de cultivo fue suplementado con kanamicina (Km) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración final de 50µg/mL para la selección de las cepas recombinantes. Los plásmidos se extrajeron usando el *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). Se empleó el medio Müller-Hinton (MH) para la realización de las de curvas de crecimiento. La cepa ATCC 17978 se utilizó como referencia para los experimentos descritos en este trabajo. La cepa *E. coli* TG1 se empleó para los métodos de clonación.

Los preinóculos de la cepa salvaje ATCC 17978 y cepas mutantes derivados de ésta (Tabla 1) se prepararon a partir de una colonia aislada en placa de LB agar y luego crecida en 5 mL de LB durante una noche. Se diluyó 1 mL del cultivo resultante en 100 mL de LB y se incubó el inóculo a 37°C y en continua agitación (180 rpm). Las células se recogieron durante la fase exponencial ( $OD_{600nm}=0,7$ ) y luego se centrifugaron (4000 rpm, 15 min, 4°C). Los cultivos se ajustaron a la concentración adecuada con suero fisiológico. La concentración de la cepa inoculada se determinó mediante conteo directo de placas de LB agar incubadas a 37°C y durante 24 h.

**Tabla 1.** Cepas de *A. baumannii* empleadas en el presente trabajo.

Cepa	Características relevantes
Cepa salvaje ATCC 17978*	Aislado clínico
Δ2372	Mutante del gen <i>basJ</i> (A1S_2372)
Δ2373	Mutante del gen <i>basI</i> (A1S_2373)
Δ2374	Mutante del gen <i>basH</i> (A1S_2374)
Δ2379	Mutante del gen <i>basG</i> (A1S_2379)
Δ2380	Mutante del gen <i>basF</i> (A1S_2380)
Δ2382/2383	Mutante del gen <i>basD</i> (A1S_2382/2383)
Δ2384	Mutante del gen <i>basC</i> (A1S_2384)
Δ2390	Mutante del gen <i>basB</i> (A1S_2390)
Δ2391	Mutante del gen <i>basA</i> (A1S_2391)

\*American Type Culture Collection

## 6.2. Construcción de las cepas mutantes

Las cepas mutantes se construyeron usando el plásmido pMo130-TelR (código de acceso Genbank EU862243) cedido por Chua Kim Lee (Universidad de Singapur). Se trata de un vector suicida que contiene los genes *xylE*, *sacB* y los *cassettes* de resistencia a telurito y kanamicina. El plásmido se utilizó tal y como se ha descrito previamente (Álvarez-Fraga y col., 2016).

Se amplificaron y clonaron regiones de, aproximadamente, unos 1000 pb localizadas aguas arriba y aguas abajo del gen de interés en el vector pMo130-TelR empleando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. El plásmido resultante se utilizó para transformar la cepa *E. coli* TG1 con el fin de amplificar el número de copias. Posteriormente, se electroporó en la cepa ATCC 17978. Las colonias recombinantes, que representan el primer evento de entrecruzamiento, se seleccionaron con kanamicina y se visualizó la actividad del gen *xylE* siguiendo el método basado en catecol (Hamad y col., 2009). Las colonias resistentes a kanamicina de color amarillo se crecieron en 5 mL de LB suplementado con 25% de sacarosa durante una noche y en continua agitación (180 rpm) y, posteriormente, se sembraron en LB agar. En este paso se consigue la expulsión del plásmido con el gen de interés. Esto es debido a la presencia del gen *sacB*, que impide el crecimiento de la bacteria en presencia de sacarosa. Las colonias que representan el segundo evento de entrecruzamiento, en el cual se produce la delección del gen, se confirmaron por PCR usando los cebadores descritos en la Tabla 2. Las construcciones de las cepas mutantes se confirmaron de forma independiente por RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) a tiempo real.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo.

Cebador	Secuencia	Uso en el presente trabajo
AIS_2372UPFwPstI	gggCTGCAGTTACATGGACATTAGATAGCT	Construcción de la cepa Δ2372
AIS_2372UPRvEcoRV	gggGATATCCAGAAGCTAAAATGCAAACC	Construcción de la cepa Δ2372
AIS_2372DOWNFwEcoRV	gggGATATCTCTGTATATCACCTCTCACA	Construcción de la cepa Δ2372
AIS_2372DOWNRvBamHI	gggGGATCCGCATGGCAACAACACACAG	Construcción de la cepa Δ2372
AIS_2372intUPFw	GTATTCACGGTACACCAA	Confirmación de la delección del gen AIS_2372
AIS_2372intDOWNRv	CTAGATGGCACGTTTCTTTA	Confirmación de la delección del gen AIS_2372
AIS_2373UPFwPstI	gggCTGCAGGTTTAAGGCATCGGGAG	Construcción de la cepa Δ2373
AIS_2373UPRvEcoRV	gggGATATCATTACAATTTCTTGCAATTGA	Construcción de la cepa Δ2373
AIS_2373DOWNFwEcoRV	gggGATATCAGCATGGACTTTATTCAATA	Construcción de la cepa Δ2373
AIS_2373DOWNRvBamHI	gggGGATCCATGCGCCGATTTTAATACT	Construcción de la cepa Δ2373
AS1_2373intUPFw	GATTTTGATGGCCTTGCTTT	Confirmación de la delección del gen AIS_2373
AIS_2373intDOWNRv	CAATTACTTAGCGAGAAGAT	Confirmación de la delección del gen AIS_2373
AIS_2374UPFwstI	gggCTGCAGAGGTGTATTTAACGTTTTAA	Construcción de la cepa Δ2374
AIS_2374UPRvSacI	gggGAGCTCAGTCCATGCTATGAATAC	Construcción de la cepa Δ2374
AIS_2374DOWNFwSacI	gggGAGCTCATTATATTGATGTTTATTCAC	Construcción de la cepa Δ2374
AIS_2374DOWNRvBamHI	gggGGATCCGAGACATTAGTACGGATC	Construcción de la cepa Δ2374
AIS_2374IntUPFw	GCGTTGTAATGCATATTTT	Confirmación de la delección del gen AIS_2374
AIS_2374intDOWNRv	TGCCTTGATGAAGAGA	Confirmación de la delección del gen AIS_2374
AIS_2379UPFwPstI	gggCTGCAGCGATTATCACGAATGCC	Construcción de la cepa Δ2379
AIS_2379UPRvSacI	gggGAGCTCATTGATAGCTTAATTGACGA	Construcción de la cepa Δ2379
AIS_2379DOWNFwSacI	gggGAGCTCTTTTGTCTCCGTTAATATG	Construcción de la cepa Δ2379
AIS_2379DOWNRvBamHI	gggGAGCTCTTTTGTCTCCGTTAATATG	Construcción de la cepa Δ2379
AS1_2379intUPFw	TAACCACCTATCAAAAATA	Confirmación de la delección del gen AIS_2379
AIS_2379intDOWNRv	GCAGTTTTCTTCGGAAC	Confirmación de la delección del gen AIS_2379
AIS_2380UPFwNotI	gggGCGGCCGCAATTTTAGACAATGTTGAATT	Construcción de la cepa Δ2380
AIS_2380UPRvSacI	gggGAGCTCAGGGTTGCCATCATAAGGC	Construcción de la cepa Δ2380

A1S_2380DOWNFwSacI	gggGAGCTCATGCTGCTCAATATTTATTA	Construcción de la cepa Δ2380
A1S_2380DOWNRvBamHI	gggGGATCCGACTACGACTATAGTGTGC	Construcción de la cepa Δ2380
A1S_2380IntUPFw	AATAGAGAATTTGAAAAACG	Confirmación de la delección del gen A1S_2380
A1S_2380intDOWNRv	AGTTATACACGCAGCTTTG	Confirmación de la delección del gen A1S_2380
A1S_2382/2383UPFwNotI	gggGCGGCCGCGTATTTCGAGTTTAAACCGCA	Construcción de la cepa Δ2382/2383
A1S_2382/2383UPRvSacI	gggGTTCGACGTCGTTGAAGTGCTAAATGT	Construcción de la cepa Δ2382/2383
A1S_2382/2383DOWNFwSacI	gggGTTCGACATTCGATTTTGAACCTTCATC	Construcción de la cepa Δ2382/2383
A1S_2382/2383DOWNRvBamHI	gggGGATCCACCCGATTCAAGTTCTTTAA	Construcción de la cepa Δ2382/2383
A1S_2382/2383intUPFw	CCAGCGAACAACTCAATC	Confirmación de la delección del gen A1S_2382/2383
A1S_2382/2383intDOWNRv	CAATAGCAACCCTTCATGC	Confirmación de la delección del gen A1S_2382/2383
A1S_2384UPFwPstI	gggCTGCAGACAGTTGTCTAAAATTGGCG	Construcción de la cepa Δ2384
A1S_2384UPRvEcoRV	gggGATATCGTTTATACTTTATCTGTTCC	Construcción de la cepa Δ2384
A1S_2384DOWNFw2EcoRV	GggGATATCTCTTTCCAGCATTATGGTTTA	Construcción de la cepa Δ2384
A1S_2384DOWNRv2BamHI	gggGGATCCGTTCTATTGCCCTATTTT	Construcción de la cepa Δ2384
A1S_2384intUPFw	GTGGACAACCTCAACTCATT	Confirmación de la delección del gen A1S_2384
A1S_2384intDOWNRv	ACTATTTCGCGGAATATTGA	Confirmación de la delección del gen A1S_2384
A1S_2390UPFwNotI	ttGCGGCCGaaAGTTAACGACACTAAAATTC	Construcción de la cepa Δ2390
A1S_2390UPRvKpnI	cggGGTACCcggAAACGTCGTTAACTTGT	Construcción de la cepa Δ2390
A1S_2390DOWNFwKpnI	cggGGTACCcggAACCTTAGCTCAAATCTAG	Construcción de la cepa Δ2390
A1S_2390DOWNRvBamHI	cgcGGATCCcgcAATTGGAGTATATGGCAT	Construcción de la cepa Δ2390
A1S_2390intUPFw	GACATCAACTCATTAGAAAA	Confirmación de la delección del gen A1S_2390
A1S_2390intDOWNRv	CTTCTAAAACACAGTCATC	Confirmación de la delección del gen A1S_2390
A1S_2391UPFwPstI	gggCTGCAGGAACTTCCCTTAAGAATTCG	Construcción de la cepa Δ2391
A1S_2391UPRvEcoRV	gggGATATCAAAAATTGAAATGTGCTTAA	Construcción de la cepa Δ2391
A1S_2391DOWNFwEcoRV	gggGATATCTGCTGTTGATTGGAATTTT	Construcción de la cepa Δ2391
A1S_2391DOWNRvBamHI	gggGGATCCCTCAATGAAAATATCCGCAC	Construcción de la cepa Δ2391
A1S_2391intUPFw	ACGTGATGAATCGATGTTG	Confirmación de la delección del gen A1S_2391
A1S_2391intDOWNRv	TAGACGATAGAATTAGTTAC	Confirmación de la delección del gen A1S_2391
pMo130 site2 Fw	ATTCATGACCGTGCTGAC	Confirmación de la construcción del plásmido
pMo130 site2 Rv	CTTGTCTGTAAGCGGATG	Confirmación de la construcción del plásmido

### 6.3. Modelo de sepsis en ratón

La virulencia de la cepa salvaje y las cepas mutantes de *A. baumannii* se evaluó en términos de supervivencia y mortalidad de ratones como previamente se ha descrito (Beceiro y col., 2014). Se realizaron varios ensayos empleando grupos de entre 8 y 10 ratones hembras de la especie *Mus musculus* con un peso alrededor de 20 g y una edad de entre 2 y 3 meses (Fig. 3).

La infección se realizó mediante una inyección intraperitoneal de 100 μL del inóculo que contienen 25x10<sup>8</sup> UFCs/mL. Los ratones se controlaron durante una semana y los que sobrevivieron después de este periodo fueron sacrificados con una sobredosis de tiopental sódico.

Los resultados fueron analizados usando el test de log-rank (Mantel-Cox). Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos con un valor de  $P \leq 0,05$ . Los ratones se mantuvieron en una instalación libre de patógenos en el Centro Tecnológico de Formación (CTF) del Hospital de A Coruña (CHUAC, España)

(P2015/82). Todos los experimentos se hicieron con la aprobación y de acuerdo con las pautas establecidas por el Comité Ético de Experimentación Animal del CHUAC.



**Figura 3.** Ratones infectados con la cepa mutante  $\Delta 2384$  de *A. baumannii*.

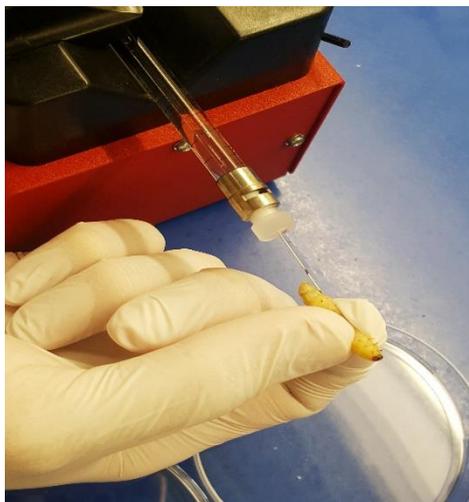
#### **6.4. Ensayo de virulencia en *Galleria mellonella***

Se realizó un ensayo de supervivencia en larvas de *G. mellonella* para evaluar la virulencia de la cepa salvaje y los mutantes  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2382/2383$ ,  $\Delta 2384$  y  $\Delta 2390$ . Las larvas, procedentes de Bio Systems Technology (Exeter, UK), se almacenaron a 15°C y se utilizaron dentro de los 15 días posteriores a su llegada.

Se emplearon grupos de 10 larvas seleccionadas al azar. Se limpió suavemente la cutícula de la larva con etanol y se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  del inóculo correspondiente con una concentración de, aproximadamente,  $30 \times 10^7$  UFCs/larva, como previamente se ha descrito (Hornsey y col., 2012). La inyección se realizó en el hemocele empleando una bomba de jeringa (New Era Pump Systems, Inc., Wantagh, NY) con una aguja de calibre 26 (Fig. 4). Se incluyeron dos grupos control. El primer grupo incluía larvas infectadas con un volumen equivalente de suero fisiológico y el segundo grupo incluía larvas intactas (no infectadas). Para simplificar, los grupos control no están incluidos en la figura.

Después de la infección, las larvas se incubaron a 37°C y en oscuridad. La muerte se evaluó a intervalos de 8-12 h durante 7 días. Las orugas se consideraron muertas y fueron eliminadas cuando no mostraron ningún movimiento en respuesta al tacto. Las curvas de supervivencia resultantes se trazaron empleando el método de Kaplan-Meier (Kaplan y

Meier, 1958) y se analizaron con el test de log-rank (Mantel-Cox). Los valores de  $P \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.



**Figura 4.** Infección de larvas de *G. mellonella* con la bacteria *A. baumannii*.

### **6.5. Análisis de curvas de crecimiento**

La *fitness in vitro* se evaluó midiendo las tasas de crecimiento de la cepa salvaje y las cepas mutantes de *A. baumannii*. Las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron en placas de 48 pocillos durante un periodo de tiempo de 8,19 h. Se inocularon 5  $\mu\text{L}$  del preinóculo bacteriano en fase estacionaria en 500  $\mu\text{L}$  de MH y se incubó a 37°C y en constante agitación (180 rpm). Los valores de  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de las muestras se grabaron cada 10 min en un espectrofotómetro para microplacas Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc.) El ensayo se realizó en MH suplementado con 200  $\mu\text{M}$  del quelante de hierro 2,2'-bipiridilo (BIP, Sigma-Aldrich) (condiciones deficientes de hierro). Se hicieron 2 réplicas por cada cepa.

### **6.6. Ensayo de susceptibilidad en suero**

Simulando las condiciones de una bacteriemia, se estudió la susceptibilidad en suero de la cepa salvaje y las cepas mutantes  $\Delta 2379$ ,  $\Delta 2382/2383$ ,  $\Delta 2384$  y  $\Delta 2390$  de *A. baumannii* en suero humano empleando placas de 96 pocillos. Se realizó una dilución 1:25 con un volumen de 4  $\mu\text{L}$  del inóculo en 96  $\mu\text{L}$  de suero. Se incubó la placa a 37°C y en continua agitación (180 rpm). Se plaquearon las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  de las muestras a tiempo 0 y a los 120 min en LB agar. Se confirmaron los inóculos mediante el conteo directo de las placas incubadas a 37°C durante 24 h. Se hicieron tres réplicas por cada cepa. El

porcentaje de supervivencia se calculó tomando como referencia la cepa salvaje a tiempo 0. Los resultados se compararon mediante la prueba t de Student.

### **6.7. Análisis bioinformáticos**

Se utilizó el software MAUVE (versión 2.3.1) para los análisis de genómica comparativa (Darling y col., 2004). Los análisis genéticos se llevaron a cabo mediante la herramienta blast (*basic local Alignment Search Tool*) del NCBI. Para analizar las construcciones utilizamos el programa online Clustal Omega (Sievers y col., 2011). El análisis de las curvas de supervivencia y de crecimiento se realizó empleando el software Prism (versión 6.0) (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc.).

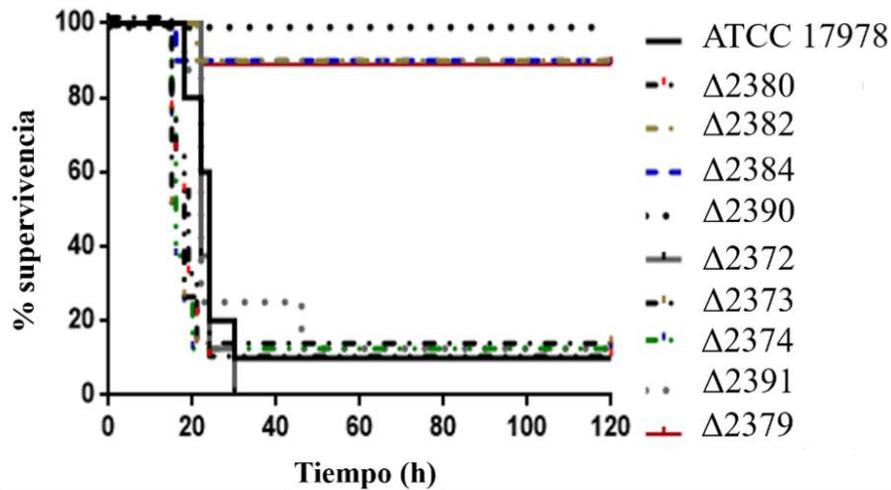
## **7. RESULTADOS**

El hierro es esencial para las funciones vitales de las bacterias. La restricción de hierro en el entorno del huésped funciona como un mecanismo de defensa inmune que le permite a *A. baumannii* crecer en condiciones limitantes de hierro, como las que ocurren durante la infección humana. A pH neutro y en condiciones aeróbicas, el hierro férrico Fe<sup>+3</sup> es insoluble. Por este motivo, la bacteria necesita los sideróforos para la absorción de hierro como la acinetobactina, también necesaria para la virulencia.

En este trabajo estudiamos la implicación de los genes que conforman la ruta de biosíntesis de acinetobactina en virulencia y *fitness* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978. Para descubrir el papel de estos genes durante el curso de una infección *in vivo* se realizaron experimentos en modelos animales de *G. mellonella* y ratón.

### **7.1. Modelo de sepsis en ratón**

Con el fin de evaluar el papel del sistema de adquisición de hierro mediado por acinetobactina en un huésped mamífero, realizamos un ensayo de supervivencia en ratón (Fig. 5). Este modelo produce una sepsis aguda en la que *A. baumannii* se disemina rápidamente por todo el cuerpo a diferentes sistemas orgánicos.



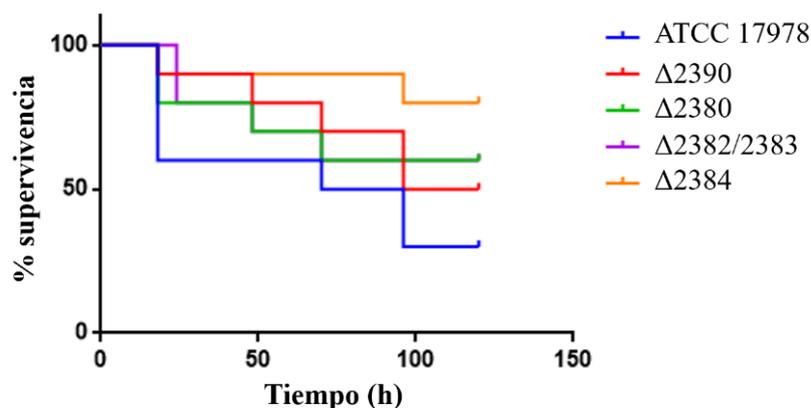
**Figura 5.** Supervivencia de ratones *Mus musculus* infectados con la cepa ATCC 17978 y los mutantes  $\Delta 2373$ ,  $\Delta 2374$ ,  $\Delta 2379$ ,  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2381$ ,  $\Delta 2382/2383$ ,  $\Delta 2384$ ,  $\Delta 2390$  y  $\Delta 2391$ . La supervivencia fue significativamente más alta cuando se infectaron los ratones con los mutantes  $\Delta 2379$ ,  $\Delta 2382/2383$ ,  $\Delta 2384$  y  $\Delta 2390$  ( $P < 0,05$ ). Los resultados se analizaron usando el test de log-rank.

Los ratones se infectaron intraperitonealmente con la cepa salvaje ATCC 17978 y todas las cepas mutantes empleadas en este trabajo (Tabla 1). Se controló la tasa de supervivencia de los ratones durante 7 días aproximadamente. Como era de esperar, la mayor tasa de mortalidad la presentó la cepa salvaje. Se observó una mayor mortalidad asociada a los mutantes  $\Delta 2373$ ,  $\Delta 2374$ ,  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2381$  y  $\Delta 2391$ , 30 h después de la infección (Fig. 5). Sin embargo, la tasa de mortalidad se vio disminuida al realizar la infección con los mutantes  $\Delta 2379$ ,  $\Delta 2382/2383$ ,  $\Delta 2384$  y  $\Delta 2390$ , dentro del mismo periodo de tiempo, siendo estas cepas prácticamente avirulentas.

## 7.2. Ensayo de virulencia en *Galleria mellonella*

La virulencia de la cepa salvaje ATCC 17978 y las cepas mutantes  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2382/2383$  y  $\Delta 2384$  se determinó usando un modelo de infección de *G. mellonella* (Fig. 6). La infección de larvas con el mutante  $\Delta 2384$  mostró una tasa de supervivencia significativamente más alta ( $P < 0,05$ ) con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados coinciden totalmente con los obtenidos en el modelo de sepsis en ratón. La virulencia del mutante  $\Delta 2384$  se vio disminuida cuando se comparó con el resto de cepas mutantes, observándose una mayor tasa de supervivencia (80%), 120 h después de la infección (Fig. 6). La inactivación de los genes A1S\_2390, A1S\_2380 y A1S\_2382/2383 no afectó a la capacidad de virulencia de la cepa ATCC 17978 usando el modelo de infección de *G. mellonella*. Sin embargo, los mutantes  $\Delta 2390$  y  $\Delta 2382/2383$  sí mostraron una notable

pérdida de virulencia empleando el modelo de infección en ratón. No se observó muerte en ninguno de los grupos control empleados.

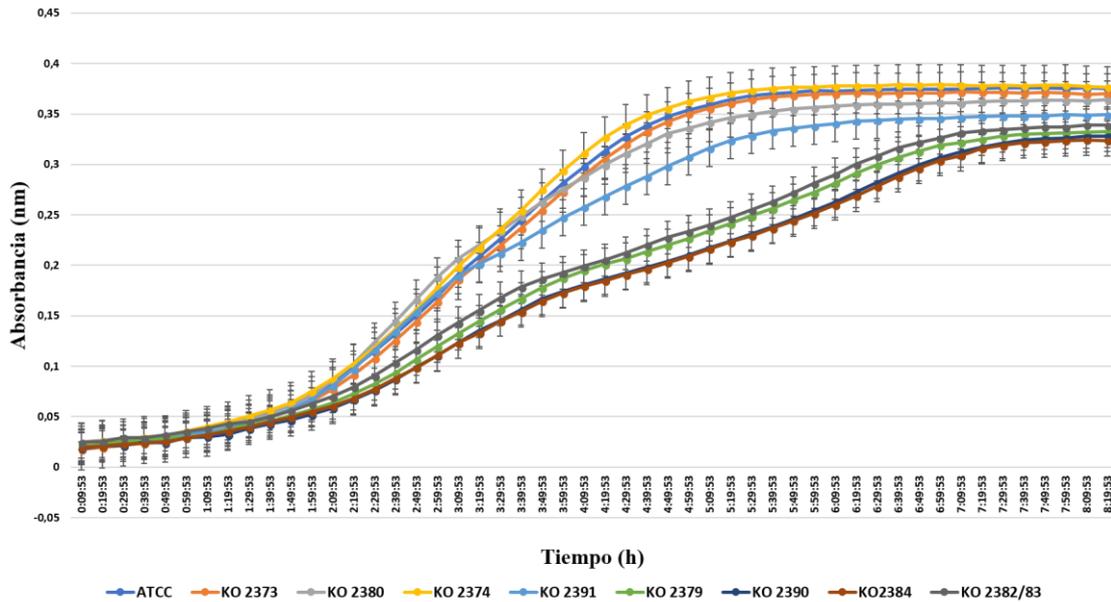


**Figura 6.** Supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* (n = 10 por grupo) después de una infección con las cepas ATCC 17978,  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2382/2383$  y  $\Delta 2384$ . La supervivencia fue significativamente más alta en larvas infectadas con el mutante  $\Delta 2384$  ( $P < 0,05$ ). Los resultados se analizaron usando el test de log-rank.

### 7.3. Análisis de curvas de crecimiento

La *fitness* se define como la capacidad para sobrevivir y reproducirse en un ambiente particular. Para determinar si la eliminación de los genes a estudiar llega a afectar a la *fitness* bacteriana, se midieron las tasas de crecimiento de la cepa salvaje y las cepas mutantes en presencia del quelante de hierro 2,2'-bipiridilo (BIP) (condiciones deficientes de hierro).

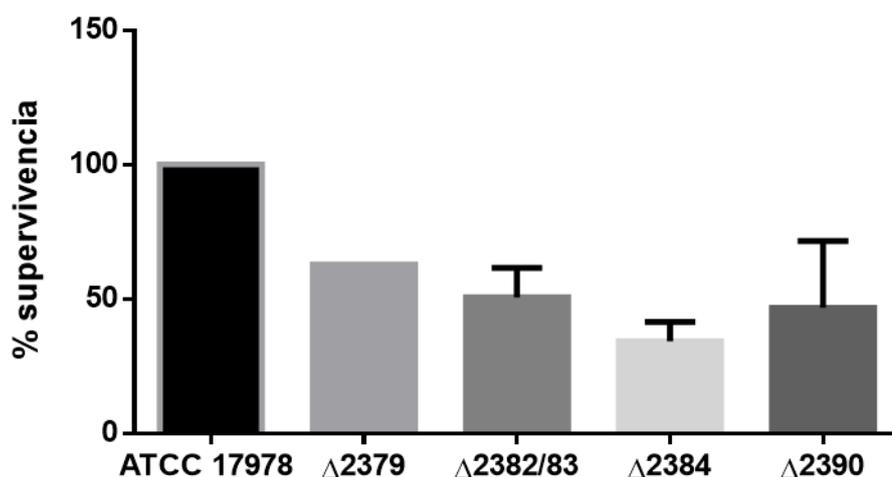
Los mutantes  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2384$ ,  $\Delta 2379$  y  $\Delta 2382/2383$  mostraron una tasa de crecimiento menor que la cepa salvaje (Fig. 7). En contraste, los mutantes  $\Delta 2373$ ,  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2374$  y  $\Delta 2391$  mantuvieron una tasa de crecimiento similar a la cepa ATCC 17978, disminuyendo, así, la relevancia de estos genes en la virulencia de *A. baumannii*.



**Figura 7.** Curvas crecimiento de la cepa ATCC 17978 y las cepas mutantes  $\Delta 2379$ ,  $\Delta 2373$ ,  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2380$ ,  $\Delta 2384$ ,  $\Delta 2374$ ,  $\Delta 2382/2383$  y  $\Delta 2391$  en presencia del quelante de hierro 2,2'-bipiridilo (BIP). Los mutantes  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2384$ ,  $\Delta 2379$  y  $\Delta 2382/2383$  presentan una reducción del crecimiento con respecto a la cepa salvaje. Los datos se corresponden con la media de las réplicas de cada cepa y las barras representan la desviación estándar.

#### 7.4. Ensayo de susceptibilidad en suero

La supervivencia en suero humano se usó para probar el papel de los genes A1S\_2379, A1S\_2382/2383, A1S\_2384 y A1S\_2390 bajo condiciones que simulan una bacteriemia humana (Fig. 8). Los resultados indican que las cepas mutantes estudiadas en este ensayo se vuelven hipersensibles al suero humano a los 120 min, observándose una menor supervivencia en comparación con la cepa salvaje ATCC 17978 (Fig. 8). Estos resultados parecen coincidir con los obtenidos en los experimentos descritos previamente. Destacamos la relevancia del gen A1S\_2384, cuya inactivación genera una pérdida de virulencia en ambos modelos animales, *G. mellonella* y ratón, y afecta a la supervivencia de la cepa cuando se inocula en suero humano. Las cepas restantes  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2379$  y  $\Delta 2382/2383$ , que mostraron una pérdida de virulencia en el modelo de sepsis en ratón y una *fitness* disminuida, mostraron también una menor tasa de supervivencia en suero humano.



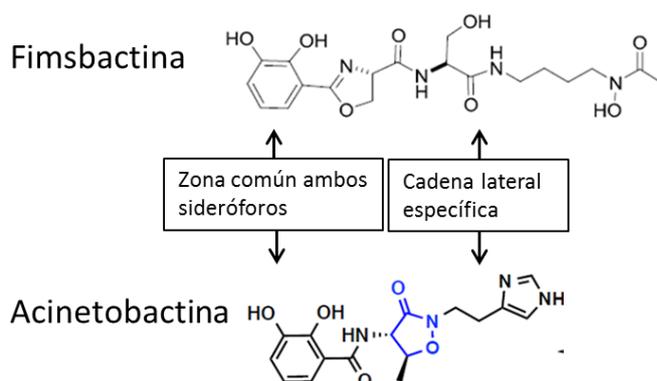
**Figura 8.** Supervivencia de las cepas mutantes  $\Delta 2379$ ,  $\Delta 2382/2383$ ,  $\Delta 2384$  y  $\Delta 2390$  en suero humano respecto a la cepa salvaje ATCC 17978 a los 120 min. Las cepas mutantes exhiben una supervivencia disminuida comparada con la de la cepa salvaje. Los datos se corresponden con la media de las réplicas de cada cepa y las barras representan la desviación estándar. Los resultados se compararon mediante la prueba t de Student.

## 8. DISCUSIÓN

Los genes A1S\_2372 (*basJ*), A1S\_2373 (*basI*), A1S\_2374 (*basH*), A1S\_2380 (*basF*) y A1S\_2391 (*basA*), implicados en las rutas de producción del ácido dihidroxibenzoico (DHBA) y de modificación de treonina, así como la fusión de ambas, conforman los pasos iniciales de la síntesis de la molécula de acinetobactina (Fig. 2) (Shapiro y Wencewicz, 2016). Los resultados obtenidos en la infección en ratón indican que los genes implicados en estas rutas parecen no ser relevantes en la virulencia del patógeno, puesto que no hemos encontrado diferencias significativas al eliminar dichos genes, en comparación con la cepa salvaje ATCC 17978.

En contraste, los genes A1S\_2390 (*basB*), A1S\_2384 (*basC*), A1S\_2379 (*basG*) y A1S\_2382/2383 (*basD*), implicados en la conversión de histidina a hidroxihistamina y en la fusión de esta última con las rutas previas, conforman los últimos pasos dentro de la ruta de síntesis de acinetobactina (Fig. 2). Los resultados obtenidos con el modelo de sepsis en ratón y las curvas de crecimiento muestran la misma tendencia, demostrando que la inactivación de estos genes afecta drásticamente a la capacidad de *A. baumannii* para infectar y matar al huésped. Por tanto, sugerimos que la ruta de producción de hidroxihistamina se considera esencial para la virulencia del patógeno.

Los diferentes grados de virulencia observados en las cepas mutantes de los genes A1S\_2390 (*basB*), A1S\_2384 (*basC*), A1S\_2379 (*basG*) y A1S\_2382/2383 (*basD*), implicados en la ruta esencial, se podrían explicar por la presencia de las fimsbactinas, otros sideróforos menos relevantes presentes en *A. baumannii* (Proschak y col., 2013). La hipótesis planteada consiste en que la estructura parcial generada en las rutas de la síntesis no esenciales para la virulencia del patógeno podría estar compartida con la estructura de las fimsbactinas. En cambio, la parte estructural de la acinetobactina proporcionada por la ruta esencial no la presentan estas moléculas (Fig. 9). De esta forma, cuando inactivamos los genes implicados en las rutas no esenciales (ácido dihidroxibenzoico y treonina), posiblemente existan otras rutas de síntesis que permitan igualmente la producción de la molécula de acinetobactina. En cambio, cuando inactivamos la ruta esencial (síntesis de hidroxihistamina), no sería posible obtener una molécula de acinetobactina funcional, afectando a la captación de hierro y por tanto a la virulencia del patógeno.



**Figura 9.** Estructura molecular de los sideróforos fimsbactina y acinetobactina.

Los mutantes  $\Delta 2390$  y  $\Delta 2382/2383$  muestran una notable pérdida de virulencia en ratón. Esto no ocurre en el modelo invertebrado *G. mellonella*, en el cual la inactivación de los genes A1S\_2390 y A1S\_2382/2383 no afecta a la virulencia del patógeno.

En los últimos años, *G. mellonella* se ha utilizado cada vez más para el estudio de enfermedades infecciosas. Sin embargo, este modelo todavía se está optimizando y su uso presenta ciertas limitaciones. Una de ellas es la ausencia de centros de almacenamiento que suministren cepas de referencia cultivadas en condiciones estándar, así como la disponibilidad limitada de información genómica sobre *G. mellonella*. Las diferencias en genotipos, condiciones de reproducción y mantenimiento del animal por parte de los criadores también influyen en la susceptibilidad a la infección y pueden dar lugar a

diferencias en las tasas de mortalidad después de la infección con el patógeno (Tsai y col., 2016).

Además, los insectos son capaces de protegerse de la invasión del patógeno mediante la producción de diversos péptidos, como las transferrinas. En algunas especies de insectos se ha descrito un aumento de la transcripción de estas proteínas durante la inoculación de la bacteria. Por este motivo se cree que los insectos usan la transferrina para secuestrar el hierro de los patógenos reduciendo así la capacidad para establecer una infección (Lowenberger, 2001). Así, aunque existe un sistema de captación de hierro para evitar el crecimiento bacteriano durante la infección, este no es exactamente igual al de mamíferos y se desconoce todavía en gran medida.

Todos estos factores podrían explicar los resultados contradictorios observados en los mutantes  $\Delta 2390$  y  $\Delta 2382/2383$  en ambos modelos animales. De esta forma, aunque inactivemos el sistema de captación de hierro mediado por acinetobactina, la cantidad de hierro presente en *G. mellonella* todavía es suficiente como para permitir el crecimiento de la bacteria y causar muerte e infección. Por el momento, con los datos obtenidos en *G. mellonella* no podemos establecer conclusiones firmes. Sin embargo, el uso de este modelo invertebrado es cada vez más frecuente en una gran variedad de experimentos en microbiología, puesto que nos permite utilizar dos modelos *in vivo* diferentes y reducir el uso de los ratones en investigación.

El sistema mediado por acinetobactina no es la única forma de captar hierro que presenta la bacteria. La presencia de hierro libre en vertebrados está muy limitada. Por este motivo, *A. baumannii* presenta mecanismos secundarios de captación de hierro, así como mecanismos de captación del grupo hemo en su forma directa o asociado a hemoproteínas. Estudios previos revelan que el gen *entA*, que codifica la enzima implicada en la producción de DHBA, está ausente en el *cluster* de acinetobactina (Álvarez-Fraga, 2018). Por este motivo, *A. baumannii* podría tener más de un locus involucrado en la síntesis de sideróforos. Eijkelkamp y colaboradores (2011) describieron cinco *clusters* de genes que podían estar relacionados con la producción de sideróforos y adquisición de hierro. Además, en bacterias Gram-negativas también está presente el sistema Feo, sistema de absorción de hierro ferroso más importante en *A. baumannii* (Lau y col., 2016).

Los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento indican que el porcentaje de supervivencia obtenido en el modelo de infección en ratón con los mutantes  $\Delta 2390$ ,  $\Delta 2384$ ,  $\Delta 2379$  y  $\Delta 2382/2383$  se corresponde con una disminución de la *fitness*. Esto es lógico, puesto que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de la bacteria y, por ello, la inactivación del sistema de captación de hierro generará una reducción de la tasa de crecimiento. Se demuestra así que los genes A1S\_2390, A1S\_2384, A1S\_2379 y A1S\_2382/2383 son potenciales dianas terapéuticas a la hora de combatir la multirresistencia del patógeno nosocomial *A. baumannii*. A partir de dichas dianas se podría empezar a trabajar en la obtención de inhibidores de los enzimas codificados por dichos genes.

## 9. CONCLUSIONES

- La inactivación de los genes *basB* (A1S\_2390), *basC* (A1S\_2384), *basG* (A1S\_2379) y *basD* (A1S\_2382/2383) genera una notable pérdida de virulencia de las cepas de *A. baumannii* en ratón, una reducción de la tasa de crecimiento en condiciones deficientes de hierro y una reducción de la supervivencia en suero.
- La inactivación de los genes de síntesis de acinetobactina no es suficiente para reducir la virulencia de *A. baumannii* en el invertebrado *G. mellonella*.
- La ruta de síntesis de hidroxihistamina es clave para el mantenimiento de la virulencia de *A. baumannii*.
- Los genes *basB* (A1S\_2390), *basC* (A1S\_2384), *basG* (A1S\_2379) y *basD* (A1S\_2382/2383) son potenciales dianas terapéuticas a partir de las cuales se pueden abrir nuevas líneas de investigación en la lucha contra la multirresistencia bacteriana.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Fraga, L., Pérez, A., Rumbo, S., Merino, M., Vallejo, J.A., Ohneck, E.J., Edelmann, R.E., Beceiro, A., Vázquez-Ucha, J.C., Valle, J. y col. (2016) Analysis of the role of the LH92\_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence*. 7(4): 443-55.

- Álvarez-Fraga, L. (2018) Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. Tesis doctoral, Universidad de A Coruña.
- Álvarez-Fraga, L., Vázquez-Ucha, J.C., Martínez, M., Vallejo, J.A., Bou, G., Beceiro, A. y Poza, M. (2018) Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*. 9(1):496-509.
- Baumann, P. (1968) Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* Jul;96(1):39-42.
- Beceiro, A., Moreno, A., Fernández, N., Vallejo, J.A., Aranda, J., Adler, B., Harper, M., Boyce, J.D. y Bou, G. (2014) Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 58:518-26.
- Bouvet, P.J. y Grimont, P.A. (1986) Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36(2): 228-240.
- Brisou, J. y Prevot, A.R. (1954) [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 86(6):722-728.
- Cerqueira, G.M. y Peleg, A.Y. (2011) Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life.* 63:1055-1060
- Cisneros, J.M. y Pachon, J. (2003) [*Acinetobacter baumannii*: a nosocomial pathogen difficult to control]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(5):221-223.
- Darling, A.C., Mau, B., Blattner, F.R. y Perna, N.T. (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14:1394-403.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A. y Seifert, H. (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(12):939-951.

- Dorsey, C.W., Tomaras, A.P., Connerly, P.L., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H. y Actis, L.A. (2004) The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology*. 150(11):3657-3667.
- Eijkelkamp, B.A., Hassan, K.A., Paulsen, I.T. y Brown, M.H. (2011) Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*. 23;12:126.
- Gaddy, J.A., Arivett, B.A., McConnell, M.J., López-Rojas, R., Pachón, J. y Actis, L.A. (2012) Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect. Immun.* 80:1015-1024.
- Giamarellou, H., Antoniadou, A. y Kanellakopoulou, K. (2008) *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int. J. Antimicrob. Agents*. 32:106-119.
- Hamad, M.A, Zajdowicz, S.L., Holmes, R.K. y col. (2009) An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Gene*. 430:123-31.
- Hasan, T., Choi, C.H. y Oh, M.H. (2015) Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics Inform*. 13(1):2-6.
- Hawkey, P.M. (1998) The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 317(7159):657-660.
- Hornsey, M., Longshaw, C., Phee, L. y col. (2012) In vitro activity of telavancin in combination with colistin versus Gramnegative bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56:3080-5.
- Kaplan, E.L. y Meier, P. (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Statist. Assoc.* 53:457-81.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J. y Collins, J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(6):423-435.
- Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D. y Vogel, H.J. (2016) Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev.* 40(2):273-98.

- Lee, C.R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., y col. (2017) Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:55.
- Lessel, E. (1971) Minutes of the Subcommittee on nomenclature of *Moraxella* and Allied Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21:213-214.
- Lowenberger, C. (2001) Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31:219-229.
- McConnell, M.J., Actis, L., y Pachon, J. (2013) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(2):130-155.
- Merino, M. (2016). Estudio de un brote epidémico causado por distintas cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Estudio de la epidemividad y virulencia. Tesis doctoral, Universidad de A Coruña.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. y Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- Peleg, A.Y., Seifert, H. y Paterson, D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3):538-582.
- Proschak, A., Lubuta, P., Grun, P., Lohr, F., Wilharm, G., De Berardinis, V. y Bode, H.B. (2013) Structure and biosynthesis of fimsbactins A-F, siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem.* 14:633-638.
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Farres, X. y Vila, J. (2012) The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front. Microbiol.* 3:148.
- Rossau, R., van Landschoot, A., Gillis, M. y De Ley, J. (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:310-319.
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I. y Vaneechoutte, M. (1997) Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35(11):2819-2825.

- Shapiro, J. A. y Wencewicz, T. A. (2016) Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-Triggered Siderophore Swapping. *ACS Infectious Diseases* 2:157-168.
- Shapiro, J. A. y Wencewicz, T. A. (2017) Structure -function studies of acinetobactina analogs. *Metalomics*. 9(5):463-470.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., López, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. y Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 7:539.
- Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E., Gilbert, D., Scheld, M. y Bartlett, JG. (2006) Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 42(5):657-668.
- Torres, C. (2012) La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de Farmacia del Reino de Aragón [serial on the Internet].
- Towner, K.J. (2009) *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* 73(4):355-363.
- Tsai, C.J.Y., Loh, J.M.S. y Proft, T. (2016) *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. *Virulence* 7(3):214-229.
- Vila, J., Marti, S. y Sanchez-Céspedes, J. (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59(6):1210-1215.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C. y Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and b-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(2):361-385.

