

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

“Contribución del Sistema de Secreción Tipo 6 a la interacción del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii* con el hospedador usando a *Caenorhabditis elegans* como modelo de infección”

Juan Ignacio Díaz Miloslavich

Tesina para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Director: Dr. Guillermo D. Repizo

2019

Presentaciones

Parte de los resultados que se describen en esta tesina fueron presentados en la siguiente reunión científica:

Repizo, G. D.; Espariz, M.; Díaz Miloslavich, J. I.; Viale, A. *Acinetobacter baumannii* NCIMB8209: una cepa ambiental aislada hace más de 70 años que ayuda a entender la adaptación de este microorganismo al medio hospitalario. XVIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, Santa Fe. 2018.

Índice

Presentaciones	2
Índice	3
Agradecimientos	5
Abreviaturas	7
Resumen.....	8
Introducción	9
1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> : un patógeno oportunista	10
1.1.1 Cepas multirresistentes de <i>A. baumannii</i>	10
1.1.2 Factores de virulencia de <i>A. baumannii</i>	11
1.1.3 Sistemas de secreción bacterianos.....	14
1.2 Sistema de Secreción tipo 6 (SST6).....	15
1.2.1 Estructura del SST6	16
1.2.2 Efectores del SST6	18
1.2.3 Rol del SST6 en la patogénesis	19
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio	20
1.3.1 Generalidades y anatomía.....	20
1.3.2 Ciclo de vida.....	23
1.3.3 Estudio de patogénesis bacteriana en <i>C. elegans</i>	25
Objetivos	27
2.1 Objetivos generales.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
Materiales y métodos:.....	28
3.1 Cepas bacterianas utilizadas	29
3.2 Medios y condiciones de cultivo	30
3.3 Mantenimiento de <i>C. elegans</i>	31
3.4 Conservación de las cepas bacterianas y los nematodos	31
3.5 Aislamiento de huevos y sincronización de <i>C. elegans</i>	32
3.6 Ensayos de patogenicidad de <i>A. baumannii</i> utilizando a <i>C. elegans</i> como modelo de infección.....	32
3.6.1 Ensayo de supervivencia.....	32

3.6.2 Ensayo de secreción	33
3.6.3 Ensayo de secreción modificado	34
3.7 Observación bajo el microscopio	34
3.7.1 Preparación de muestras para microscopía	34
3.7.2 Microscopía óptica	35
3.8 Análisis de secreción de la proteína Hcp mediante SDS-PAGE.....	35
3.9 Extracción de ADN genómico de <i>A. baumannii</i> NCIMB8209, secuenciación y análisis de la presencia de genes codificantes para el SST6.....	36
3.10 Ensayos estadísticos.....	36
Resultados y discusión:.....	37
4.1 Evaluación de la patogenicidad de distintas cepas de <i>Acinetobacter</i> usando a <i>C. elegans</i> como modelo de infección.	38
4.2 Análisis genómico de <i>A. baumannii</i> NCIMB8209. Búsqueda de genes codificantes para el SST6.	41
4.3 Estudio del rol del SST6 en la virulencia.	42
4.3.1 Secreción de la proteína Hcp.....	42
4.3.2 Rol del SST6 en la supervivencia del nematodo.....	43
4.4 Efecto del título de patógeno en la infección del nematodo.	45
4.5 Evaluación de la presencia de factores difusibles causantes de la muerte de los nematodos	49
4.5.1 Ensayo de secreción	49
4.5.2 Ensayo de secreción modificado	49
4.6 Visualización por microscopía del efecto de la infección de <i>C. elegans</i>	51
Conclusiones:.....	53
Bibliografía.....	56

Agradecimientos

Debido a que considero que lograr el título de Licenciado en Biotecnología no puede atribuirse solo a un mérito individual y que es el fruto del trabajo en conjunto de muchas personas que me han acompañado a través de estos fugaces 13 años de carrera, quiero realizar los siguientes agradecimientos:

En primer lugar a quien me dio la oportunidad de realizar mi trabajo final de tesina, el Dr. Guillermo “Coco” Repizo. Por su dirección, sus innumerables conocimientos, su predisposición y su paciencia (su inagotable paciencia). Pero por sobre todas las cosas, por ser una persona excelente que ha hecho que esta experiencia sea completa dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, por su predisposición para ayudar en todo momento y por hacer que cada día sea una jornada llevadera y haya sabido disfrutar cada una de ellas.

A mis compañeros y amigos de la facu, que, desde el primer año hasta hoy, hemos formado un excelente grupo. Por su compañía, por la ayuda de tantas índoles y por bancar todas mis mañas tanto tiempo. Claro está que son muchas las personas que conforman este grupo y con la que me he sabido rodear en tantos años y sé que es injusto no nombrar a cada uno de Uds., pero espero haber sido en su momento y siempre, lo suficientemente agradecido y se los haya hecho saber de forma personal.

Quiero y debo destacar en este contexto a Leito E., quien desde muy tempranamente ha sido un gran compañero que me ha brindado todo lo posible y más. No tengo palabras para describir tanta entrega, solo muchísimas gracias!!

También quisiera mencionar a Flo C. y Sofi Z. por haber sido en estos últimos años, las grandes impulsoras de haber logrado llegar a la meta. Creo que sin el aguante brindado estas palabras se habrían dilatado un tiempito más.

A Mati C., por convertirse en un gran amigo y compañero, y por transmitirme tan sabios consejos siempre en los momentos justos.

A mi familia Pergaminense, sin los cuales no hubiese podido iniciar y continuar este camino en mi formación profesional, su ayuda, compañía y su

Agradecimientos

predisposición a brindarme siempre buenos momentos, han hecho que sea gran parte de la persona que soy ahora.

A mi mamá, por haberme brindado todas las oportunidades posibles y haberme dado la libertad de poder elegir siempre lo que quise para mi bien y futuro, por haber aguantado la distancia todo estos años y obviamente por haberme criado con tan buenos valores que han hecho de mí la persona que soy hoy.

A mi hermana Vero, que sin ella nada de esto hubiese sido posible, por encargarse siempre de TODO y siempre estar pendiente de TODOS, por ser la persona que es y que tanto he podido aprender de ella y por brindarme con su ejemplo un modelo a seguir.

A todos y cada uno de Uds., **INFINITAS GRACIAS!!**

Abreviaturas

Ab	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CC	Complejo de cola
CM	Complejo de membrana
DIC	Microscopia de contraste interferencial diferencial
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacárido
MDR	Multirresistentes a compuestos antimicrobianos
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
NGM	<i>Nematode Growth Media</i>
OMV	Vesícula de membrana externa
PG	Peptidoglicano
PME	Proteína de membrana externa
PNAG	Poli-1,6-N-acetilglucosamina
SN	Sobrenadante
SS	Sistema de secreción
THG	Transferencia horizontal de genes

Resumen

Acinetobacter baumannii es un patógeno bacteriano oportunista que es responsable de muchas de las infecciones intrahospitalarias causadas por bacterias Gram-negativas. Está clasificado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas como uno de los seis microorganismos más importantes resistentes a múltiples antimicrobianos (MDR) en hospitales de todo el mundo.

La reducción del impacto socioeconómico de las infecciones debidas a *A. baumannii* requiere de un conocimiento detallado de la fisiopatología del organismo. Entre los mecanismos de virulencia propuestos, el sistema de secreción tipo 6 (SST6) es una máquina que atraviesa las células y que trasloca proteínas efectoras tóxicas a células eucariotas y procariotas. Es por ello que se postula que podría contribuir a la patogénesis causada por dicha bacteria.

Con el objeto de comprobar esta hipótesis, en este trabajo de tesina hicimos uso de un modelo de infección validado recientemente y hasta ahora nunca explorado en nuestro laboratorio: el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Mediante el análisis de cepas bacterianas con características variadas en relación al SST6 y a través de diferentes bioensayos, logramos ahondar en el conocimiento en la interacción hospedador-patógeno. Pudimos así determinar que mientras algunas cepas no son capaces de provocar infección, otras causan la muerte en el término de 24 h. Entre las primeras, se encuentra la cepa *A. baumannii* NCIMB8209. Mediante la secuenciación de su genoma y el análisis posterior detectamos que ésta no codifica el SST6. Por otra parte, entre las cepas letales para el gusano se encuentran principalmente aquellas que codifican y expresan este sistema, que en el caso de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 resulta crítico para causar la muerte del nematodo. De esta forma, determinamos que el SST6 juega un papel importante en la virulencia de *A. baumannii* de una manera cepa dependiente. Proponemos que las diferencias observadas en esta interacción podrían deberse al conjunto de toxinas codificadas en cada genoma.

Introducción

1.1 *Acinetobacter baumannii*: un patógeno oportunista

Los cocobacilos Gram-negativos clasificados como *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) son patógenos bacterianos oportunistas muy importantes debido a que son responsables del 2 al 10% de todas las infecciones intrahospitalarias causadas por bacterias Gram-negativas. Actualmente se reconoce que *A. baumannii* causa una amplia gama de infecciones nosocomiales graves, que incluyen infecciones cutáneas y de tejidos blandos, infecciones del tracto urinario y meningitis (Antunes y col., 2014).

Si bien los reservorios de *A. baumannii* son aún desconocidos, el mismo presenta pocos requerimientos nutricionales y elevada capacidad de sobrevivir por largos períodos en condiciones de sequedad, falta de nutrientes, tratamientos antimicrobianos y/o antisépticos de uso hospitalarios. Esto conduce a que todas las superficies, animadas e inanimadas, del medio ambiente hospitalario (personal hospitalario, pacientes, sistemas de ventilación, instrumental quirúrgico, dispositivos de intubación como sondas y catéteres, etc.) se conviertan en reservorios potenciales (Joly-Guillou, 2005).

1.1.1 CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *A. BAUMANNII*

A. baumannii está clasificada por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas como uno de los seis microorganismos más importantes resistentes a múltiples compuestos antimicrobianos (MDR) en hospitales de todo el mundo (Antunes y col., 2014). La dificultad en el tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter* es principalmente atribuido a su alta tolerancia intrínseca a la mayoría de los antibióticos, producto de una excepcionalmente baja permeabilidad a los mismos, bombas de eflujo expresadas constitutivamente, además de los genes de resistencia albergados en islas genómicas y plásmidos adquiridos por transferencia horizontal de genes (THG) (Elhosseiny y col., 2018).

Las tasas de resistencia a meropenem, imipenem, ceftazidima, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacina y gentamicina en América Latina parecen estar entre las más altas del mundo. Por ejemplo, sólo el 71% de los aislamientos fueron susceptibles a meropenem o imipenem en un estudio en el período entre 2002-2004. En otro estudio que incluyó cepas provenientes de Argentina, Brasil, Chile y

Colombia aisladas entre 1997 y 2001, las tasas de resistencia fueron las más altas en Argentina y ningún país estuvo libre de aislamientos resistentes a múltiples fármacos. (Peleg y col., 2008). En un informe más reciente, aproximadamente el 37% de los aislamientos del complejo *A. baumannii-calcoaceticus* ensayados fueron resistentes al imipenem y al meropenem. Las polimixinas han permanecido efectivas contra *Acinetobacter*, pero debido a las dosis terapéuticas de estos antibióticos que son nefrotóxicos y neurotóxicos, siguen siendo un tratamiento de último recurso. Un enfoque alternativo es el de reutilizar drogas ya existentes en el mercado, tales como el medicamento contra el cáncer mitomicina C, que está actualmente bajo estudio. Otro enfoque es emplear nuevas combinaciones de medicamentos, como daptomicina-colistina-teicoplanina, meropenem-polimixina B intensificada, o el uso de nuevos análogos de los antibióticos convencionales, como las tetraciclinas. Sin embargo, a pesar de las pruebas continuadas para maximizar el uso de los antibióticos y medicamentos disponibles, sus toxicidades no se eliminan. Además, la eficacia de tales combinaciones no han sido completamente validadas (Elhosseiny y col., 2018).

Cabe además destacar que, la reducción del impacto socioeconómico de las infecciones debidas a *A. baumannii* requiere de un conocimiento detallado de la fisiología de esta bacteria incluyendo los mecanismos involucrados en la virulencia, la interacción con el hospedador, la resistencia a antibióticos, y la persistencia en el ambiente, lo que se conoce en su conjunto como la fisiopatología del organismo (Kim y col., 2011).

1.1.2 FACTORES DE VIRULENCIA DE *A. BAUMANNII*

Los factores que contribuyen a la creciente patogenicidad de *A. baumannii* son aún poco conocidos, si bien se propone una combinación de mecanismos que incluyen una alta plasticidad genómica y una elevada resistencia a desafíos ambientales. La primera está directamente relacionada con la gran cantidad de mecanismos de THG con los que cuentan las cepas de *A. baumannii*, entre los que podemos mencionar conjugación, transformación y transducción (McConnell y col., 2013). En particular, un fenómeno importante en especies de *Acinetobacter* es la adquisición de genes por transformación durante la competición bacteriana (Cooper y col., 2017). La muerte dependiente de contacto, provoca la lisis celular que conlleva a la liberación del ADN que queda disponible para su captación no sólo por

la bacteria atacante sino también por células cercanas, que pueden no tener la capacidad de eliminar otras bacterias. Esto resalta el papel que pueden desempeñar las interacciones polimicrobianas para facilitar la THG (Cooper y col., 2017) y la diseminación de mecanismos de resistencia a antimicrobianos (McConnell y col., 2013).

Dentro de los factores que determinan la persistencia ambiental de *A. baumannii* se encuentran involucradas las proteínas de membrana externa (PME). Las PME cumplen funciones vitales para la fisiopatología de distintos patógenos Gram-negativos incluyendo: favorecer el ingreso de nutrientes y otros compuestos hidrofílicos mediante la formación de canales acuosos; participar como componentes de bombas de eflujo responsables de la expulsión de compuestos tóxicos incluyendo numerosos antimicrobianos (Coyne y col., 2011); funcionar como adhesinas en la unión a superficies bióticas y abióticas así como en la secreción de macromoléculas involucradas en la motilidad y formación de *biofilms*, entre otras (Peleg y col., 2008; Eijkelkamp y col., 2011; Towner, 2009; Gordon y col., 2009).

Por otro lado, las estructuras moleculares presentes en la superficie celular, y aquellas que se extienden más allá de la superficie, son también de importancia central en la patogénesis de *A. baumannii* (Figura 1.1) y, por lo tanto, representan objetivos importantes para nuevos antimicrobianos y vacunas (Weber y col., 2016). Es importante además remarcar que los distintos factores responsables de la virulencia de *A. baumannii* pueden variar considerablemente en distintos grupos clonales o aún en aislamientos dentro de los mismos, indicando la importancia del estudio de cepas locales causantes de infecciones para su control y eventual erradicación (Stietz y col., 2013).

El lipopolisacárido (LPS), el componente principal de la lámina externa de la membrana externa (ME) de muchas bacterias Gram-negativas, es una molécula inmunoestimuladora que desempeña un papel importante en la resistencia bacteriana al estrés. En base a datos recientes, se ha descrito que las especies del género *Acinetobacter* producen lipooligosacáridos (LOS) pero no LPS. De todas maneras, este componente contribuye de manera importante a la supervivencia y virulencia de *Acinetobacter*. También se ha demostrado que hay glicoproteínas que juegan un papel en la virulencia, ya que mutantes deficientes en la glicosilación muestran efectos sobre varios fenotipos asociados a la virulencia (Weber y col., 2016).

Además, como muchos otros patógenos, las distintas especies de *Acinetobacter* producen una cápsula extracelular que proporciona una capa de protección contra amenazas externas, como la muerte bacteriana mediada por complemento. También producen el polisacárido poli-1-6-N-acetilglucosamina asociado a la superficie (PNAG), que es importante para la virulencia y la formación de *biofilms* (Weber y col., 2016). Otras estructuras relacionadas a la superficie celular, las constituyen las fimbrias, que son apéndices dinámicos de la superficie bacteriana conocidos por mediar la motilidad, la THG y la formación de *biofilms*. Se ha demostrado que *Acinetobacter* produce pili de tipo IV (Tfp) (Harding y col., 2013).

También se destacan los procesos de secreción de proteínas, los cuales son diversos en composición, función y a menudo son importantes para mediar la virulencia. Dentro de éstos, pueden mencionarse los sistemas de secreción (SS) tipo II y VI, y las vesículas de membrana externa (OMVs) (Weber y col., 2016).

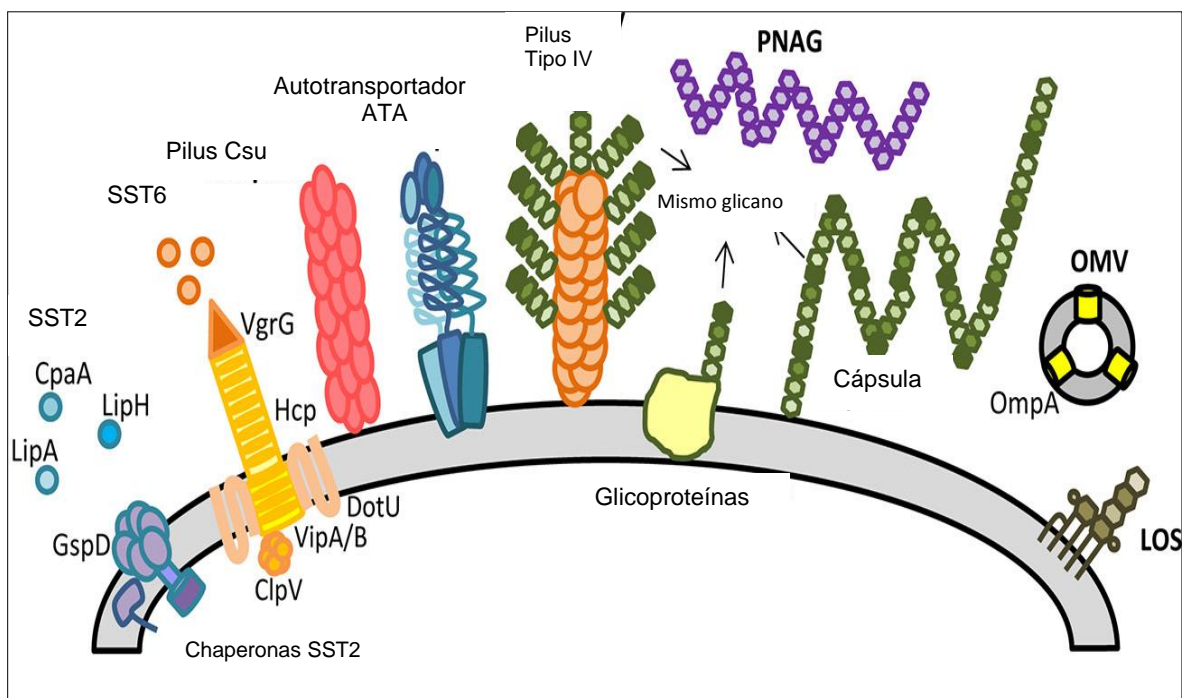


Figura 1.1: Representación esquemática de estructuras de membrana en *Acinetobacter spp.* Estas son utilizadas para la adhesión, formación de *biofilms* y patogénesis, entre otras funciones. SS: Sistemas de secreción; OMV: Vesículas de membrana externa; LOS: Lipooligosacáridos; PNAG: Poli-1-6-N-acetilglucosamina. Imagen adaptada de Weber y col., 2016.

1.1.3 SISTEMAS DE SECRECIÓN BACTERIANOS

Las bacterias Gram-negativas usan estructuras complejas unidas a la membrana, denominadas sistemas de secreción, para la secreción especializada de proteínas biológicamente activas. Estos sistemas pueden abarcar tanto la membrana interna como la membrana externa (IM y OM, respectivamente), tal son los casos de los sistemas de secreción tipo I (SST1), SST2, SST3, SST4 y SST6, o abarcar solo la OM, como se determinó para el SST5 (Figura 1.2). Según el SS, la proteína secretada puede ser expulsada al espacio extracelular, permanecer unida a la célula o ser inyectada en la célula blanco. Debido a su importancia en la secreción de factores de virulencia microbiana, supervivencia, *fitness* y competencia, los SS y sus sustratos representan objetivos terapéuticos excelentes. Por estas razones, recientemente se ha prestado más atención a las funciones de estos sistemas en la patogenicidad de *Acinetobacter* (Elhosseiny y col., 2018).

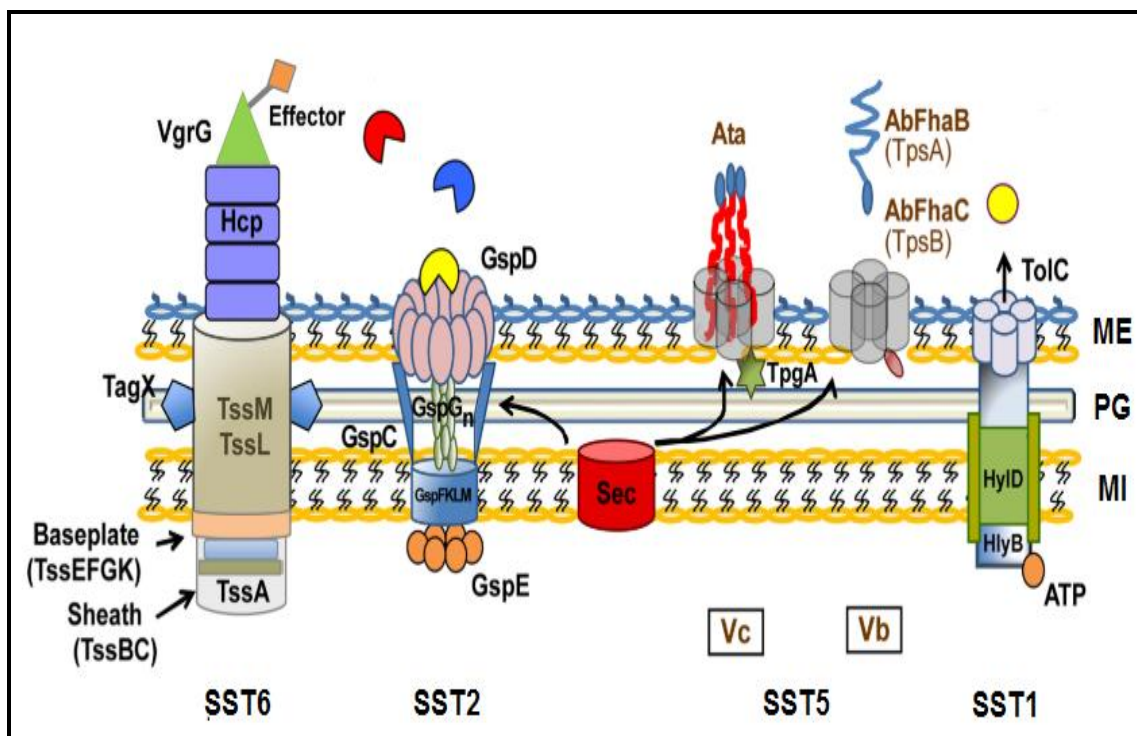


Figura 1.2: Representación esquemática de los sistemas de secreción mejor estudiados en *Acinetobacter* spp. Arquitectura general y componentes. Los sistemas SST1, SST2 y SST6 atraviesan las dos membranas. SST5 atraviesa solo la ME y es dependiente del sistema Sec. SS: Sistema de secreción. ME: Membrana externa, PG: Peptidoglicano, MI: Membrana interna. Adaptado de Elhosseiny y col., 2018.

Entre ellas, el SST6 es una máquina que atraviesa las células y que trasloca proteínas efectoras tóxicas a células eucariotas y procariotas y tiene un papel central en la patogénesis y la competencia bacteriana (Costa y col., 2015).

1.2 Sistema de Secreción tipo 6 (SST6)

Los sistemas de secreción de bacterias Gram-negativas son diversos en términos de los componentes estructurales usados para ensamblar el sistema de secreción y las proteínas exportadas por cada aparato. Entre los diferentes sistemas secretores empleados por bacterias Gram negativas, el SST6 se ha convertido en un mecanismo generalizado para la exportación de proteínas de una manera dependiente de contacto. Los SST6 se encuentran en el genoma de aproximadamente el 25% de las diferentes especies bacterianas (Benz y col., 2014).

El SST6 de *A. baumannii* y de especies relacionadas está compuesto por un *cluster* de 18 genes conservados denominados genes *tss*, por “*Type six secretion*” (TssA-M) así como de genes asociados al SST6 denominados genes *tag* por “*I6SS-associated genes*” que son componentes accesorios que a menudo contribuyen a la regulación, pueden tener roles estructurales, o actuar como chaperones, (Figura 1.3) (Boyer y col., 2009; Weber y col., 2016).



Figura 1.3: Representación del *cluster* central SST6 y genes asociados de *A. baumannii* ATCC 17978. Las flechas negras indican los genes *tss* (*tssA-M*) y *tag*, las flechas grises los genes con función desconocida. Adaptación de Weber y col., 2016.

Además del *cluster* de genes centrales SST6, se pueden encontrar varias copias *vgrG* "huérfanas" dispersas en cada genoma bacteriano (Figura 1.4). Las regiones que flanquean estos genes se conocen como islas *VgrG* (Maayer y col., 2011) y representan *hot spots* para la integración de genes que codifican proteínas efectoras (Unterweger y col., 2014).

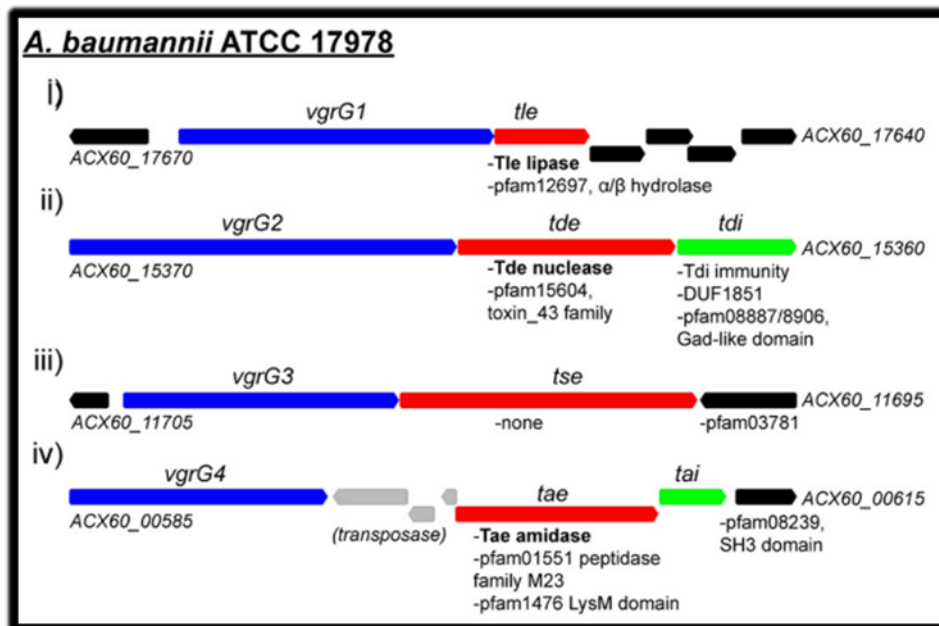


Figura 1.4: Esquematización de las islas *vgrG* presentes en *A. baumannii* ATCC 17978. Islas *vgrG* distribuidas dentro del genoma. Genes *vgrG* (azul). Genes de proteínas efectoras (rojo). Genes de inmunidad (verde). Adaptado de Weber y col., 2016.

1.2.1 ESTRUCTURA DEL SST6

Desde el punto de vista estructural, la maquinaria SST6 consta de dos piezas principales: un complejo de membrana (CM) que comprende proteínas de membrana interna que son homólogas a componentes del SST4 (como las proteínas estructurales TssM y TssL) y un complejo de cola (CC) que contiene componentes que están relacionados evolutivamente con colas contráctiles de bacteriófagos T4 (incluyendo las proteínas secretadas Hcp y VgrG) (Zoued y col., 2014; Chang y col., 2017).

El CC se puede subdividir en la placa de base y el complejo de la vaina contráctil (Chang y col., 2017). El primero está constituido por TssE, TssF, TssG y TssK (Brunet y col., 2015) y TssA promueve el inicio del proceso de polimerización de la vaina (Planamente y col., 2016; Zoued y col., 2014). La placa de base se ha propuesto que interconecta el CM con la vaina contráctil. La vaina está compuesta por TssB y TssC. Además, hay una proteína citoplasmática de reciclaje de la vaina (ClpV/TssH) y una aguja inyectable (Hcp/TssD) que está tapada por una proteína que forma un capuchón (VgrG/TssI), (Figura 1.5) (Fitzsimons y col., 2018).

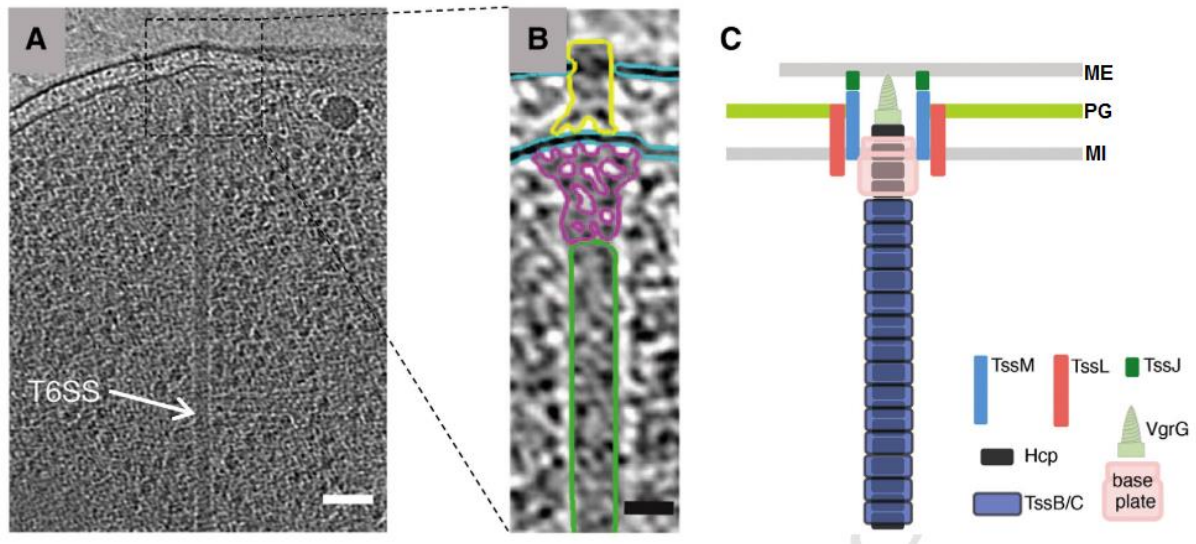


Figura 1.5: Visión general del T6SS. (A) Criotomografía electrónica de células de *Vibrio cholerae* que producen el SST6. La flecha apunta a la larga estructura tubular citoplásmica correspondiente a la vaina SST6. En el panel B se muestra una ampliación de la parte superior de la tomografía, que enfatiza la presencia de distintos complejos (verde, vaina contráctil; púrpura, placa base; amarillo, complejo de membrana). (C) Representación esquemática del SST6 basado en criotomografías de electrones y en datos genéticos, bioquímicos, microscópicos y estructurales. MI: membrana interna; PG: Peptidoglicano, ME: membrana externa. La barra de escala es de 50 nm. Adaptado de Zoued y col., 2014.

Hcp forma hexámeros que se ensamblan como estructuras tubulares y se asemejan al tubo de cola bacteriófago T4. *In vivo*, los hexámeros de Hcp se acumulan en el citoplasma y el sobrenadante de cultivo. La secreción de Hcp se considera un marcador molecular de un SST6 funcional y se ha utilizado ampliamente para evaluar su actividad (Zoued y col., 2014).

Las proteínas VgrG (“*Valine-Glycine-Repeat protein G-like*”) son estructuralmente similares al dispositivo de punción del bacteriófago T4 que está compuesto por los productos génicos gp5 y gp27. Estas dos proteínas se asocian en un complejo enorme en el que la forma distintiva de aguja es proporcionada por el dominio C-terminal de gp5. En SST6s bacterianos las proteínas equivalentes se fusionan en VgrG, en la que los péptidos gp27 y gp5 están representados por los dominios N-terminal y C-terminal, respectivamente. Algunas proteínas VgrG, designadas como VgrGs evolucionadas, muestran adicionalmente una serie de dominios C-terminales que actúan como efectores aportando así más diversidad a las funciones de SST6 en las interacciones célula-célula (Zoued y col., 2014).

1.2.2 EFECTORES DEL SST6

Los sistemas de secreción liberan proteínas efectoras en el medio extracelular o en células eucariotas o procariontas, y desempeñan un papel crucial en la adaptación de las bacterias a sus entornos. En particular, el SST6 funciona como una "jeringa molecular" que inyecta toxinas en la célula blanco. (Figura 1.6). Algunos efectores se traslocan a las células blanco en forma de fusión con proteínas de la "jeringa" tales como VgrG, Hcp o PAAR (efectores "especializados"), mientras que otros se entregan como carga no unida covalentemente (efectores de "carga") (Fitzsimons y col., 2018).

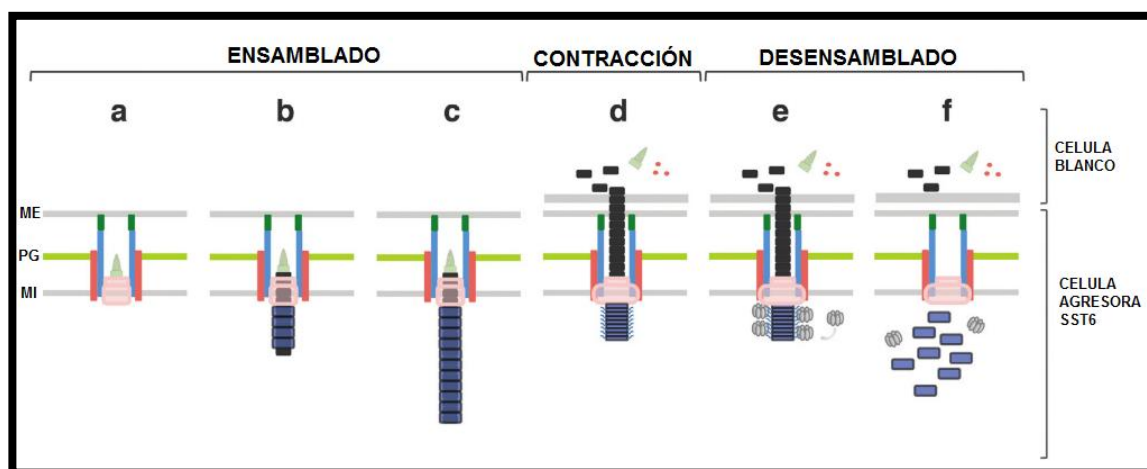


Figura 1.6: Mecanismo de acción del SST6. Se muestran las diferentes etapas del ensamblaje y el modo de acción del SST6. La biogénesis del complejo macromolecular (a, b, c) se puede dividir en dos pasos: al ensamblaje del complejo de membrana y la placa base en el sitio de la secreción (a) seguido del alargamiento de la estructura tubular citoplásmica construida por hexámeros Hcp (rectángulos negros) apilados unos sobre otros acoplados a la polimerización de la vaina TssBC (rectángulos azules) (b, c). Una vez en contacto con una célula blanco, la vaina se contrae, por lo tanto, impulsa el tubo interno hacia la célula blanco para suministrar proteínas efectoras (d). Una hélice α de TssC que sobresale de la vaina contraída recluta la ATPasa ClpV (e) que desmonta y recicla las proteínas de la vaina TssBC (f). Adaptado de Zoued y col., 2014.

La función mejor caracterizada de los SST6s es el suministro de toxinas antibacterianas, tales como las muramidases o glucósido hidrolasas que atacan la pared celular bacteriana, nucleasas que se dirigen a los ácidos nucleicos, y lipasas que degradan las estructuras de la membrana, promoviendo así la competición bacteriana (Yang y col., 2018). Sin importar cuál sea su blanco, todos los efectores antibacterianos identificados actualmente se expresan conjuntamente con una

proteína de inmunidad asociada, cuya función es prevenir la intoxicación en la propia célula o el fratricidio (Fitzsimons y col., 2018).

El género *Acinetobacter* ha sido estudiado en la competición bacteriana y se ha observado que mediante el SST6 distintas cepas como *A. baumannii* ATCC 17978 y DSM30011, y *A. baylyi* ADP1, pueden matar una amplia variedad de bacterias, entre ellas a *E. coli*, como así también a diferentes cepas del mismo género *Acinetobacter* y a otros patógenos nosocomiales (Repizo y col., 2015; Weber y col., 2016; Ringel y col., 2017).

Algunos efectores bacterianos relacionados al SST6 del género *Acinetobacter* han sido identificados bioinformáticamente y en algunos casos caracterizados experimentalmente (Weber y col., 2016; Ringel y col., 2017). Entre ellos se encuentran efectores asociados a las islas *vgrGs* (a excepción de Tpe1 que se halla codificado dentro de una isla PAAR) los cuales se detallan en la Tabla I.I con su respectiva actividad enzimática y el tipo de organismo que afecta.

Tabla I.I. Efectores caracterizados en *Acinetobacter spp.* vinculados a islas *vgrG*.

<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978			
Efactor	Actividad	Organismo <i>Target</i>	Referencia
Tle	Lipasa	<i>E. coli</i>	Weber y col., 2016
Tde	DNAsa		
Tse	Desconocida		
Tae	Amidasa (PG)		
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1			
Efactor	Actividad	Organismo <i>Target</i>	Referencia
Tpe1	Metalopeptidasa	Desconocido	Ringel y col., 2017
Tle1	Fosfolipasa	<i>E. coli</i>	
Tse1 y 2	Desconocida		
Tae1	Amidasa (PG)		

1.2.3 ROL DEL SST6 EN LA PATOGÉNESIS

El SST6 proporciona una ventaja de colonización en el medio ambiente o durante la infección para muchos patógenos. En este contexto, el SST6 se ha asociado con la inducción de citotoxicidad celular en *Aeromonas hydrophila* y

Campylobacter jejuni, en células epiteliales y glóbulos rojos, respectivamente (Suarez y col., 2010). En *Vibrio cholerae*, el SST6 no sólo es necesario para escapar a la depredación de las amebas, sino que también está implicado en la inducción de la citotoxicidad en células fagocíticas (Ma y col., 2010). En *Pseudomonas aeruginosa*, que alberga tres SST6 diferentes (H1 a H3), los sistemas H2 y H3 se encargan de inyectar proteínas efectoras que potencian la invasión de células epiteliales humanas mediante la modulación de una vía dependiente de la fosfatidilinositol 3 quinasa (Sana y col., 2013). El SST6-5 de *Burkholderia thailandensis* (que alberga hasta seis diferentes SST6), también necesario para la virulencia, se ha demostrado que facilita la diseminación bacteriana intercelular por inducir la formación de células gigantes mononucleadas (Schwarz y col., 2014). En *Acinetobacter baumannii* DSM30011, se ha probado que el SST6 actúa como factor de virulencia usando como modelo de infección larvas de *Galleria mellonella* (Repizo y col., 2015).

La mayoría de los estudios que desarrollan ensayos de virulencia para *A. baumannii* y patógenos humanos similares han utilizado modelos de infección en mamíferos, especialmente en roedores. Sin embargo, como el uso de vertebrados requiere instalaciones complejas y personal especializado para mantener y manejar grandes cantidades de animales, los modelos de invertebrados han ganado popularidad (Vallejo y col., 2015). Un ejemplo de esto, lo constituye el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual se ha convertido en un modelo de infección útil y fácilmente manipulable para el estudio de bacterias patógenas para el hombre, dado que a nivel molecular las infecciones en el nematodo demuestran significativo paralelismo a las infecciones bacterianas en vertebrados (Sifri y col., 2005).

1.3 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

1.3.1 GENERALIDADES Y ANATOMÍA

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que se encuentra en forma natural alrededor del mundo. Una larva recién nacida tiene 0,25 milímetros de longitud, mientras que un adulto alcanza una longitud de 1 milímetro (Corsi y col., 2015). Este gusano se propuso por primera vez como un organismo genético modelo por Sydney Brenner en 1974. Sus características más sobresalientes son: su cultivo económico, su fácil manipulación y la gran cantidad de herramientas

genéticas y moleculares disponibles para ser usadas. Es un animal anatómicamente simple y su cuerpo es transparente, lo que facilita su visualización en la lupa permitiendo observar marcadores fluorescentes *in vivo* (Corsi y col., 2015). Además, el genoma de este animal ha sido completamente secuenciado, observándose que posee un 60% de genes homólogos con el genoma humano (Hulme y col., 2011) y aproximadamente el 40 % de los genes asociados a enfermedades en humanos presentan homólogos en *C. elegans* (Teschendorf y col., 2009). Dado que a nivel molecular las infecciones en el nematodo demuestran similitudes significativas con las infecciones bacterianas en vertebrados, se lo utiliza para estudiar determinantes genéticos de la virulencia bacteriana y de la respuesta inmune del hospedador (Sifri y col., 2005). Sumado a esto, se lo ha presentado como una poderosa plataforma para el testeo de nuevas drogas (Artal-Sanz y col., 2006).

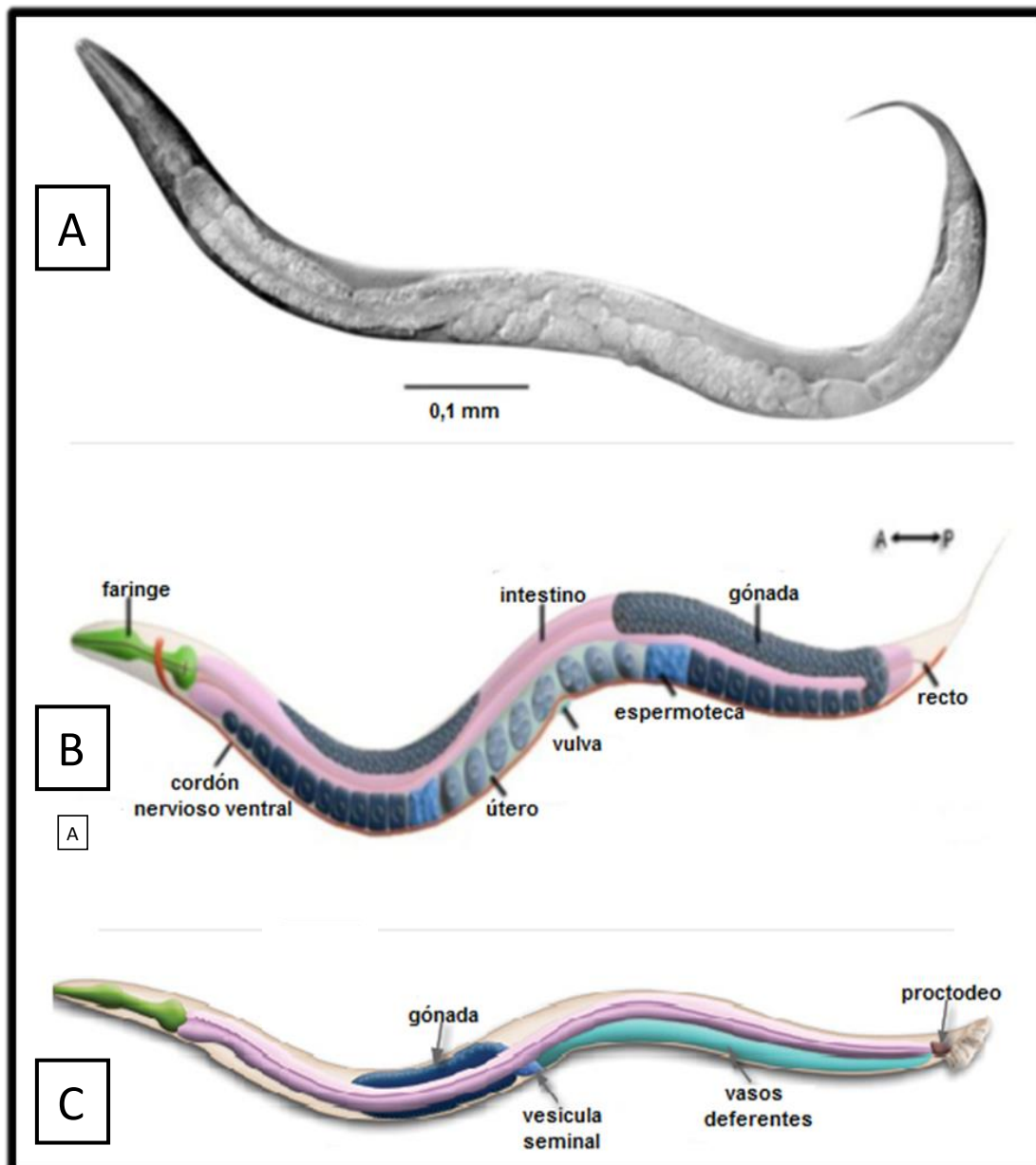


Figura 1.7: Anatomía de *C. elegans* adulto. A) Microscopía de un nematodo adulto. Se puede apreciar la transparencia del animal y las estructuras que lo componen. Adaptado de http://web.science.uu.nl/developmentalbiology/boxem/elegans_intro.html. B) Representación de un nematodo hermafrodita en la que se indican los órganos principales. Se observa la faringe (verde), el intestino (violeta) y el sistema reproductor (en celeste y azul oscuro). El sistema reproductor está formado por la gónada distal y la gónada proximal, la espermoteca y el útero donde comienza el desarrollo de los huevos. C) Representación de un nematodo macho en la que se indican los órganos principales. Se observa la faringe (verde), el intestino (violeta) y el sistema reproductor (en celeste y azul oscuro). Adaptado de WormAtlas (www.wormatlas.com).

En el laboratorio, es fácil de cultivar ya que se puede crecer sobre un césped de bacterias (en general la cepa *Escherichia coli* OP50) en un medio de cultivo de

tipo microbiológico con agar. El mantenimiento de las poblaciones de *C. elegans* es extremadamente simple y sólo requiere transferirlos mediante el recorte de un pequeño trozo de agar de la placa de origen a la de destino.

Los adultos poseen alrededor de 1.000 células somáticas, pero aun así presentan variedad de tejidos, como muscular, nervioso e intestinal (Corsi, 2006) (Figura 1.7).

C. elegans presenta dimorfismo sexual, pudiendo ser machos o hermafroditas, con 1.031 y 959 células somáticas respectivamente. Los hermafroditas son esencialmente hembras que producen y almacenan espermatozoides en una determinada etapa del desarrollo, antes de comenzar a producir ovocitos. Los machos aparecen en la población muy infrecuentemente [(0,1-0,2) %], como resultado de la no disyunción del cromosoma sexual X. Son morfológicamente distinguibles de los hermafroditas ya que son más pequeños y finos y poseen una cola con forma de abanico (Figura 1.7). Estas diferencias anatómicas entre ambos sexos se hacen notorias a partir del cuarto estadio larval (L4). Gracias a este dimorfismo sexual, los hermafroditas son útiles para mantener mutaciones homocigotas sin la necesidad de un cruzamiento, mientras que los machos pueden utilizarse para trasladar mutaciones entre cepas. Si un hermafrodita se auto-fertiliza, puede generar una progenie de unos 300 individuos (dada la cantidad limitada de espermatozoides que almacena), mientras que, si se aparea con un macho, el número asciende a ~1.000 individuos (Corsi, 2006).

1.3.2 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *C. elegans* consiste de: una etapa embrionaria, cuatro estadios larvales (L1-L4) y la adultez (Figura 1.8). El ciclo de vida completo de *C. elegans* transcurre a lo largo de aproximadamente 3 días en condiciones óptimas. Su extensión es dependiente de la temperatura. Así, un embrión puede alcanzar la adultez en 3 días a 25°C, pero demora 5 días a 15°C. El embrión comienza su desarrollo dentro del hermafrodita, sin importar si el esperma que fertiliza al ovocito provenga de la espermatoteca del hermafrodita o del apareamiento con un macho. Una vez que el embrión alcanzó aproximadamente las 28-30 células, es depositado en el ambiente exterior. La embriogénesis se completa luego fuera del hermafrodita durante un periodo de 13 horas a 22°C. Al eclosionar este estadio larval (L1) su desarrollo se arresta si no encuentra disponibilidad de comida. En presencia de

alimento, la larva procede a través de cuatro estadios que son delimitados por los cambios de cutícula necesarios para soportar el aumento en el volumen corporal, y en el transcurso de los mismos se desarrollan los caracteres sexuales específicos (Corsi, 2006). El nematodo se reproduce cada dos o tres días poniendo entre 200 y 300 huevos y tiene un promedio de vida de entre dos y tres semanas (Fielenbach y col., 2008). Una ruta alternativa del desarrollo post-embrionario es tomada en el estadio L1 tardío (Figura 1.8) cuando el gusano se encuentra en condiciones ambientales desfavorables, como, por ejemplo, carencia de comida, altas temperaturas o superpoblación. En estos casos, el nematodo ingresa en un estadio que se caracteriza por tener un metabolismo alterado y es denominado larva “dauer” (del alemán “duración”). Esta larva se caracteriza principalmente porque presenta una cutícula más resistente que las larvas del desarrollo regular del nematodo (Hu, 2007). Gracias a esta característica, la larva dauer es capaz de vivir entre 3 y 4 meses, a diferencia de cuando se encuentra en ciclo reproductivo (2 a 3 semanas). En las larvas dauers, la alimentación se interrumpe definitivamente y la locomoción se torna más lenta. Estas larvas son altamente resistentes a todo tipo de estrés y cuando las condiciones ambientales mejoran, pueden reingresar al ciclo normal del desarrollo, directamente en el estadio L4. No importa cuánto tiempo haya estado el gusano como dauer, al retomar el desarrollo normal, el promedio de vida no se ve afectado respecto de un gusano que nunca cursó por ese estadio (Fielenbach & Antebi, 2008).

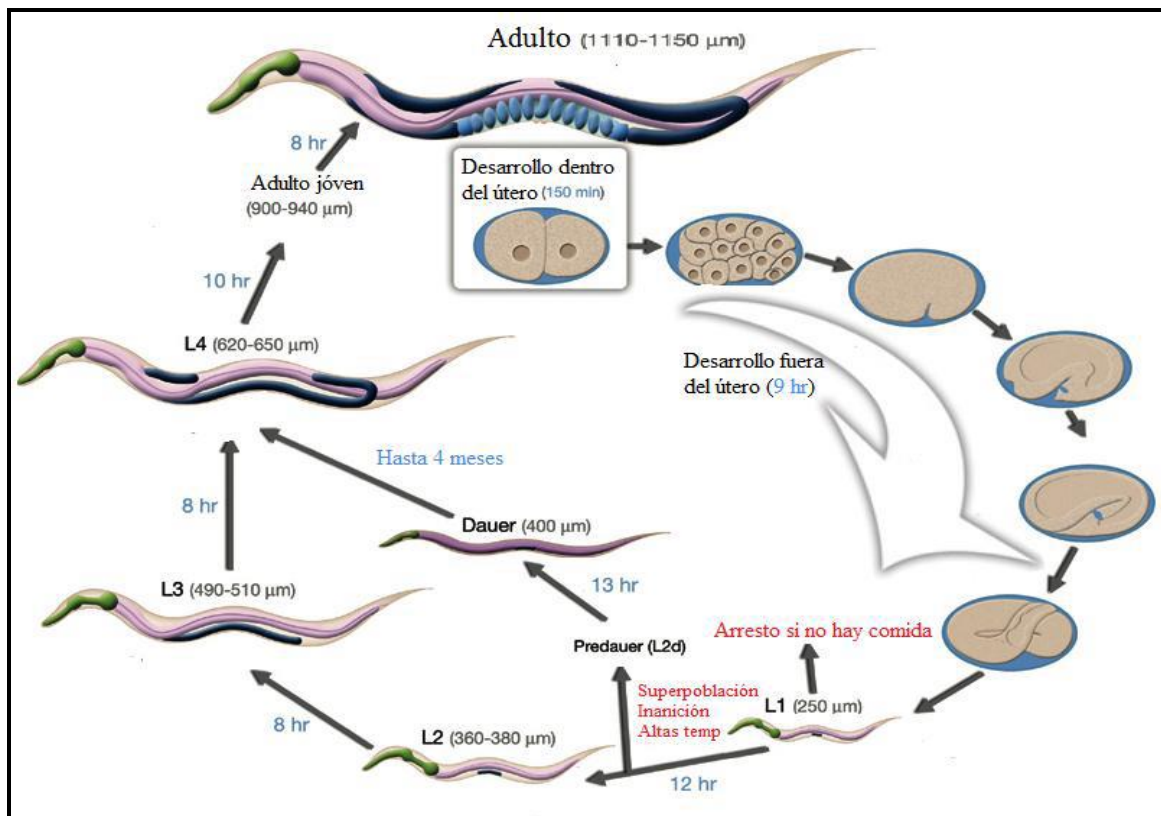


Figura 1.8: Ciclo de vida de un hermafrodita a 22°C. El nematodo consta de una etapa embrionaria, cuatro estadios larvales y la adultez. Una vía alternativa en condiciones estrés da origen al estadio resistente “dauer”. Adaptado de WormAtlas (www.wormatlas.com).

1.3.3 ESTUDIO DE PATOGÉNESIS BACTERIANA EN *C. ELEGANS*.

Numerosos estudios se han realizado en los últimos años usando como modelo de infección al nematodo *C. elegans*. Se han definido distintos mecanismos de patogénesis siendo estos: infección con colonización intestinal (la mayoría de los patógenos humanos), infecciones persistente (*S. entérica*, *E. faecalis*, *S. marcescens*), invasión (patógenos naturales de *C. elegans*), formación de *biofilms* (*Yersinia pestis*) y muerte mediada por toxinas (*P. aeruginosa*) (Sifri y col., 2005).

Ali y sus colaboradores (Ali y col., 2016), realizaron infecciones con *Pseudomonas syringae* y pudieron ver que las cepas en estudio cambiaban su condición de no patógena a patógenas según las características del medio de cultivo, además de comprobar la colonización del intestino del nematodo por parte del patógeno.

Vallejo y su grupo (2015), realizaron diferentes bioensayos (*killing*, fertilidad) con distintas cepas de *A. baumannii* (ATCC 17978 y 19606, encapsulados clínicos, y sus mutantes) para lograr diferenciar distintos grados de patogenicidad entre las cepas de interés, valiéndose de cambios en la temperatura, utilización de medios

con diferente osmolaridad y distintas cepas mutantes del modelo de infección *C. elegans*. Esto les permitió desarrollar un modelo *in vivo* sensible, confiable, reproducible y relativamente asequible para comparar cepas de distintos orígenes.

Espinal y colaboradores (2019) utilizaron una variedad de cepas de *A. baumannii* resistentes y sus respectivas cepas sensibles a distintos agentes antimicrobianos con la finalidad de evaluar la existencia de una posible relación entre la presencia de mecanismo de resistencia y la potencial virulencia de cada cepa.

Por lo tanto, *C. elegans* puede ser un modelo útil para el estudio de la contribución del SST6 a la interacción del patógeno nosocomial *A. baumannii* con el hospedador.

Objetivos

2.1 Objetivos generales

Este proyecto tiene como objetivo estudiar la interacción patógeno-hospedador de *Acinetobacter baumannii* usando como modelo al nematodo *Caenorhabditis elegans*, centrándose en la contribución del Sistema de Secreción Tipo 6.

2.2 Objetivos específicos

1- Poner a punto el modelo de infección que utiliza a *Caenorhabditis elegans* como hospedador.

2- Comparar la capacidad patogénica de distintas cepas de *Acinetobacter baumannii* sobre *C. elegans*.

3- Determinar si existen factores secretados al medio que sean causantes de patogenicidad.

4- Establecer si el SST6 está involucrado en la patogenicidad hacia el nematodo.

5- Estudiar los cambios morfológicos que provoca la colonización de *Caenorhabditis elegans* por parte de *Acinetobacter baumannii*.

Materiales y métodos:

3.1 Cepas bacterianas utilizadas

Tabla III.I. Cepas de prueba y sus características principales

<u>Cepas</u>	<u>Descripción</u>	<u>Referencias</u>
<i>A. baumannii</i> DSM30011	Cepa ambiental multisensible. SST6 ⁺	(Allen y col., 1944)
<i>A. baumannii</i> DSM30011 <i>tssM</i>	Mutante en el gen <i>tssM</i> . SST6 ⁻ Resistente a Apramicina	(Repizo y col., 2015)
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	Cepa clínica modelo. SST6 ⁺	(Piechaud y col., 1951)
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978 <i>tssM</i>	Mutante en el gen <i>tssM</i> . SST6 ⁻	Repizo y col., 2015
<i>A. baumannii</i> NCIMB8209	Cepa ambiental multisensible. SST6 desconocido	(Allen y col., 1944)
<i>A. baumannii</i> 5075	Cepa clínica multirresistente. SST6 ⁺	(Jacobs y col., 2014)
<i>A. baylyi</i> ADP1	Cepa ambiental SST6 ⁺	(Vallenet y col., 2004)
<i>E. coli</i> OP50	Cepa control nematodo. Resistente a Estreptomicina	(Brenner, 1974)

La tabla III.I resume brevemente las cepas utilizadas en el presente trabajo de tesina. Las mismas fueron seleccionadas en base a diferencias en su origen (ambiental y clínico) y en la presencia y/o actividad del SST6, pudiendo de esta forma, disponer de una combinación de estos factores que permitan el análisis y la realización de los objetivos planteados. Cabe destacar que la cepas ambientales *A. baumannii* DSM30011 (también denominada NCIMB 8208, Repizo y col., 2017) y NCIMB8209 fueron aisladas de la misma fuente (Allen y col., 1944).

3.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas fueron cultivadas durante toda la noche (*over night*, ON) a 37°C en medio L-Broth líquido con agitación constante o bien en medio LB sólido, suplementado con antibiótico estreptomina (Str) cuando correspondiera en concentración final de 100 µg/mL.

Los gusanos fueron crecidos en medio NGM (*Nematode Growth Media*) sólido a 20°C. Como fuente de alimento se utilizaron las cepas bacterianas mencionadas en la tabla III.I. *Escherichia coli* OP50 es utilizada como cepa control de infección no patogénica.

En la tabla III.II, se describen la composición de los medios utilizados.

Tabla III.II Medios de cultivo y soluciones utilizadas

<u>L-Broth:</u>	
Triptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Extracto de Levadura	0.5 g/L
<u>NGM</u>	
NaCl	3 g/L
Agar	17 g/L
Triptona	2.5 g/L
CaCl ₂	1 mM
Colesterol	1 mM
MgSO ₄	1 mM
Buffer Pi pH=6	25 mM
<u>Buffer M9</u>	
KH ₂ PO ₄	30 g/L
Na ₂ HPO ₄	60 g/L
NaCl	50 g/L
<u>Solución basal</u>	
NaCl	5,80 g/L
Buffer Pi pH=6	50 mM
Colesterol	5 mg/L

<u>Solución de congelado</u>	
NaCl	5,8 g/L
Buffer Pi pH=6	50 mM
Glicerol	3% (v/v)
MgSO ₄	1 M
<u>Solución blanqueadora</u>	
Lavandina (Conc.)	20% (v/v)
NaOH	0.5 M

3.3 Mantenimiento de *C. elegans*

Los gusanos fueron colocados en placas de Petri de 60 mm con medio NGM sólido (Vallejo y col., 2015) y con 50 μ L de cultivo líquido de *E. coli* OP50 (concentrado 10X del ON), previamente secado en flujo laminar. A medida que las bacterias iban siendo consumidas por los nematodos, los gusanos fueron removidos mediante el corte de una porción del medio sólido de 1 cm² de superficie (*chunk*) y transferidos a placas nuevas de NGM sólido con alimento fresco. Todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad.

Todas las observaciones del nematodo se realizaron en lupa estereoscópica RW 122 con aumento fijo de 40X.

3.4 Conservación de las cepas bacterianas y los nematodos

A partir de un cultivo ON, las cepas bacterianas de interés fueron congeladas en glicerol al 20% (v/v) y almacenadas a -80°C.

Para la conservación y almacenamiento de los nematodos, éstos fueron congelados a -80°C en tubos Eppendorf estériles en solución de congelado a partir de placas con alimento agotado donde predominan las larvas en estadios L1 y L2 (estadios más resistentes al congelado y posterior descongelado, porcentaje de supervivencia aproximado 40%; Stiernagle, 2006). Para ello, las placas sin alimento fueron lavadas con solución basal para recuperar los gusanos, posteriormente se centrifugó 30 segundos a 2.000 rpm, se removió el sobrenadante hasta mitad de su volumen. Se agregó un volumen de solución de congelado, se fraccionó para su

almacenamiento en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Se colocaron 1 hora en *freezer* a -20 °C y luego fueron llevados a -80°C para su almacenamiento final. Uno de los tubos (tubo de prueba) fue descongelado 24 h posterior a su congelamiento para evaluar la viabilidad de los gusanos.

3.5 Aislamiento de huevos y sincronización de *C. elegans*

Para obtener de forma aislada los huevos de una determinada población de gusanos, se utilizó la técnica denominada *bleaching*. Para ello se lavó una placa de NGM conteniendo una población mixta de gusanos con 10-15 mL de buffer M9, y se recolectó el material en un tubo Falcon estéril de 15 mL. Se centrifugó 3 min a 3.000 rpm y luego se descartó el sobrenadante. Se agregó entre 1 y 2,5 mL de solución blanqueadora al *pellet* (10 veces el volumen del mismo) y se incubó de 4 a 10 min (hasta dejar de observar gusanos suspendidos mirando el tubo a contra luz) con constante agitación para favorecer la lisis de los gusanos. La reacción se detuvo con el agregado, hasta llenar tubo, de buffer M9. Se volvió a centrifugar por 3 min a 3.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó nuevamente con buffer M9. Estos pasos se repitieron hasta que se logró la eliminación de la solución blanqueadora (ausencia de olor a lavandina). Los huevos aislados finalmente se resuspendieron en 1 mL de buffer M9 (Stiernagle, 2006). Para obtener una población sincronizada de gusanos, se induce la eclosión de los huevos obtenidos por *bleaching* en 1 mL de buffer M9 ON a 20°C y con agitación constante sin alimento. De esta manera, las larvas quedan arrestadas en estadio L1.

3.6 Ensayos de patogenicidad de *A. baumannii* utilizando a *C. elegans* como modelo de infección

3.6.1 ENSAYO DE SUPERVIVENCIA.

Se realizó un ensayo de supervivencia de los nematodos, para comparar la capacidad infectiva de diferentes cepas de *A. baumannii*. La cepa *E. coli* OP50 fue utilizada como control. A este fin, se prepararon placas de NGM sólido sobre las cuales se depositaron 50 µL de cultivo líquido ON de cada una de las cepas en estudio (*spot* bacteriano) ajustadas a un título de 10⁷ UFC. Las mismas fueron luego secadas en flujo laminar. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Sobre cada

spot se inocularon 20 nematodos en estadio L4, los cuales se obtuvieron a partir de nematodos arrestados en estadio L1 que fueron alimentados en placas de NGM sólido con *E. coli* OP50 durante 30-36 h a 20°C. Durante el ensayo las placas se mantuvieron a 20°C y para evitar la mezcla con la progenie, los nematodos adultos fueron removidos a placas nuevas con el mismo alimento fresco cada 48-72 h según fue requerido. El número de nematodos vivos fue monitoreado diariamente. Se consideró al nematodo muerto cuando este no respondió al contacto con el alambre de platino (*pick*) utilizado para realizar las transferencias entre placas.

3.6.2 ENSAYO DE SECRECIÓN

Este ensayo se realizó para determinar si las cepas en estudio secretan efectores tóxicos al medio con la capacidad de matar a los nematodos (ver Figura 3.1). Las cepas bacterianas de prueba (y la control) fueron crecidas de forma separada sobre discos de Acetato de Celulosa con poros de 0,22 µm depositados sobre placas de NGM sólido. Para ello, se inocularon 50 µL de cultivo ON ajustado a un título de 10^7 UFC y las placas se incubaron durante 24 h a 37°C (1). Trascurridas las 24 h, se removió la membrana con la cepa de prueba (2). En el sitio donde se encontraba el disco, se colocaron 50 µL de un cultivo ON de *E. coli* OP50, que posteriormente fue debidamente secado en flujo laminar (3). Luego, sobre el *spot* de la cepa control, se colocaron nematodos sincronizados en estadio L4 (4) y se procedió luego al conteo de los nematodos vivos a intervalos de tiempo regulares por un periodo de 48 h.

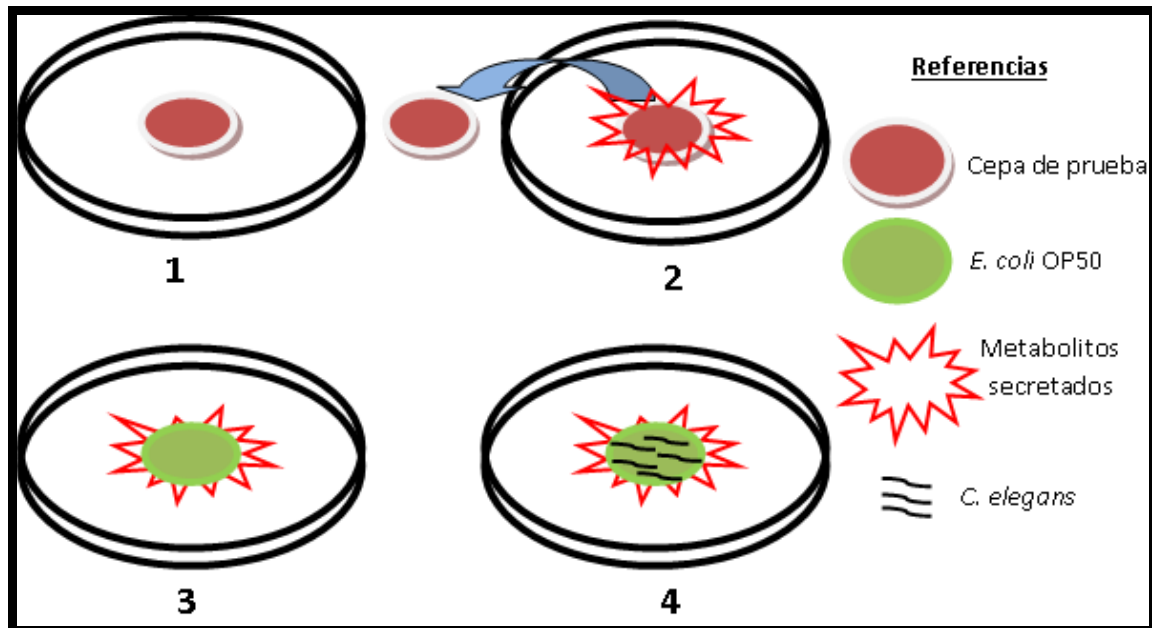


Figura 3.1: Representación esquemática del ensayo de secreción. Las cepas de prueba fueron retiradas después de 24 h de crecimiento sobre el filtro y los nematos alimentados con cepa control sobre la zona con metabolitos secretados. Adaptado de Ali y col., 2016.

3.6.3 ENSAYO DE SECRECIÓN MODIFICADO

Con la finalidad de que los nematodos solo puedan desplazarse sobre la zona donde se encuentra su alimento y donde, de existir, estarían las secreciones de las cepas de prueba en mayor concentración, se procedió a realizar un ensayo de secreción sobre una porción de medio de cultivo sólido NGM equivalente al tamaño de la membrana utilizada, en lugar de utilizar una placa entera cubierta de NGM. Sobre esta porción, se realizaron los pasos de la Figura 3.1. Esta modificación planteada, tiene la finalidad de maximizar la exposición de los nematodos a los potenciales efectores tóxicos y evitar la disminución de la concentración por difusión de los mismos en el medio.

3.7 Observación bajo el microscopio

3.7.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA

Se colocaron 500 μ L de agarosa caliente al 2 % (P/V) suplementada con azida de sodio 30 mM en el centro de un portaobjeto y a continuación se presionó perpendicularmente con otro portaobjeto de manera de generar una lámina de agarosa de 0,5 mm de espesor aproximadamente (*pad*). La azida sódica permite la observación de los nematodos ya que los mata sin alterar estructuras internas. Una

vez solidificada la agarosa se transfirieron los gusanos correspondientes con ayuda del *pick* (Porta-de-la-Riva y col., 2012).

3.7.2 MICROSCOPIA ÓPTICA

Aprovechando la naturaleza transparente del modelo de estudio, las estructuras del mismo pueden ser distinguidas bajo el microscopio usando microscopía de contraste interferencial diferencial (DIC) o también conocido como microscopía Nomarski. Para caracterizar el fenotipo de los nematodos luego de la infección con las distintas cepas se utilizó esta técnica. Las micrografías de los nematodos *C. elegans* fueron obtenidas utilizando una cámara Nikon Digital Sight DS-fi1 montada sobre un microscopio directo Olympus BH2.

3.8 Análisis de secreción de la proteína Hcp mediante SDS-PAGE

Se inocularon las cepas de *A. baumannii* en 20 mL de NGM líquido y se crecieron ON a 37°C en agitación constante. Los cultivos fueron ajustados a una $DO_{600}=1$ con medio líquido NGM. Mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes (SN).

Para concentrar las proteínas del SN 100 veces, se utilizaron tubos de ultra centrifugación (Amicon®, Millipore) de 10 kDa de corte en centrifuga refrigerada a 4°C y a 7.500 rpm hasta lograr un volumen final de 200 μ L.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se llevaron a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN II de Bio-Rad y el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli,1970). Las concentraciones finales de acrilamida fueron de 18% (P/V) para el gel de separación y 6% (P/V) para el de concentración. Las muestras fueron diluidas 1:5 en buffer de siembra (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% (V/V) glicerol, 2% (P/V) SDS, 5% (V/V) 2-mercaptoetanol y 0,1% (P/V) azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante, los primeros minutos a 80V y luego a 100 V. Las proteínas en los geles fueron analizadas por tinción con azul de Coomassie.

3.9 Extracción de ADN genómico de *A. baumannii* NCIMB8209, secuenciación y análisis de la presencia de genes codificantes para el SST6

Se aisló el ADN de *A. baumannii* NCIMB8209 utilizando un kit comercial (Wizard Genomic DNA kit de purificación, Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia genómica fue obtenida utilizando una estrategia híbrida a partir de los datos obtenidos utilizando tanto la tecnología PacBio Sequel (MrDNALab, Shallowater, Texas, USA) como la de Illumina MiSeq (lecturas de un solo extremo, instalaciones genómicas de la Universidad de Chicago). El cromosoma de *A. baumannii* NCIMB8209 finalmente ensamblado fue anotado usando las herramientas bioinformáticas disponibles en NCBI y depositado en DDBJ / ENA / GenBank bajo el número de acceso CP026863. Se realizó un análisis genómico en busca de genes SST6 y elementos relacionados por comparación de los genomas de las cepas de *A. baumannii* NCIMB8209 y DSM30011 utilizando el *software* Mauve versión 2.4.0.

3.10 Ensayos estadísticos

Las curvas de supervivencia se analizaron utilizando el *software* GraphPad Prism versión 5. El análisis estadístico de supervivencia de *C. elegans* se realizó mediante la prueba de log-rank de Mantel-Cox y la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Probabilidades asociadas (P) <0,05 fueron consideradas significativas e informadas de la siguiente manera: “*****” para $P < 0,0001$, “****” para $0,0001 < P < 0,001$, “***” para $0,001 < P < 0,01$ y “*” para $0,01 < P < 0,05$.

Resultados y **discusión:**

4.1 Evaluación de la patogenicidad de distintas cepas de *Acinetobacter* usando a *C. elegans* como modelo de infección.

C. elegans se ha convertido en un modelo de infección útil y fácilmente manipulable para el estudio de bacterias patógenas para el hombre (Sifri y col., 2005). Para poder evaluar la potencial virulencia de distintas cepas bacterianas de *A. baumannii* y especies relacionadas (tabla III.I) de diversos orígenes (ambientales y clínicas), se realizó un ensayo de supervivencia donde los nematodos fueron alimentados con las cepas en estudio (Figura 4.1) y se evaluó el comportamiento de los mismos a lo largo del tiempo. Para un análisis complementario con el ensayo, en la tabla IV.I se detallan características de las cepas que resultan relevantes para los objetivos planteados en la Sección 2. La presencia de SST6 en los genomas de las cepas en estudio y la evidencia de la secreción de la proteína Hcp fue obtenida de trabajos previos (Repizo y col., 2015; Weber y col., 2016; Ringel y col., 2017).

Tabla IV.I. Evidencia de SST6 y su actividad en las cepas de prueba

Cepas	Origen	Presencia de genes SST6	Secreción de Hcp
ATCC 17978	CLÍNICO	SI	SI
AB5075	CLÍNICO	SI	NO
DSM30011	AMBIENTAL	SI	SI
ADP1	AMBIENTAL	SI	SI
NCIMB8209	AMBIENTAL	no determinado	no determinado

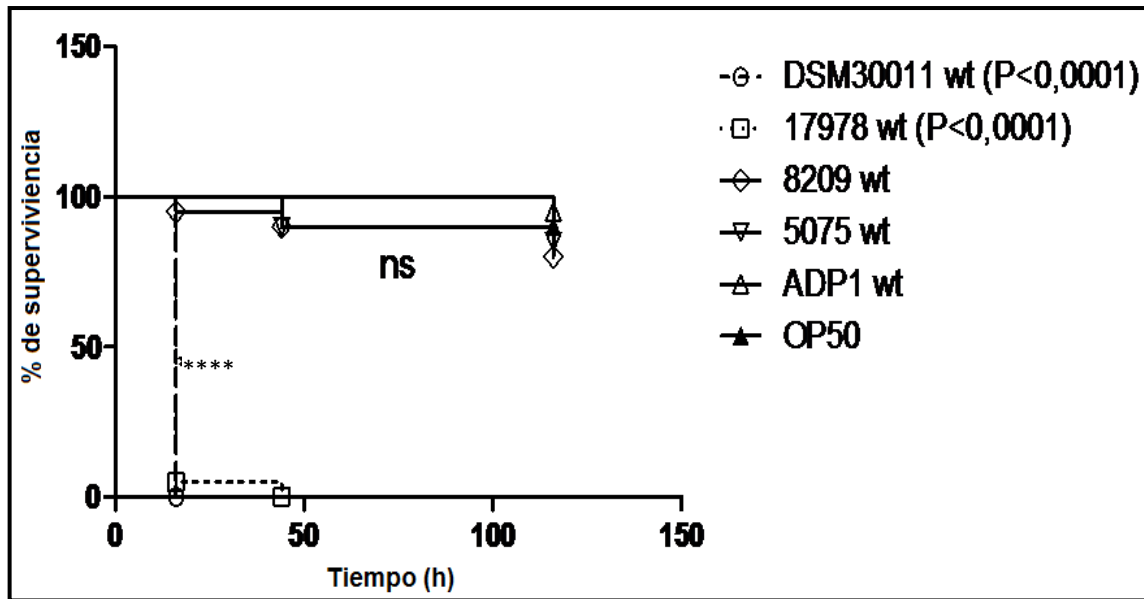


Figura 4.1: Ensayo de supervivencia. Infección del nematodo con distintas cepas de *Acinetobacter spp.* Título inicial de bacteria: 10^7 UFC totales. ns: no significativo

Este gráfico nos permite realizar una primera evaluación del grado de patogenicidad de cada cepa sobre el modelo utilizado. En una primera instancia, cabe destacar la diferencia notable en la infección con las cepas *A. baumannii* DSM30011 y ATCC 17978 con respecto a las restantes, las cuales además presentan un comportamiento similar al de la cepa control *E. coli* OP50. Las cepas antes mencionadas, provocan la muerte total de la población del nematodo en 24 h dando una idea del grado de patogenicidad que presentan sobre este modelo de infección. En segundo lugar y teniendo en cuenta la información complementaria de la tabla IV.I, se puede resaltar que una cepa que causa este fenotipo es de origen ambiental (DSM30011) y la otra, de origen clínico (ATCC 17978). Ambas cepas codifican y expresan el SST6 y lo utilizan en la competición bacteriana (Repizo y col., 2015; Weber y col., 2016), pudiendo en este caso, estar también involucrado en la muerte del nematodo.

La cepa clínica *A. baumannii* 5075, y las cepas ambientales *A. baumannii* NCIMB8209 y *A. baylyi* ADP1 no alteraron la supervivencia de *C. elegans*, por lo que no presentan mecanismos de virulencia que provoquen la muerte del hospedador. De estas tres, la primera ha sido ensayada en otro modelo de infección tal como *Galleria mellonella*, donde se vio que presentaba un alto grado de virulencia (Jacobs y col., 2014), resultado totalmente opuesto a lo obtenido en el estudio aquí

presentado. Estudios realizados por nuestro grupo han evidenciado que a pesar de la presencia de los genes codificantes para el SST6 en el genoma, la bacteria no secreta la proteína Hcp en las condiciones ensayadas. La falta de este sistema funcional en la infección del modelo aquí utilizado como así también, la posible ausencia de toxinas nocivas específicas, podría ser la razón por la cual los resultados obtenidos difieren del estudio de Jacobs y colaboradores.

Por otra parte, la cepa ADP1 ha sido estudiada en la competición bacteriana siendo capaz de eliminar a otras bacterias mediante el SST6 (Ringel y col., 2017). En nuestros ensayos de infección no detectamos efecto alguno, por lo que esta cepa podría ser incapaz de expresar el SST6 u otros factores de virulencia en las condiciones ensayadas, o no codificaría toxinas SST6-dependientes específicas para el modelo de infección aquí utilizado. Por último, la cepa NCIMB8209, que fuera co-aislada con la DSM30011, no presenta ningún grado de virulencia para el nematodo, se ha observado que no puede eliminar a *E. coli* (resultado presentado en JAM 2018) y hasta el momento no se ha caracterizado ningún mecanismo involucrado en la competición bacteriana. Esto nos ha llevado a realizar un análisis de su genoma y la búsqueda de factores de virulencia, tal como el SST6 (Sección 4.2).

También es importante mencionar algunas diferencias entre nuestros ensayos y estudios previos realizados por Vallejo y colaboradores, (Vallejo y col., 2015) donde se valieron del uso del mismo modelo de infección aquí utilizado y ensayaron la infección con distintas cepas de virulencia variable (categorías designadas en base a pruebas previas realizadas en células en cultivo alveolares humanas y murinas). Los resultados informados por el grupo de Vallejo exponen que tanto la cepa *A. baumannii* 307-0294 (precategorizada como de alta virulencia), como la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 (precategorizada como de virulencia intermedia) y las restantes que forman parte de su ensayo, presentaban curvas de muerte del nematodo similares entre ellas, las cuales a su vez no se diferencian de la cepa control de *E. coli* OP50. En dicho trabajo, el tiempo total requerido para registrar la muerte de todos los nematodos durante el ensayo de supervivencia fue en promedio de 15 días, lo cual difiere notablemente del empleado en el presente trabajo de tesina, el cual no fue superior a las 50 horas (2 días) Además, utilizaron una temperatura de incubación de 25°C durante el ensayo de supervivencia (20°C en nuestro caso). Es destacable notar que la temperatura de crecimiento óptima del

nematodo es 20°C. Esto lleva a resaltar el hecho de que en nuestros ensayos, el gusano no experimentaría estrés debido a la temperatura de crecimiento, reforzando la idea de una interacción específica entre *C. elegans* y las cepas DSM30011 y ATCC 17978.

4.2 Análisis genómico de *A. baumannii* NCIMB8209. Búsqueda de genes codificantes para el SST6.

En base a los resultados obtenidos en la Sección 4.1, nos propusimos estudiar el genoma de *A. baumannii* NCIMB8209 el cual fue secuenciado durante el presente trabajo de tesina. Mediante el análisis *in silico* con el programa Mauve (ver Figura 4.2) procedimos a la búsqueda del *cluster* y los genes asociados al SST6. Teniendo en cuenta que esta cepa comparte un nicho común con *A. baumannii* DSM30011 y que esta última codifica el SST6, decidimos utilizarla como cepa de referencia.

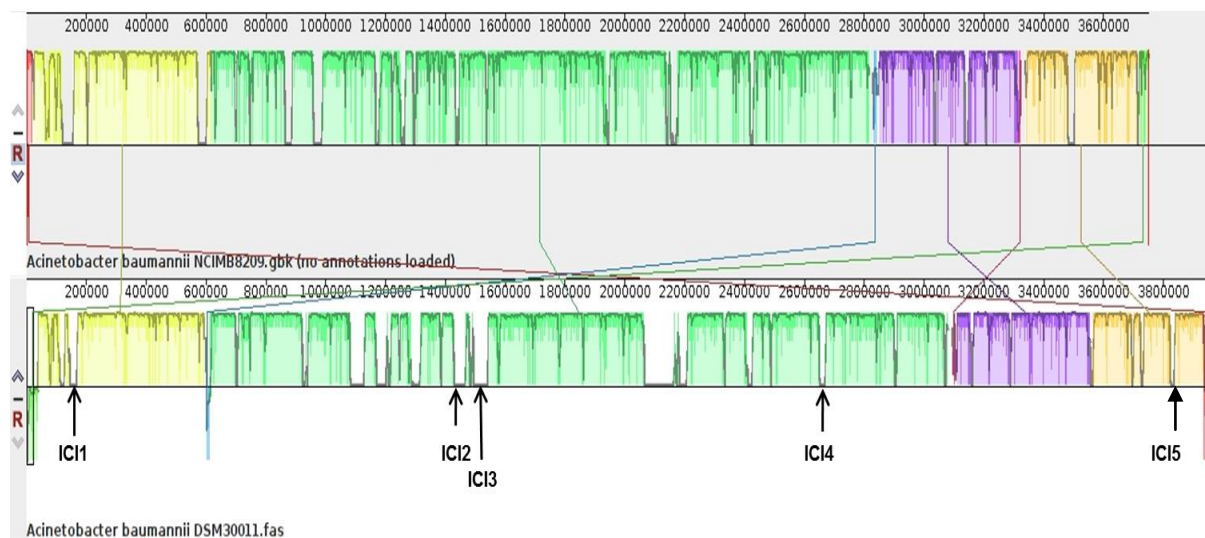


Figura 4.2: Comparación de los genomas de las cepas DSM30011 (parte inferior) y NCIMB8209 (parte superior) usando Mauve. Cada bloque se correlaciona con un fragmento de ADN del cromosoma de color distintivo para mayor claridad. El grado de conservación está indicado por las barras verticales dentro de los bloques. Su posición relativa a la línea del genoma denota regiones colineales e invertidas. ICI: Islas de competición interbacteriana. ICI 1: Región asociada a *vgrG* 1; ICI 2: *cluster* central SST6; ICI 3: Isla genómica con toxinas tipo Rhs; ICI 4: Región asociada a *vgrG* 2; ICI 5: Región asociada a *vgrG* 3.

Como se puede observar en la Figura 4.2, el genoma de *A. baumannii* NCIMB8209 no posee el *cluster* SST6 ni codifica *loci* asociados con dicho sistema de secreción, los cuales suelen ser generalmente diferentes versiones de proteínas VgrG y toxinas asociadas. Esta evidencia es interesante dado que la ausencia de SST6 podría ser la causa por la cual esta cepa no afecta a la supervivencia del nematodo.

4.3 Estudio del rol del SST6 en la virulencia.

Como se ha planteado en los objetivos de este trabajo, se decidió analizar la influencia del SST6 sobre la capacidad que tiene *A. baumannii* para eliminar al nematodo. Se ha mencionado ya en la introducción que diferentes bacterias utilizan el SST6 para provocar distintos tipos de respuestas tanto en células bacterianas como eucariotas. En particular, se ha observado que otras bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* (Sana y col., 2013), son capaces de utilizar este sistema para inducir la muerte de *C. elegans*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de supervivencia (Figura 4.1), decidimos trabajar con las cepas *A. baumannii* DSM30011 y ATCC 17978 y sus respectivas mutantes en el gen *tssM* (Tabla III.I). En este contexto, es importante recordar que la proteína TssM es un componente de membrana clave del aparato de secreción tipo VI, necesario para el ensamblado de la maquinaria de forma funcional. Por ello, una cepa mutante en dicha proteína es incapaz de utilizar el sistema de secreción para la liberación de sus respectivos efectores (Repizo y col., 2015).

4.3.1 SECRECIÓN DE LA PROTEÍNA Hcp.

Para poder evaluar el rol del SST6, es importante primero evidenciar la funcionalidad del mismo y para ello resulta útil hacer un seguimiento de la secreción de la proteína Hcp. Esta proteína es un componente principal de la vaina, por lo cual, su presencia en sobrenadantes de cultivos bacterianos es una evidencia de que el SST6 está siendo ensamblado (Weber y col., 2016). Para conocer si las cepas elegidas presentan un SST6 activo, y de esta forma poder asociarlo al efecto sobre el modelo de infección *C. elegans*, se evaluó la presencia de Hcp mediante un experimento de SDS-PAGE (Figura 4.3). Se analizaron los sobrenadantes de cultivos bacterianos de las cepas salvajes *A. baumannii* DSM30011 y ATCC 17978 y

sus respectivas mutantes en el SST6. Cabe destacarse que los cultivos líquidos se llevaron a cabo usando medio NGM el cual es el utilizado para el crecimiento del nematodo.

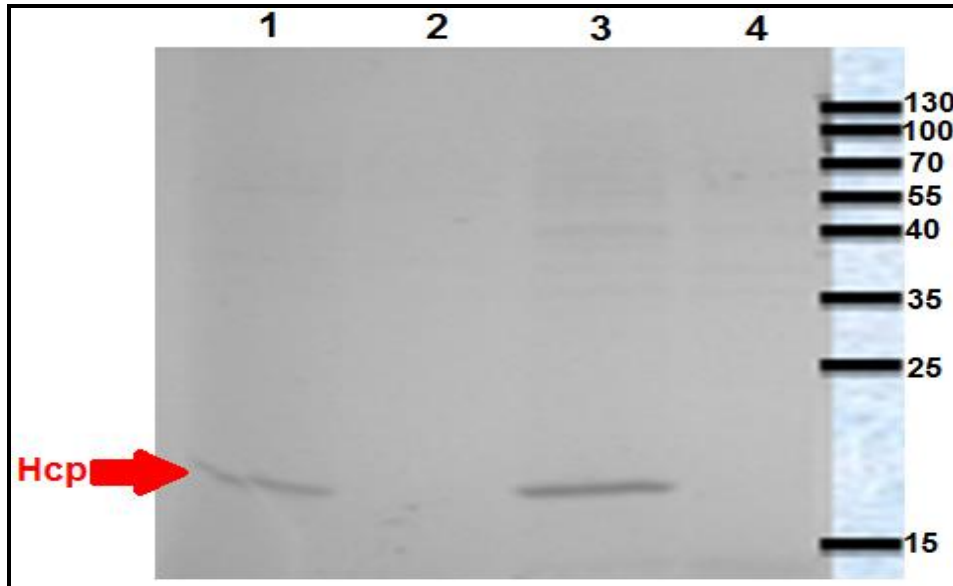


Figura 4.3: SDS-PAGE de sobrenadantes de los cultivo ON de las cepas de prueba. 1) *A. baumannii*. DSM30011 salvaje. 2) *A. baumannii*. DSM30011 *tssM*⁻. 3) *A. baumannii*. ATCC 17978 salvaje. 4) *A. baumannii*. ATCC 17978 *tssM*⁻. PM de la proteína Hcp 19 KDa.

Las calles 1 y 3, correspondientes a las cepas salvajes DSM30011 y ATCC 17978 respectivamente, presentaron una banda de aproximadamente 19 kDa, concordante con el peso molecular (PM) de la proteína Hcp. Esta banda no se visualiza en las respectivas cepas mutantes (calles 2 y 4). Por lo tanto, concluimos que este sistema de secreción se encuentra activo para las cepas salvajes DSM30011 y ATCC 17978, cuando las bacterias son crecidas en el medio NGM. Además corroboramos que, efectivamente, las cepas mutantes para el gen *tssM* son incapaces de secretar la proteína Hcp.

4.3.2 ROL DEL SST6 EN LA SUPERVIVENCIA DEL NEMATODO.

Teniendo en cuenta lo antedicho y los resultados observados en el SDS-PAGE, se realizó un ensayo de supervivencia con las cepas DSM30011 (Figura 4.4) y ATCC 17978 (Fig. 4.5) salvajes y sus respectivas mutantes en el gen *tssM* para evaluar el efecto de la mutación del SST6 en la supervivencia del nematodo.

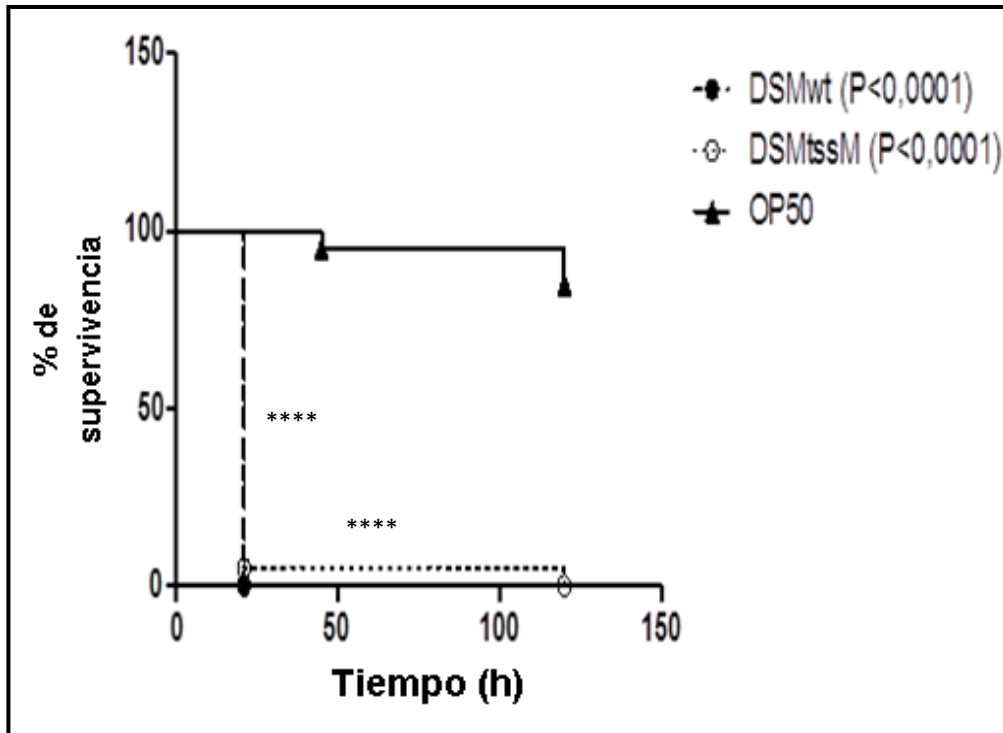


Figura 4.4: Ensayo de supervivencia DSM30011. Cepas utilizadas: *A. baumannii* DSM30011 y su derivada SST6⁻. Cepa control *E. coli* OP50. Título inicial de bacteria: 10⁷ UFC totales.

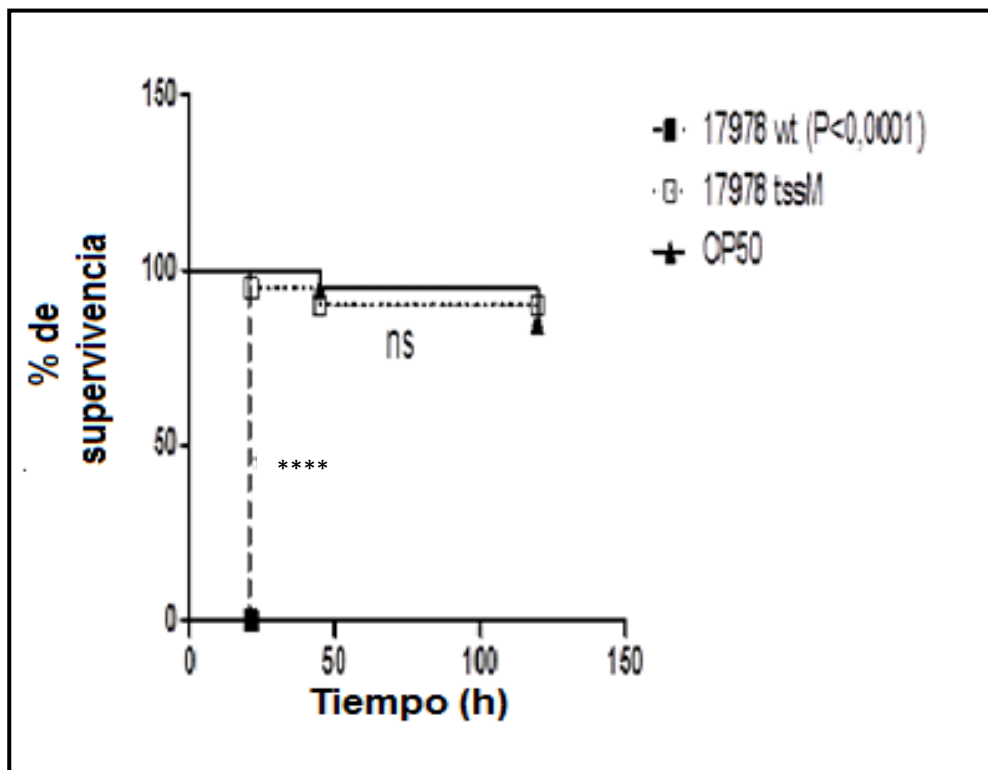


Figura 4.5: Ensayo de supervivencia ATCC 17978. Cepas utilizadas: *A. baumannii* ATCC 17978 y su derivada SST6⁻. Cepa control *E. coli* OP50. Título inicial de bacteria: 10⁷ UFC totales.

En la Figura 4.4 se observa que *A. baumannii* DSM30011 (cepa salvaje) y su cepa isogénica *tssM* presentan la misma curva de supervivencia de *C. elegans*, eliminando a toda la población en periodos de tiempos idénticos e iguales a 24 h. Por el contrario, en la Figura 4.5 se observa que *A. baumannii* ATCC 17978, provoca la muerte de toda la población de *C. elegans* en menos de 24 h, mientras que *A. baumannii* ATCC 17978 *tssM* presenta un porcentaje de supervivencia de *C. elegans* similar a la cepa control y por ende, totalmente diferente a la cepa salvaje en el tiempo que se realizó el ensayo. Por su parte, *E. coli* OP50 (cepa control) no presenta un efecto sobre la muerte del nematodo en el tiempo que se realizó el ensayo. Estos resultados indicarían que *A. baumannii* DSM30011 provoca la muerte de *C. elegans* por un mecanismo independiente del SST6 mientras que *A. baumannii* ATCC 17978 lo estaría haciendo de un forma dependiente de SST6.

4.4 Efecto del título de patógeno en la infección del nematodo.

Se evaluó el título inicial de bacteria con la cual se alimenta al nematodo para analizar si este tiene un efecto sobre la supervivencia del mismo. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de supervivencia con las cepas salvajes y mutantes analizadas en el apartado 4.3 a tres títulos iniciales diferentes. En todos los casos, el control utilizado fue *E. coli* OP50, el cual presentó curvas de supervivencia que no se vieron modificadas por el título inicial de bacteria y tiempos de muerte total correspondientes a los tiempos de vida normales del nematodo.

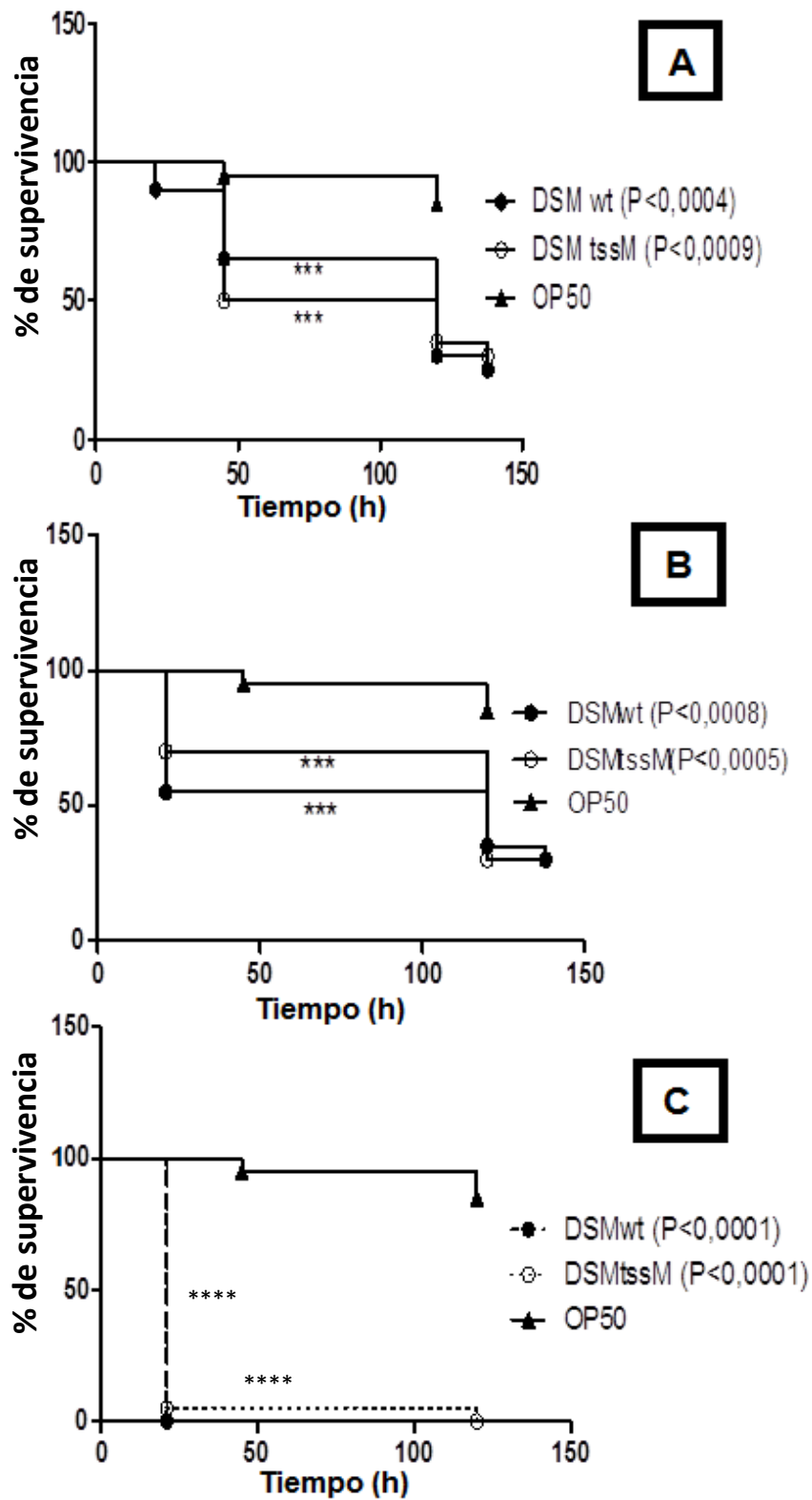


Figura 4.6: Ensayo de supervivencia a distintos títulos. Diferentes títulos iniciales de cultivo bacteriano de las cepas de *A. baumannii* DSM30011. Cepa control *E. coli* OP50. A) 10^3 UFC totales. B) 10^5 UFC totales. C) 10^7 UFC totales.

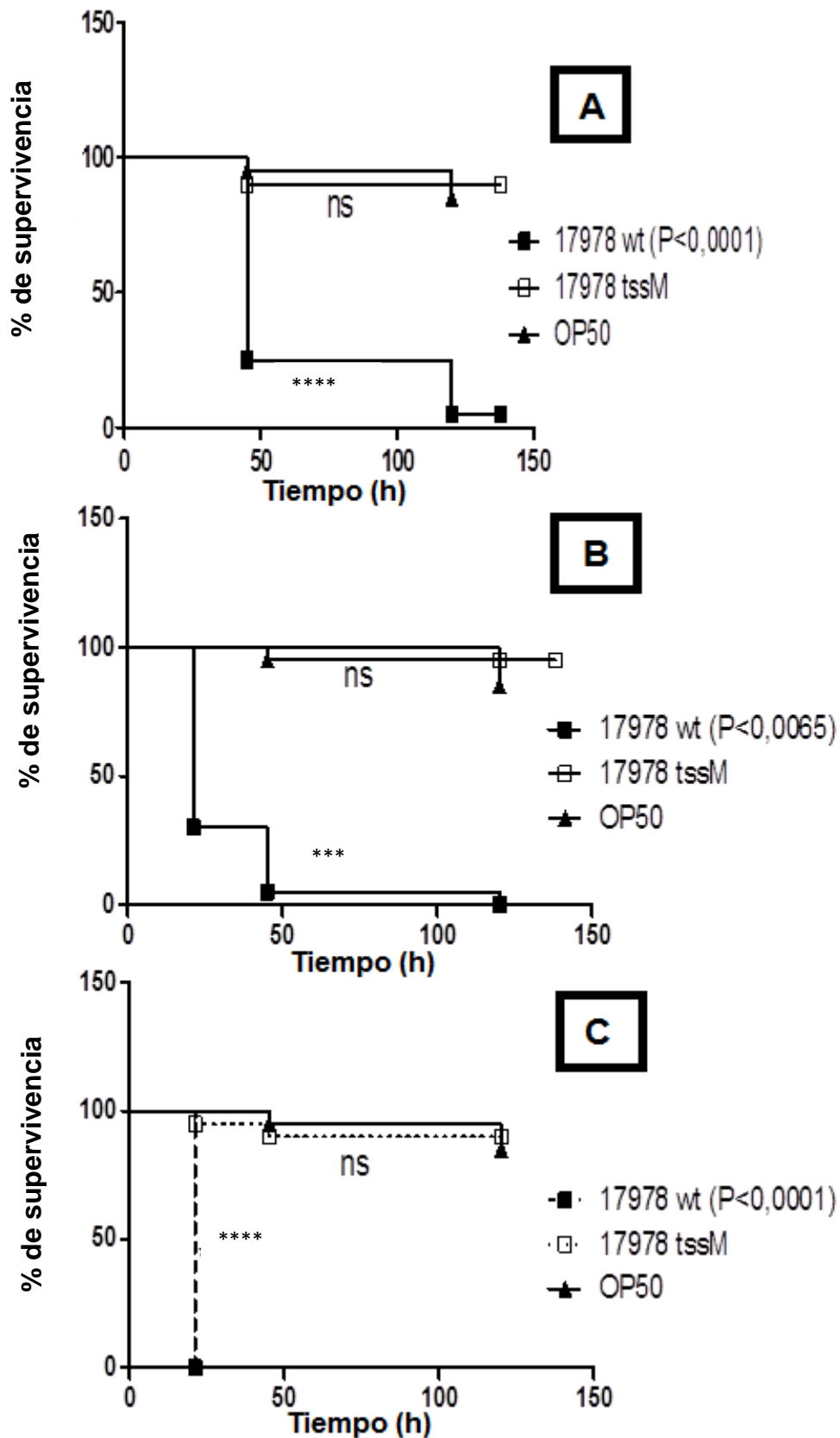


Figura 4.7: Ensayo de supervivencia a distintos títulos. Diferentes títulos iniciales de cultivo bacteriano de las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978. Cepa control *E. coli* OP50. A) 10^3 UFC totales. B) 10^5 UFC totales. C) 10^7 UFC totales.

En la Figura 4.6 (A), se observa que al colocar un título bajo de bacterias de la cepa DSM30011 con la cual se alimenta al nematodo, la población disminuye de forma paulatina, aumentando el tiempo de muerte total (tiempo que tarda en llegar la población a cero). Este resultado se observa tanto para la cepa salvaje como para la cepa mutante.

En la Figura 4.6 (B), el título inicial fue de dos órdenes de magnitud mayor al anterior, se observa que al principio el número de nematodos desciende abruptamente en las primeras horas para luego después hacerlo de forma paulatina, de manera similar a lo ensayado en (A), obteniéndose similares tiempos de muerte total. Finalmente, en la Figura 4.6 (C), se observa que la población de nematodos disminuye en su totalidad dentro de las primeras 24 h del comienzo del ensayo para la cepa salvaje y prácticamente la misma situación se observa para la cepa mutante.

En la Figura 4.7 A y B, en los ensayos donde el alimento fue *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje, la población del nematodo disminuyó más de un 80% en las primeras 48 h. Nuevamente para la cepa salvaje, se observa que al aumentar la cantidad inicial de bacterias a 10^7 UFC (Figura 4.7 C), la muerte total de los nematodos se alcanza en las primeras 24 h del ensayo. En los tres ensayos (A, B, C), la cepa ATCC 17978 mutante para el SST6 no presentó diferencias en las curvas de supervivencia al variar el título inicial de bacteria.

Tomando en cuenta lo analizado en estos ensayos y considerando lo expuesto en la Sección 4.3 podemos pensar que la cepa DSM30011, al no utilizar un mecanismo dependiente del SST6 para matar al nematodo, estaría utilizando, para tal fin, un mecanismo general que es dosis-dependiente. Mientras que la caída abrupta de las curvas de supervivencia de la cepa ATCC 17978 (desde el título más bajo inclusive) refuerza la idea de una relación más directa y específica con el nematodo, concordante con la utilización del SST6 para la patogénesis, ya que este, es un mecanismo dependiente de contacto y por el cual, la inyección de una mínima cantidad de toxinas implicaría un efecto deletéreo más pronunciado.

4.5 Evaluación de la presencia de factores difusibles causantes de la muerte de los nematodos

4.5.1 ENSAYO DE SECRECIÓN

Teniendo en cuenta que el SST6 estaría involucrado en la capacidad de *A. baumannii* ATCC 17978 de eliminar a *C. elegans*, decidimos evaluar la existencia de compuestos secretados por esta cepa que pudieran mediar el proceso de muerte de los nematodos. Para ello, se realizó el ensayo de secreción descrito en la Sección 3.6.2 de Materiales y Métodos.

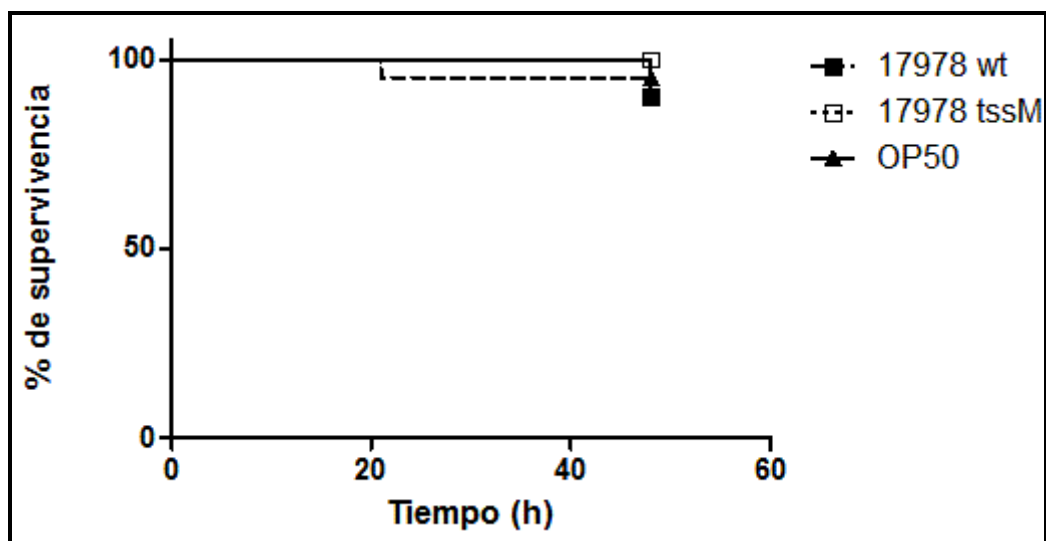


Figura 4.8: Ensayo de secreción. Cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje y mutante en el gen *tssM*. Control *E. coli* OP50. UFC totales: 10^7 .

En la Figura 4.8 se observa que la supervivencia de los nematodos expuestos a las secreciones tanto para la cepa salvaje, como para la cepa mutante en el SST6, no se ve alterada durante el tiempo en el cual se tomaron las mediciones, siendo ambas curvas similares a la de la cepa control.

4.5.2 ENSAYO DE SECRECIÓN MODIFICADO

Al realizar el ensayo descrito en el apartado anterior nos dimos cuenta de que los compuestos secretados por las bacterias pueden difundir en el medio de cultivo sólido sobre el cual se deposita el nematodo y, de esta forma, disminuir su concentración efectiva. Otro inconveniente que se presenta es que los gusanos

pueden pasar tiempo alejados de la zona de secreción, al ser capaces de abandonar el pasto bacteriano y desplazarse por el resto de la placa, minimizando así el tiempo que pudieran estar en contacto con dichos compuestos. Por tal motivo, se decidió realizar el ensayo de secreción modificado, según se detalla en la sección 3.6.3 de Materiales y métodos.

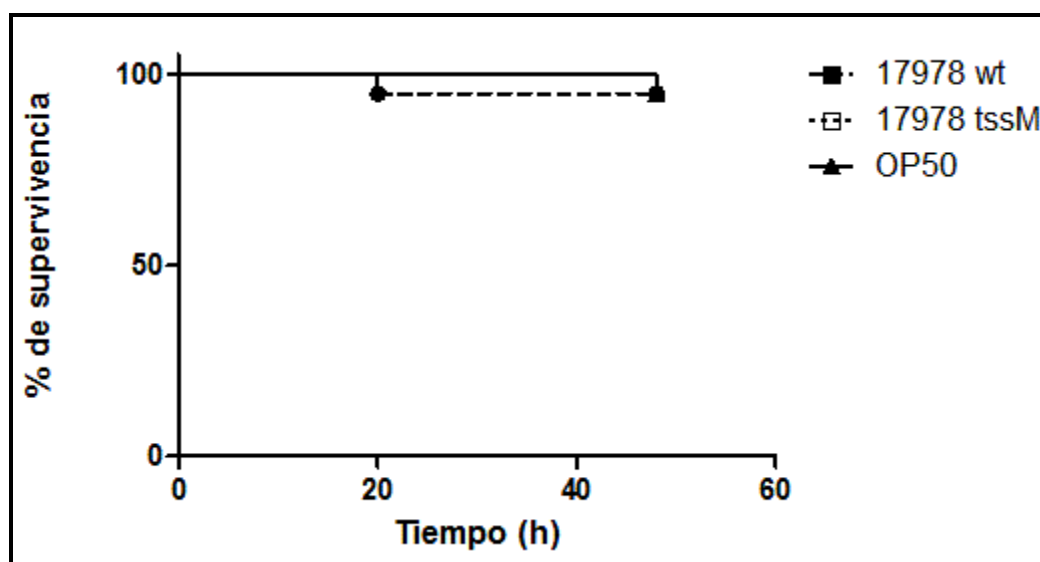


Figura 4.9: Ensayo de secreción modificado. Cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje y mutante *tssM*. Control *E. coli* OP50. UFC totales 10^7 .

En la Figura 4.9 podemos observar que la supervivencia de los nematodos depositados sobre el disco de medio sólido y expuestos a las moléculas secretadas no se vio alterada durante el tiempo en el cual se tomaron las mediciones, observándose curvas similares para todas las cepas involucradas en el ensayo.

En conclusión, las pruebas realizadas para exponer al nematodo a eventuales efectores nocivos que secreten las bacterias, no produjeron cambios en las curvas de supervivencia. Esto se correlaciona con la hipótesis de que la muerte del nematodo se produce por toxinas que se secretan directamente en la célula blanco, es decir, de una manera dependiente de contacto, propia del SST6. Estudios realizados por Weber y sus colaboradores (2016), valiéndose del uso de cepas mutantes en los genes *vgrG* y en toxinas asociadas a estos últimos, han aportado una estrategia útil para descubrir los efectores tóxicos relacionados al SST6, que son capaces de matar a *E. coli* (Tde y Tse). De esta forma, han logrado caracterizar

las moléculas que utiliza *A. baumannii* para eliminar a su célula blanco. Un enfoque similar, sería capaz de definir las toxinas que resultan nocivas para *C. elegans*.

4.6 Visualización por microscopía del efecto de la infección de *C. elegans*

C. elegans se alimenta de bacterias y éstas al ser ingeridas pueden tener un estrecho contacto con el nematodo, de modo que los procesos infecciosos que puedan darse para producir la muerte del nematodo podrían ser muy variables (ver Sección 1.3.3). Como una primera medida para la elucidación del proceso por el cual *A. baumannii* ATCC 17978 podría estar afectando la supervivencia de *C. elegans*, se realizó un análisis del fenotipo de los gusanos por visualización por microscopía de contraste interferencial diferencial (DIC o Nomarski). Los mismos fueron alimentados con las cepas salvaje y mutante en el SST6 y como control *E. coli* OP50.

En la Figura 4.10.A, la bacteria utilizada como alimento fue *A. baumannii* ATCC 17978 salvaje y se observa que no hay estructuras conservadas del intestino y la faringe, y la distensión del lumen es máxima en el nematodo. En los paneles B y C, donde el alimento fue *A. baumannii* ATCC 17978 *tssM* y *E. coli* OP50 respectivamente, pueden observarse de forma clara, a diferencia del caso A, las diferentes estructuras de la faringe (procorpus, metacorpus, istmo y bulbo terminal) y una forma regular del intestino y sin distensión del lumen. Se ha reportado que la variabilidad en la forma y tamaño del intestino y distensión de la faringe y el lumen intestinal son síntomas asociados a la acumulación de bacterias sin digerir (Garigan y col., 2002). Esto sugiere que *A. baumannii* ATCC 17978 coloniza el intestino de *C. elegans*.

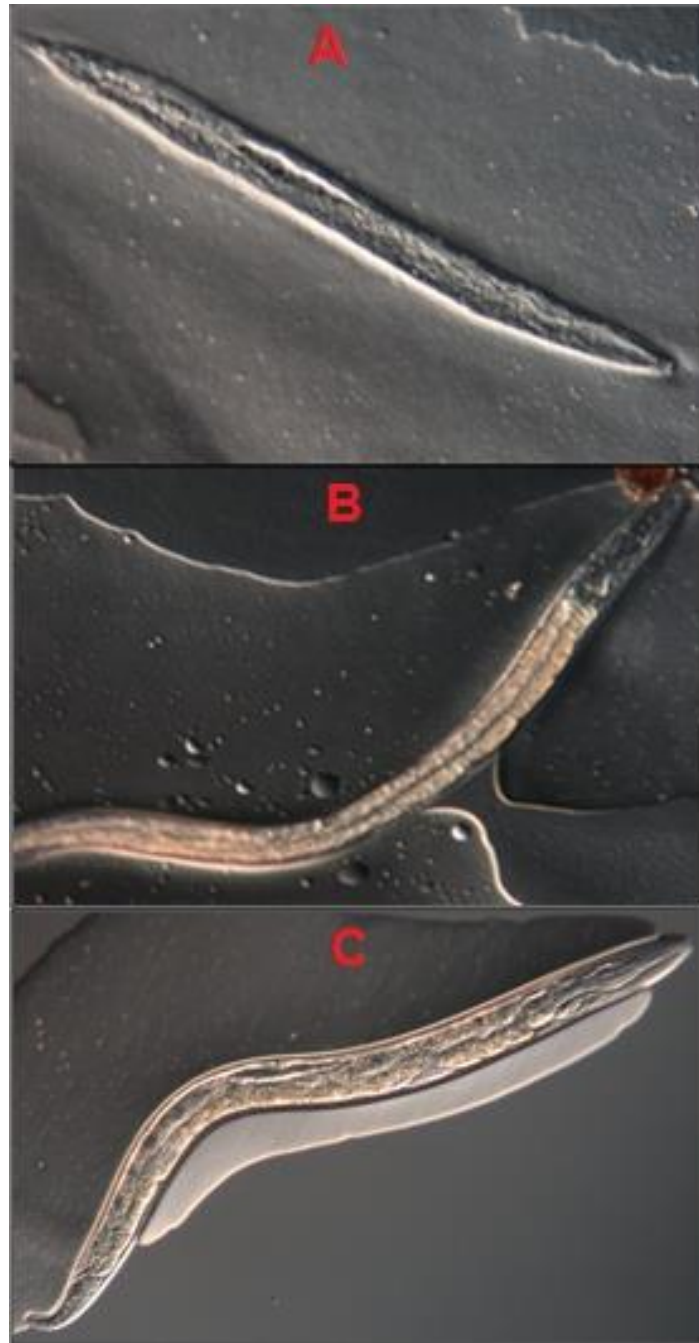


Figura 4.10: Microscopia DIC. Imágenes obtenidas del nematodo después de 24 h de incubación con la cepa en estudio. A) *A. baumannii* ATCC17978 salvaje. B) *A. baumannii* ATCC17978 *tssM*. C) *E. coli* OP50.

Conclusiones:

Los modelos *in vivo* son esenciales para la comprensión de enfermedades infecciosas en el humano. Si bien los modelos de mamíferos como los roedores son la primera opción, otros modelos sustitutos son útiles y con mayor aceptación por parte de los comités de ética institucionales. Tal es el caso del nematodo *C. elegans*, el cual ha comenzado recientemente a emplearse como modelo para desarrollar un sistema sencillo de interacciones hospedador-patógeno con el objetivo de identificar mecanismos de patogénesis bacteriana básicos evolutivamente conservados. En este contexto, es poco lo que se conocía de la contribución del sistema de secreción tipo 6 de *A. baumannii* en la interacción hospedador-patógeno, por lo que el presente trabajo de tesina intentó ahondar sobre dicha interacción a través del análisis de diferentes cepas con una combinación de características propicias para tal fin.

En este estudio, hemos analizado la capacidad de cepas de orígenes diversos, como por ejemplo *A. baumannii* DSM30011 (ambiental) y *A. baumannii* ATCC 17978 (clínico), para eliminar por completo una población de larvas de *C. elegans*. Debido a que estas cepas bacterianas son poseedoras de los genes asociados al SST6 en su genoma, y su actividad fue evidenciada en las condiciones empleadas en este trabajo, nos planteamos que factores secretados por el mismo fueran probablemente responsables de la muerte de los nematodos. La comparación de las infecciones llevadas a cabo con cepas salvajes y mutantes en dicho sistema, nos permitió concluir que la cepa ATCC 17978 mata a *C. elegans* de una manera dependiente del SST6 mientras que la cepa DSM30011 lo hace de una manera independiente.

Adicionalmente, los ensayos de secreción realizados pudieron confirmar que el mecanismo de muerte provocado por la cepa ATCC 17978 no se relacionaba a la presencia de compuestos secretados al medio que posteriormente entraban en contacto con el nematodo, sino que la necesidad de contacto entre el patógeno y el hospedador era un factor clave para la acción del SST6. Otra evidencia que refuerza esta idea es que el efecto del título inicial de bacterias con la cual se alimenta al nematodo, no tenga una influencia considerable en el caso de la cepa que presenta un mecanismo dependiente de contacto directo.

Sumado a todo lo expuesto anteriormente, la evidencia obtenida por microscopía, confirma la existencia de la interacción directa patógeno-hospedador atribuible al SST6. Esto se debe a la observación del fenotipo asociado a la

acumulación de bacterias sin digerir dentro del nematodo, produciendo la colonización del mismo.

Por otro lado, dentro del grupo de cepas que no generaron ningún efecto en la supervivencia del gusano, nos encontramos con cepas como *A. baumannii* 5075. Esta cepa no presentaría un SST6 activo en las condiciones utilizadas, y tampoco contaría con otros mecanismos que le permitan infectar al nematodo. Por otra parte, la cepa *A. baylyi* ADP1, posee los genes codificantes para el SST6, el cual ha sido caracterizado como funcional y responsable de la competición con otras bacterias. Sin embargo, no es capaz de producir la muerte en los ensayos aquí practicados. Esto podría sugerir que el *pool* de toxinas presente en su genoma no tiene efecto en el modelo de infección utilizado.

Estos resultados sugieren que el SST6 juega un papel importante en la virulencia de *A. baumannii* de una manera cepa dependiente, y que es necesaria una investigación más exhaustiva del conjunto de efectores tóxicos presentes en cada cepa.

Por último, y no por menos interesante, hemos visto que la cepa *A. baumannii* NCIMB8209 tampoco fue capaz de disminuir la población de nematodos. En un principio esto nos resultó llamativo, ya que al provenir del mismo nicho que la cepa *A. baumannii* DSM30011, intuitivamente pensábamos que se comportarían de forma similar frente al modelo de infección. Esta evidencia se suma a la obtenida en ensayos de competición bacteriana realizados por nuestro grupo de trabajo, los cuales también arrojaron resultados opuestos para ambas cepas, marcando la incapacidad de NCIMB8209 para competir contra otras bacterias. La secuenciación del genoma de esta cepa en la presente tesina nos permitió evidenciar que la misma no codifica el SST6, lo que explicaría en parte los fenotipos observados.

Los resultados obtenidos se correlacionan con reportes que han establecido que *A. baumannii* tiene una gran plasticidad genómica y por ende una gran capacidad para la adaptación, lo que lleva a que cepas que comparten el mismo nicho pueden tener roles distintos. Esta versatilidad contribuye a que dicha especie sea uno de los patógenos oportunistas MDR de mayor incidencia a nivel mundial.

Bibliografía

- Ali, M., Sun, Y., Xie, L., Yu, H., Bashir, A., & Li, L. (2016). The pathogenicity of *Pseudomonas syringae* MB03 against *Caenorhabditis elegans* and the transcriptional response of nematicidal genes upon different nutritional conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00805>
- Antunes, L. C. S., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292–301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Artal-Sanz, M., de Jong, L., & Tavernarakis, N. (2006). *Caenorhabditis elegans*: A versatile platform for drug discovery. *Biotechnology Journal*, 1(12), 1405–1418. <https://doi.org/10.1002/biot.200600176>
- Benz, J., & Meinhart, A. (2014). ScienceDirect Antibacterial effector / immunity systems : it ' s just the tip of the iceberg. *Current Opinion in Microbiology*, 17, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.002>
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>
- Brenner, S. (1974). *Caenorhabditis elegans*, 71–94.
- Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., & Douzi, B. (2015). The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage- Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube / Sheath Polymerization, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005545>
- Chang, Y., Rettberg, L. A., Ortega, D. R., & Jensen, G. J. (2017). *In vivo* structures of an intact type VI secretion system revealed by electron cryotomography. *EMBO Reports*, 18(7), 1090–1099. <https://doi.org/10.15252/embr.201744072>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407.

<https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>

- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
- Eijkelkamp, B. A., Stroeher, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., & Brown, M. H. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates, 323, 44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x>
- Elhosseiny, N. M., & Attia, A. S. (2018). *Acinetobacter* : an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerging Microbes & Infections* 2018 7:1, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0030-4>
- Fielenbach, N., & Antebi, A. (2008). Fielenbach and Antebi, 2008, (713), 2149–2165. <https://doi.org/10.1101/gad.1701508.GENES>
- Fitzsimons, T. C., Lewis, J. M., Wright, A., Kleifeld, O., Schittenhelm, R. B., Powell, D., ... Boyce, J. D. (2018). Identification of novel *Acinetobacter baumannii* type VI secretion system antibacterial effector and immunity pairs. *Infection and Immunity*, 86(8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-18>
- Garigan, D., Hsu, A. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Abringet, J., & Kenyon, C. (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*, 161(3), 1101–1112. <https://doi.org/10.1007/s11837-018-3034-6>
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2009). A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline, (January), 775–780. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn555>
- Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook*, (734), 1–19. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>
- Hulme, S. E., & Whitesides, G. M. (2011). Chemistry and the worm: *Caenorhabditis*

- elegans as a platform for integrating chemical and biological research. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(21), 4774–4807. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000136>
- Jacobs, A. C., Thompson, M. G., Gebhardt, M., Corey, B. W., Yildirim, S., Shuman, H. A., & Zurawski, D. V. (2014). Genetic manipulation of acinetobacter baumannii. *Current Protocols in Microbiology*, 2014(November), 6G.2.1-6G.2.11. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06g02s35>
- Kim, H. Y., Son, H. M., & Lee, H. K. (2018). Concrete crack-healing materials using biocalcification by ureolytic bacteria isolated in marine environment: An overview. *TechConnect Briefs 2018 - Advanced Materials*, 2(1999), 223–226. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Kim, Y. J., Kim, S. I., Kim, Y. R., Hong, K. W., Wie, S. H., Park, Y. J., ... Kang, M. W. (2012). Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: Diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiology and Infection*, 140(1), 137–145. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000744>
- Ma, A. T., & Mekalanos, J. J. (2010). In vivo actin cross-linking induced by Vibrio cholerae type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915156107>
- Maayer, P. De, Venter, S. N., Kamber, T., Duffy, B., Coutinho, T. A., & Smits, T. H. M. (2011). Comparative genomics of the type VI secretion systems of Pantoea and Erwinia species reveals the presence of putative effector islands that may be translocated by the VgrG and Hcp proteins. *BMC Genomics*, 12(1), 576. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-576>
- McConnell, M. J., Actis, L., & Pachón, J. (2013). Acinetobacter baumannii: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 130–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>
- Motility, S. (2013). Acinetobacter baumannii Strain M2 Produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but Not, 4(4), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-13.Editor>

- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen, 21(3), 538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- Planamente, S., Salih, O., Manoli, E., Albesa-jové, D., Freemont, P. S., & Filloux, A. (2016). TssA forms a gp 6 -like ring attached to the type VI secretion sheath, 35(15), 1613–1627.
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic & Caenorhabditis elegans; Methods: Synchronization and Observation. *Journal of Visualized Experiments*, (64), 1–9. <https://doi.org/10.3791/4019>
- Repizo, G. D., Gagné, S., Foucault-Grunenwald, M. L., Borges, V., Charpentier, X., Limansky, A. S., ... Salcedo, S. P. (2015). Differential role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* virulence. *PLoS ONE*, 10(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138265>
- Repizo, G. D., Viale, A. M., Borges, V., Cameranesi, M. M., Taib, N., Espariz, M., ... Salcedo, S. P. (2017). The environmental *Acinetobacter baumannii* isolate DSM30011 reveals clues into the preantibiotic era genome diversity, virulence potential, and niche range of a predominant nosocomial pathogen. *Genome Biology and Evolution*, 9(9), 2292–2307. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx162>
- Resins, G. (1944). Kalinenko, 1938, 1940;, (2).
- Ringel, P. D., Hu, D., & Basler, M. (2017). The Role of Type VI Secretion System Effectors in Target Cell Lysis and Subsequent Horizontal Gene Transfer. *Cell Reports*, 21(13), 3927–3940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.020>
- RM., C., L., T., & J., H. (2017). Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *ELife*, 6(PG-), 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.25950>
- Sana, T. G., Soscia, C., Tonglet, C. M., Garvis, S., & Bleves, S. (2013). Divergent Control of Two Type VI Secretion Systems by RpoN in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076030>

- Schwarz, S., Singh, P., Robertson, J. D., Leroux, M., Skerrett, S. J., Goodlett, D. R., ... Mougous, J. D. (2014). VgrG-5 Is a Burkholderia Type VI Secretion System-Exported Protein Required for Multinucleated Giant Cell Formation and Virulence, *82*(4), 1445–1452. <https://doi.org/10.1128/IAI.01368-13>
- Sifri, C. D., Begun, J., & Ausubel, F. M. (2005). The worm has turned - Microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology*, *13*(3), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.003>
- Stietz, M. S., Ramírez, M. S., Vilacoba, E., Merkier, A. K., Limansky, A. S., Centrón, D., & Catalano, M. (2013). *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I-III. *Infection, Genetics and Evolution*, *14*(1), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.020>
- Suarez, G., Sierra, J. C., Erova, T. E., Sha, J., Horneman, A. J., & Chopra, A. K. (2010). A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin □ †, *192*(1), 155–168. <https://doi.org/10.1128/JB.01260-09>
- Teschendorf, D., & Link, C. D. (2009). What have worm models told us about the mechanisms of neuronal dysfunction in human neurodegenerative diseases? *Molecular Neurodegeneration*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-38>
- Towner, K. J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, *73*(4), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>
- Unterweger, D., Miyata, S. T., Bachmann, V., Brooks, T. M., Mullins, T., Kostiuk, B., ... Pukatzki, S. (2014). The vibrio cholerae type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nature Communications*, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4549>
- Vallejo, J. A., Beceiro, A., Rumbo-Feal, S., Rodríguez-Palero, M. J., Russo, T. A., & Bou, G. (2015). Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *46*(4), 1. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.021>

- Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Robert, C., Duprat, S., ... Marlie, P. (2004). Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp . ADP1 , a versatile and naturally transformation competent bacterium, *32*(19), 5766–5779. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh910>
- Weber, B. S., Harding, C. M., & Feldman, M. F. (2016). Pathogenic *Acinetobacter*: From the cell surface to infinity and beyond Recommended Citation Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. *Journal of Bacteriology*, *198*(6), 880–887. <https://doi.org/10.1128/JB.00906-15>. Editor
- Weber, B. S., Hennon, S. W., Wright, M. S., Scott, N. E., de Berardinis, V., Foster, L. J., ... Feldman, M. F. (2016). Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. *MBio*, *7*(5), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01253-16>
- Yang, X., Long, M., & Shen, X. (2018). Nanomachine its Offensive and. <https://doi.org/10.3390/molecules23051009>
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M. S., Logger, L., Douzi, B., ... Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1664–1673. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018>