

Estudio químico de bacterias marinas: aislamiento de productos naturales bioactivos, producción de proteínas recombinantes receptoras de sideróforos de bacterias patógenas en peces de acuicultura y preparación de conjugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas.

Autora: Diana Martínez Matamoros

Tesis doctoral UDC / 2018

Directores:

Dr. Carlos Jiménez González
Dr. Jaime Rodríguez González

Programa de doctorado en Química Ambiental y Fundamental



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Acta de Tesis

El tribunal, nombrado por el Excmo. Sr. Rector de la Universidade da Coruña para calificar la tesis doctoral titulada “**Estudio químico de bacterias marinas: aislamiento de productos naturales bioactivos, producción de proteínas recombinantes receptoras de sideróforos de bacterias patógenas en peces de acuicultura y preparación de conjugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas**” dirigida por los Drs. Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González, presentada por Dña. **Diana Martínez Matamoros** y constituido en el día de la fecha por los miembros que subscriben la presente Acta, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por la calificación de:

En A Coruña, a..... de de 2018

PRESIDENTE

Dr. Unai Ugalde
Profesor
Universidad del País Vasco

SECRETARIO

Dra. Montserrat Martínez
Profesora Titular
Universidade da Coruña

VOCAL

Dr. Francisco Trillo
Fellow/Lecturer
University of Birmingham

Firmado

Firmado

Firmado



Doña: Diana Martínez Matamoros

Presenta la memoria adjunta, titulada **“Estudio químico de bacterias marinas: aislamiento de productos naturales bioactivos, producción de proteínas recombinantes receptoras de sideróforos de bacterias patógenas en peces de acuicultura y preparación de conjugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas”** para optar al grado de doctor en Química que ha sido realizado bajo la dirección de los doctores Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González en los laboratorios del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidade da Coruña.

A Coruña, a 27 de julio de 2018.

Fdo. Diana Martínez Matamoros

Fdo. Carlos Jiménez González

Fdo. Jaime Rodríguez González

Don **Carlos Jiménez González**, y Don **Jaime Rodríguez González**,
Catedráticos de Universidad, pertenecientes al Departamento de Química (Área de
Química Orgánica) de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

Certifican:

Que la memoria adjunta, titulada **“Estudio químico de bacterias marinas: aislamiento de productos naturales bioactivos, producción de proteínas recombinantes receptoras de sideróforos de bacterias patógenas en peces de acuicultura y preparación de conjugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas”** ha sido realizada bajo su dirección por la licenciada en Química Doña **Diana Martínez Matamoros**, en el Área de Química Orgánica dependiente del Departamento de Química.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizan su presentación en la
Universidade da Coruña para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en A Coruña, a de de
2018.

A Coruña, a 27 de julio de 2018.

Fdo. Carlos Jiménez González

Fdo. Jaime Rodríguez González

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidade da Coruña por permitirme realizar la tesis doctoral en sus instalaciones. En especial al Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), el cual empezamos a habitar desde el año 2016 y en donde me permitieron crecer profesionalmente con plena libertad dándome acceso a todos los equipos necesarios para llevar a cabo esta tesis, además de presentar los resultados en diversos eventos académicos organizados dentro y fuera del centro.

A mis directores Dr. Carlos Jiménez y Dr. Jaime Rodríguez por permitirme venir a aquí, por su paciencia y por la confianza que han depositado en mí. Además, por estar siempre enseñándome y buscando que cada parte de este trabajo saliera adelante.

A los Doctores Manuel Lemos y Miguel Balado y a los integrantes del grupo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela por el excelente trabajo en equipo y los ensayos de vacunación. Al Dr. Antón Vila por su apoyo e ideas para continuar el trabajo con proteínas.

A mis supervisores en la Universidad de Leeds Dr. Miller Alonso Camargo y Dra. Adriana Matamoros por toda su paciencia, por ayudarme con el aprendizaje de todas las técnicas para la caracterización de las nanopartículas magnéticas. Además, por una estancia maravillosa en Leeds para compartir un tiempo en familia junto con la pequeña Juanita.

A Leonardo, Freddy y al grupo de productos naturales marinos de la Univesidad Nacional de Colombia por todo lo que aprendí y aprendimos.

A las entidades que financiaron este trabajo de investigación, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través del proyecto AGL2015-63740-C2-2-R (SIDEROVAC), Xunta de Galicia a través de las Ayudas para la consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas. Grupo de Química molecular y de materiales. Colciencias, Universidad Nacional de Colombia y la International Foundation for Science (IFS, F/5023-1). La financiación de la estancia a través del programa “Ayudas de estancias predoctorales Inditex-UDC 2015”. Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible por otorgar los permisos de recolección (No. 4 de 10/02/2010) de las muestras de *Antillogorgia elisabethae* en el archipiélago de San Andres y Providencia (Caribe, Colombia) y de acceso a recursos genéticos (No. 108).

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), en especial Jorge, Gerardo, Nani y todo su personal por el gran trabajo que desempeñan en el análisis de las muestras.

A los integrantes del Servicio de gestión del CICA, Alicia, Julia, Sonia, Berta e Inma por toda su colaboración y apoyo que directa o indirectamente contribuyeron al desarrollo de esta tesis. A Cris Arrivi con quien compartí ratos geniales y por aguantarme.

A todos mis compañeros de QUIMOLMAT Rosa N., Juan Carlos, Kathe, Javi, Dawrin, Ramon, Alejandra, Luis, Oscar O. Tania, Almudena, Lore, Rosa P., Olaya, Tamara, Iago, Arturo, Elena, Ana R. Isma, Alberto, Jorge, Juanma y Oscar con quienes compartí buenos momentos, cada quien, en su mundo, pero siempre haciendo agradable cada día.

A mis compañeros de GIBE que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en todo lo que necesitara.

A mis amigas Kathe, Zeny, Rosane y Rosa N., que siempre estuvieron ahí en todo momento brindándome apoyo y la mejor de las compañías, con Kathe pasando tardes intensas de síntesis y cantando los éxitos del momento, la llegada de Thiago, viajes y cafés. A Cesar también, por toda su ayuda y amistad.

A mi madre por su apoyo desde la distancia (y de visita también) y porque sin duda, gracias a todo su esfuerzo pude llegar a donde hoy estoy. A mi abuela quien también hace parte de esta travesía. A toda mi familia (tíos y primos), en especial Adriana, Miller y Juanita quienes me han apoyado siempre en todo de forma incondicional. A Zully y Juan Carlos también por su ayuda, visitas y apoyo.

A Diani y Felipe, no hay palabras para agradecerles por todo lo que han hecho, desde asesoría científica, apoyo moral, y momentos inolvidables durante todo este tiempo. Por supuesto, a la familia adoptiva más genial porque no puedo dejar afuera a Lulu, Abelardo, Jenny y Jared, Solita, Xue y Juan y todos que siempre me enviaron la mejor de las energías.

A un grupo de personajes muy especial que aparecieron para cerrar esta historia Ana, Gloria, Lore, Rosa P., Gabriel, Ali y Rosa N., entre ratitos varios, mini dramas y predramas, gracias por compartir, apoyarme y caminar conmigo el último tramo.

Muchas gracias bacterias por su personalidad cambiante, transferencia horizontal y su facilidad de transformación, sin ustedes esto no sería posible.

Abreviaturas

[α] ^D	Rotación óptica específica
ABC	Dominio de unión a ATP (ATP binding cassette)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ARN	Ácido ribonucleico
atm	Atmósfera
ATP	Trifosfato de adenosina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
c	cuadruplete
°C	Grado Celsius
CM9	Medio mínimo de Miller con casaminoácidos al 0.2 %
d	Doblete
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DW	Agua destilada (<i>Distilled water</i>)
ESI	Ionización por electroespray
EDX	Energía Dispersiva de Rayos X (<i>Energy Dispersive X-Ray</i>)
Fa	Feroxamina
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de fourier
g	Gramos
h	Hora
HAADF	Campo oscuro de ángulo anular (<i>High angle anular dark field</i>)
sep	septuplete
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

ABREVIATURAS

HR	Alta resolución (<i>High Resolution</i>)
Hz	Hercio
iPr	Isopropilo
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kb	Kilobase
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LR	Baja resolución (<i>Low Resolution</i>)
M	Concentración molar
m	Multiplete
mg	Miligramo
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M ⁺	Ión molecular
MHz	Megahercio
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MNP	Nanopartículas magnéticas (<i>Magnetic Nanoparticles</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
NRPS	Sintetasa de péptidos no ribosomales (<i>nonribosomal peptide synthetase</i>)
OD	Densidad óptica (<i>Optical density</i>)
PBP	Proteína periplásmica de unión (<i>periplasmic binding protein</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	<i>Protein data bank</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning electron Microscopy</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
t	tripleto

rt	Temperatura ambiente
TB	Terrific broth
TSA	Triptona Soja Agar
TEM	Microscopia electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TGA	Análisis Termogravimétrico (<i>Thermogravimetric analysis</i>)
TSB	Triptona soja agar suplementado con 1 % de NaCl
δ	Desplazamiento químico en ppm (RMN)
XRD	Difracción de rayos X (<i>X-Ray diffraction</i>)
λ	Longitud de onda
μL	Microlitro

Resumen

Esta Tesis Doctoral está dividida en tres partes. En la primera parte, se describe la importancia de los sistemas de captación de hierro en bacterias patógenas de peces y el uso de proteínas receptoras de sideróforos como potenciales vacunas. En la segunda parte, se sintetizó un conjugado entre el sideróforo feroxamina y nanopartículas magnéticas y se realizaron ensayos de captura con *Yersinia enterocolitica* WC-A. Finalmente, se determinó la estructura plana y la estereoquímica del tetrapéptido **cereusitin A** producido por *Bacillus cereus* RKHC-09 y se detectó e identificó el complejo de Ga(III) de piscibactina en los sobrenadantes de los cultivos de *Vibrio anguillarum* RV22 y el mutante $\Delta vabF$, con el fin de establecer la importancia del sistema de captación de hierro mediado por piscibatina en la virulencia de *V. anguillarum*.

Capítulo I

En este capítulo se habla de la importancia de la acuicultura y la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para el control de infecciones producidas por bacterias patógenas. Además, se describe de forma general el mecanismo de captación de hierro y las ventajas de emplear proteínas de membrana externa receptoras de sideróforos como vacunas.

Se presenta la metodología de clonaje, expresión y purificación de las proteínas recombinantes **FvtA** (receptor del sideróforo vancrobactina producido por *Vibrio anguillarum* RV22) y **FstC** (receptor de los sideróforos amonabactinas biosintetizados por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45). Adicionalmente, se expresó y purificó **rFstB** (receptor de acinetobactina producido por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45). Finalmente, se muestran los resultados obtenidos al ensayar **rFvtA**, **rFstB** y **rFstC** como vacuna en lenguados infectados con vibriosis y forunculosis.

Capítulo II

Este capítulo está dedicado a la aplicación de sideróforos conjugados con nanopartículas magnéticas para el desarrollo de un mecanismo de detección de bacterias. Se describen las aplicaciones de los sideróforos en diferentes campos junto con el proceso de diseño de nanomateriales magnéticos y la versatilidad de estos para sintetizar conjugados para desarrollar aplicaciones.

Se describe la síntesis del conjugado entre el sideróforo feroxamina y nanopartículas magnéticas funcionalizadas (MNP@SiO₂@NH@Fa), su caracterización y su capacidad de captura de *Yersinia enterocolitica* WC-A. También, se muestra la síntesis de un análogo de enterobactina que puede ser empleado para la síntesis de conjugados.

Capítulo III

En este capítulo se hace una breve introducción de la importancia de los microorganismos marinos como productores de productos naturales, su actividad biológica y su gran diversidad estructural. También se expondrán los métodos más generales para la selección de condiciones para el cultivo y obtención de compuestos producidos por bacterias principalmente.

Se muestra el proceso de elucidación estructural del tetrapéptido **cereusitin A** producido *Bacillus cereus* RKHC-09 mediante experimentos de resonancia magnética nuclear mono y bidimensionales y análisis de espectrometría de masas de baja y alta resolución. Adicionalmente, se determinó la estereoquímica absoluta de los aminoácidos presentes en la molécula por medio del método de Marfey.

Finalmente se mostrará el proceso de detección del complejo de Ga(III) de **piscibactina** en el sobrenadante de cultivo de *V. anguillarum* RV22 y el mutante $\Delta vabF$ por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Resumo

Esta Tese Doctoral está dividida en tres partes. Na primeira parte, descríbese a importancia dos sistemas de captación de ferro en bacterias patóxenas de peces e o uso de proteínas receptoras de sideróforos como potenciais vacinas. Na segunda parte, sintetizouse un conxugado entre o sideróforo feroxamina e nanopartículas magnéticas e realizáronse ensaios de captura con *Yersinia enterocolitica* WC-A. Finalmente, determinouse a estrutura plana e a estereoquímica do tetrapéptido **cereusitin A** producido por *Bacillus cereus* RKHC-09 e detectouse e identificouse o complexo de Ga(III) de piscibactina nos sobrenadantes dos cultivos de *Vibrio anguillarum* RV22 e o mutante $\Delta vabF$.

Capítulo I

Neste capítulo fálase da importancia da acuicultura e a necesidade de desenvolver novos tratamentos para o control de infeccións producidas por bacterias patógenas. Ademais, descríbese de forma xeral o mecanismo de captación de ferro e as vantaxes de empregar proteínas de membrana externa receptoras de sideróforos como vacunas.

Preséntase a metodoloxía de clonaxe, expresión e purificación das proteínas recombinantes **FvtA** (receptor do sideróforo vancrobactina producido por *Vibrio anguillarum* RV22) e **FstC** (receptor dos sideróforos amonabactinas biosintetizados por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45). Adicionalmente, expresouse e purificó **rFstB** (receptor de acinetobactina producido por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45). Finalmente, móstranse os resultados obtidos ao ensaiar **rFvtA**, **rFstB** e **rFstC** como vacina en linguados infectados con vibriosis e forunculosis.

Capítulo II

Este capítulo está dedicado á aplicación de sideróforos e nanopartículas magnéticas para o desenvolvemento dun mecanismo de detección de bacterias. Descríbense as aplicacións dos sideróforos en diferentes campos xunto co proceso de deseño de nanomateriales magnéticos e a versatilidad destes para sintetizar conxugados para desenvolver aplicacións.

Descríbese a síntese do conxugado entre o sideróforo feroxamina e nanopartículas magnéticas funcionalizadas (MNP@SiO₂@NH@Fa), o seu caracterización e a súa capacidade de captura de *Yersinia enterocolitica* WC-A. Tamén, móstrase a síntese dun análogo de enterobactina que pode ser empregado para a síntese de conxugados.

Capítulo III

Neste capítulo faise unha breve introdución da importancia dos microorganismos mariños como produtores de produtos naturais, a súa actividade biolóxica e o seu gran diversidade estrutural. Tamén se expoñerán os métodos máis xerais para a selección de condicións para o cultivo e obtención de compostos producidos por bacterias principalmente.

Móstrase o proceso de elucidación estrutural do tetrapéptido cereusitin A producido *Bacillus cereus* RKHC-09 mediante experimentos de resonancia magnética nuclear mono e bidimensionales e análise de espectrometría de masas de baixa e alta resolución. Adicionalmente, determinouse a estereoquímica absoluta por medio do método de Marfey.

Finalmente mostrátese o proceso de detección do complexo de Ga(III) de piscibactina no sobrenadante de cultivo de *V. anguillarum* RV22 e o mutante $\Delta vabF$ por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

ABSTRACT

Abstract

This Doctoral Thesis is divided into three parts. The first part describes the importance of iron uptake systems in fish pathogenic bacteria and the use of siderophore-receptor proteins as potential vaccine candidates. In the second part, the synthesis of a conjugate of feroxamine siderophore and magnetic nanoparticles is shown as an attempt to create a new surface able to capture *Yersinia enterocolitica* WC-A. Finally, in chapter III the structural and stereochemical determination of the tetrapeptide **cereusitin A** is described as well as the detection and identification of the piscibactin-Ga(III) complex in the supernatants of the cultures of *Vibrio anguillarum* RV22 and its $\Delta vabF$ mutant. Furthermore, the piscibactin is shown as an important molecule in the iron uptake system and the virulence of *V. anguillarum*.

Chapter I

This chapter discusses the importance of aquaculture and the need to develop new treatments for the control of infections produced by pathogenic bacteria. In addition, the mechanism of iron uptake along with the advantages of using siderophores receptor outer membrane proteins as vaccines candidates is described broadly.

Here are presented the methodology of cloning, expression and purification of the recombinant proteins **FvtA** (receptor of the siderophore vanrobactin produced by *Vibrio anguillarum* RV22) and **FstC** (receptor of the siderophores amonabactin biosynthesized by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45). Additionally, the expression and purification of **rFstB** protein (acinetobactin receptor produced by *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45) is shown. Finally, the results obtained when testing **rFvtA**, **rFstB** and **rFstC** as a vaccine in flounders infected with vibriosis and furunculosis are presented.

Chapter II

This chapter is dedicated to the application of siderophores and magnetic nanoparticles to the study of a bacterial detection mechanism. The applications of siderophores in different fields are described along with the design process of magnetic nanomaterials and its versatility and capability in the conjugate synthesis to develop applications.

The synthesis of the conjugate of feroxamine and functionalized magnetic nanoparticles (MNP@SiO₂@NH@Fa), its characterization and capture capacity

towards *Yersinia enterocolitica* WC-A are described. Also, the synthesis of an enterobactin analogue that can be used for the synthesis of conjugates is shown.

Chapter III

In this chapter is made a brief introduction of the importance of marine microorganisms as producers of natural products, their biological activity and their great structural diversity. Also, the most general methods for the selection of culture conditions in the obtainment of compounds mainly produced by bacteria are exposed.

The structural elucidation process of the tetrapeptide **cereusitin A** produced by *Bacillus cereus* RKHC-09 is shown by mono and bidimensional nuclear magnetic resonance experiments as well as low and high resolution mass spectrometry analysis. Additionally, absolute stereochemistry was determined by means of the Marfey's method.

Finally, here is shown the procedure developed for the detection of piscibactin-Ga(III) complex from culture supernatant of *V. anguillarum* RV22 and its $\Delta vabF$ mutant by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS).

CONTENIDO

Contenido

Capítulo I	1
Introducción	1
1. La importancia de la acuicultura y el desarrollo de nuevas tecnologías en torno a ella	1
1.1. El papel del hierro y su relación con las bacterias patógenas	5
1.2. Mecanismo de captación de hierro mediante sideróforos en bacterias	8
1.3. Desarrollo de vacunas en la industria de la acuicultura	11
2. Objetivos	16
3. Discusión de resultados	17
3.1. Clonaje y expresión de las proteínas FvtA, receptora de vancrobactina en <i>Vibrio anguillarum</i> , y de FstC, receptora de las amonabactinas en <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	17
3.2. Escalado de la expresión de las proteínas recombinantes rFvtA, rFstB y rFstC para ensayos de vacunación.	23
3.3. Ensayos de vacunación con rFvtA	25
3.4. Ensayos de vacunación con rFstB y rFstC	27
4. Parte experimental	31
4.1. Metodología general.....	31
4.2. Metodología para el clonaje y expresión de rFvtA y rFstC.....	31
4.3. Escalado de cultivos y purificación de las proteínas rFvtA, rFstB y rFstC	36
5. Conclusiones	39
Capítulo II	42
Introducción	42
1. Aplicaciones de los sideróforos	42
1.1. Medicina y farmacología	42
1.2. Agricultura y biocontrol de patógenos	45
1.3. Industria de los alimentos.....	46
1.4. Aplicaciones en biorremediación y biodegradación	46
2. Aplicaciones de los sideróforos en la detección bacteriana	47

2.1.	Nanopartículas magnéticas y síntesis de conjugados	47
2.2.	Requerimientos para la funcionalización de MNPs.....	48
2.1.	Métodos de funcionalización de superficie.....	51
2.2.	Mecanismos de funcionalización.....	52
2.3.	Materiales usados para la funcionalización de MNPs.....	53
2.4.	Bioconjugación	57
2.5.	Aplicaciones de las MNPs.....	60
3.	Objectives	65
4.	Results and Discussion	66
4.1.	Surface modification and characterization	66
4.2.	Bacteria capture studies.....	73
4.3.	Synthesis of an enterobactin analogue	76
5.	Experimental Section	78
5.1.	Synthesis.....	78
5.2.	Characterization	80
5.3.	Bacterial capture study with <i>Y. enterocolitica</i> WC-A strain	81
5.4.	Evaluation of bacteria- nanoparticle interaction	81
5.5.	Synthesis of an enterobactin analogue	83
6.	Conclusiones	89
Capítulo III	90
Introducción	90
1. Estudio químico de bacterias marinas.	90
1.1.	Ejemplos de microorganismos marinos como productores de compuestos ..	91
1.2.	Producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo de microorganismos marinos asociados a invertebrados	96
2. Objetivos	100
3. Discusión de resultados	101
3.1.	Estudio químico de <i>Bacillus cereus</i> RKHC-09	101
3.2.	Detección de piscibactina en <i>Vibrio anguillarum</i> RV22 y el mutante $\Delta vabF$	112

CONTENIDO

4. Parte experimental	116
4.1. Metodología general.....	116
4.2. Condiciones de cultivo de <i>Bacillus cereus</i> RKHC-09.....	116
4.3. Extracción.....	117
4.4. Purificación del cereusitin A	117
4.5. Determinación de la estereoquímica absoluta por el método de Marfey	117
4.6. Detección de piscibactina por LC/HR-MS	118
5. Conclusiones	119
Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.
Bibliografía	121

CAPÍTULO I

**Proteínas recombinantes y
desarrollo de vacunas**

Capítulo I

Introducción

1. La importancia de la acuicultura y el desarrollo de nuevas tecnologías en torno a ella

El pescado es un alimento recomendado para mantener una dieta saludable y equilibrada. Gracias a su aporte proteico suministra aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales como calcio, fósforo y hierro, además de los ácidos grasos omega-3 y omega-6, lo que lo hace un alimento recomendado para la prevención de enfermedades cardiovasculares.¹

En los últimos 50 años se ha llevado a cabo una revolución en el mundo de la pesca, ya que en la actualidad la acuicultura supera a la pesca tradicional y sigue en crecimiento (Figura 1). Aunque esa técnica ha sido utilizada durante miles de años, solamente desde la década de los 70 ha jugado un rol importante en la producción mundial.²

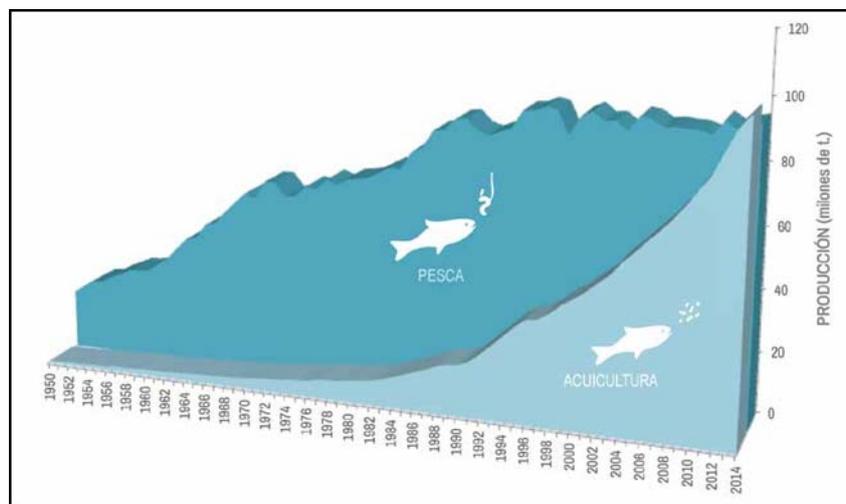


Figura 1. Comparación de la producción pesca tradicional/acuicultura de 1950 a 2014.³

Las piscifactorías surgen como una solución al crecimiento de la demanda de global de pescado, requiriéndose un constante control de enfermedades y parásitos, por lo que es necesario incrementar tanto los estándares de calidad alimentaria, medioambientales y de protección de las poblaciones de peces salvajes.²

La industria de la acuicultura se sirve tanto de grandes multinacionales de la agricultura, como de pequeñas empresas especializadas en el suministro de

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

suplementos nutricionales y productos químicos y que complementan las necesidades de esta industria. Estas empresas dedican importantes esfuerzos en la investigación de fuentes alternativas de la alimentación, de aditivos que puedan mantener la buena salud de los peces y del desarrollo de vacunas que puedan prevenir enfermedades prevalentes en peces.²

En España en el año 2014 esta industria ha sufrido un incremento del 26.2% con respecto a años anteriores, convirtiéndose en el país con mayor producción en la Unión Europea: 282.242 toneladas que representan el 22% de la producción total de la UE, con un total de 450 millones de euros que corresponde a un 10.2% del valor total de la producción de la UE. España destaca en la producción de trucha arco iris, mejillón europeo, dorada, lubina, lenguado y rodaballo. Cabe destacar que Galicia es la comunidad autónoma donde es producido el 98.6% de rodaballo.³

Teniendo en cuenta estos valores, este recurso natural no solo tiene importancia a nivel de alimentación sino también a nivel económico, por lo que, el reto para Galicia consiste en asegurar el aumento de la productividad manteniendo una excelente calidad mediante el desarrollo e implementación de nuevas tecnologías.

Principales enfermedades por infecciones bacterianas en peces de acuicultura

Las infecciones bacterianas son uno de los factores que generan mayor mortalidad, produciendo importantes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura. La virulencia de aquellas que son patógenas determina su nivel de importancia en cuanto al potencial para generar una enfermedad. La virulencia se puede definir como el deterioro de la salud por efecto de una infección bacteriana en un huésped. Como en todas las industrias de producción animal, en las piscifactorias se generan las condiciones adecuadas para el desarrollo de patógenos altamente virulentos.⁴ Entre las enfermedades relacionadas con bacterias patógenas que más pérdidas originan en la industria de la acuicultura se encuentran la vibriosis, la forunculosis, la pseudotuberculosis y la yersiniosis. A continuación, se describe con mayor detalle estas enfermedades y las bacterias causantes de las infecciones.

- **Vibriosis**

La vibriosis es una enfermedad septicémica hemorrágica mortal que afecta a algunas especies de peces tanto de agua dulce como de agua salada. Entre las más importantes en la industria de la acuicultura se encuentran el salmón del Pacífico y

Atlántico (*Oncorhynchus* spp. y *Scophthalmus salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), lubina rayada (*Morone saxatilis*), bacalao (*Gadus morhua*), anguila japonesa (*Anguilla japonica* y *Anguilla anguilla*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), bivalvos y crustáceos.⁵

La infección es generada principalmente por *Vibrio anguillarum*, un patógeno que se aloja principalmente en sangre y en el tejido hematopoyético. La enfermedad asociada es detectada cuando se observa pérdida de peso, letargo en el comportamiento de los peces, manifestación de puntos rojos tanto en vientre como en áreas laterales del pez, hinchazón y oscurecimiento de la piel que puede ulcerar y generar sangrado.⁶ Durante varios años, los antibióticos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de la vibriosis, pero su uso ha generado tanto resistencia por parte del patógeno como contaminación del medio acuático y del propio pez que deja de ser adecuado para el consumo humano. Hoy en día, para minimizar el uso de antibióticos se están usando otros tratamientos como el uso de péptidos antimicrobianos, probióticos y el uso de vacunas e inhibidores de *quorum sensing*.⁶

- Forunculosis

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* es la bacteria patógena causante de la forunculosis, afectando principalmente a salmónidos, trucha, rodaballo, dorada, especies de agua dulce y salada.^{5,6} Se desarrolla como una hemorragia septicémica aguda, normalmente acompañada de necrosis licuefactiva, mostrándose en casos severos, ulceraciones profundas.⁵

La bacteria se disemina en el agua por contaminación cruzada cuando un pez de granja escapa e infecta a peces salvajes, siempre que un hospedador sobreviva a la infección y permanezca cerca de individuos que no contrajeran la infección o por huevos contaminados. Hoy en día las epidemias de forunculosis se encuentran muy controladas en Noruega gracias a la introducción en 1993 de vacunas.⁷ En Galicia en 1992 fue diagnosticada por primera vez en rodaballo cultivado en jaulas flotantes localizadas cerca de cultivos de salmónidos, y empezó a convertirse en un problema importante a partir de 1999, debido a la alta mortalidad y al rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos.⁸

Entre los tratamientos desarrollados para el tratamiento de esta enfermedad, desde 1980 se utilizan numerosas vacunas procedentes de células inactivadas del patógeno

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

denominadas bacterinas, que se pueden suministrar mediante inyección, inmersión o vía oral. Este tratamiento resulta muy eficaz durante largos periodos, en salmónidos mientras que la eficacia es prácticamente nula en rodaballo. Actualmente, se están estudiando tanto nuevas vacunas como otras estrategias en inmunización para el tratamiento y prevención de la forunculosis en rodaballo.⁵

- **Fotobacteriosis (Pseudotuberculosis)**

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* antes conocida como *Pasteurella piscicida* es una bacteria Gram-negativa, que fue aislada por primera vez en 1963 en perca blanca (*Morone americanus*) y lubina rayada (*Morone saxatilis*) en la bahía de Chesapeake (EE. UU.).⁹ Inicialmente la enfermedad se conocía como pasteurelosis y debido al cambio de clasificación taxonómica se paso a denominar fotobacteriosis y es también conocida como pseudotuberculosis, ya que se caracteriza por la presencia de nódulos blancos en varios órganos internos, particularmente, bazo y riñón. La mayor tasa de mortalidad producida por esta bacteria se observa cuando la temperatura del agua está entre 18 y 20 °C, y se ha observado que por debajo de esta temperatura, la infección puede permanecer de manera asintomática durante largos periodos de tiempo.¹⁰

Los síntomas de la infección son difíciles de detectar puesto que no se generan lesiones superficiales. Sin embargo, se observa un aumento en la frecuencia respiratoria, letargo, hemorragias en la base de las aletas, agrandamiento de hígado y riñón, aparición de gránulos principalmente constituidos por bacterias, células epiteliales y fibroblastos, los cuales al romperse se diseminan por el organismo resultando en una septicemia hemorrágica.^{5,11}

El primer brote de fotobacteriosis detectado en España ocurrió en 1990 en alevines de dorada (*Sparua aurata*) en una piscifactoría localizada en la Ría de Arosa, siendo ahora la patología más frecuente de lubinas y doradas de los países mediterráneos.¹² El tratamiento de esta enfermedad consiste en la utilización de antibióticos como el ácido oxolínico, la flumequina, la nitrofurantoína y la oxitetraciclina, los cuales son suministrados tras la aparición de los signos clínicos. La aparición de cepas resistentes de la bacteria tuvo como consecuencias que los antibióticos mencionados sean ineficaces, por lo que el tratamiento conjunto mediante la administración de sueros y vacunas suele ser la mejor alternativa para la prevención de la enfermedad.¹³

- **Yersiniosis**

La yersiniosis o “enfermedad de la boca roja”, es una infección producida por *Yersinia ruckeri* afectando a diferentes variedades de peces principalmente a salmónidos, siendo la trucha arcoíris una de las especies más susceptible de infección.¹⁴

Y. ruckeri fue aislada por primera vez en la década de los 50 en Estados Unidos a partir de ejemplares enfermos de trucha arcoíris, y desde entonces se ha ido diagnosticando en el resto de Norte América, Australia, Europa y Sudáfrica. Aunque la enfermedad ataca a los peces en cualquier edad, el aumento en la mortalidad se observa en ejemplares jóvenes. La enfermedad no tiene una sintomatología específica, aunque se suele observar un cambio en el comportamiento en el pez infectado al nadar más cerca de la superficie, letargo o falta de apetito. Normalmente la infección da lugar a hemorragias alrededor de la cavidad bucal, escamas y órganos internos.

Para el tratamiento de esta enfermedad se han desarrollado diversos antibióticos, inmunoestimulantes, probióticos y vacunas. Sin embargo, las medidas preventivas como el aislamiento de los portadores y el mantenimiento de buenas condiciones de higiene ha resultado ser muy eficaz.¹⁴

1.1. El papel del hierro y su relación con las bacterias patógenas

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de organismos, participando en múltiples procesos esenciales para la vida como el transporte de oxígeno, la respiración, transferencia de electrones, en la síntesis y reparación de ADN y en los procesos involucrados en el metabolismo primario.¹⁵⁻¹⁷ Multitud de enzimas en el metabolismo secundario y en respuesta al estrés oxidativo necesitan de hierro como co-factor. El hierro se encuentra en estado de oxidación +2 y +3 en sistemas biológicos, pasando por estados de oxidación más altos en procesos de catálisis enzimática.^{18,19}

Los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de captación de hierro. Los procariotas requieren concentraciones micromolares de hierro para replicación y colonización, enfrentándose a un reto metabólico importante dado la muy baja solubilidad del Fe^{3+} a pH neutro en concentraciones de 10^{-18} M.²⁰ Para adquirir la cantidad de hierro necesaria para sobrevivir en ambientes con deficiencia de

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

nutrientes, han desarrollado una gran variedad de estrategias para adquirir el hierro.¹⁶ Una de las más empleadas por la bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas es las producción de sideróforos. Por lo que la capacidad de obtención del hierro a partir del hospedador es uno de los mecanismos de virulencia más importante de los patógenos bacterianos.²¹

Sideróforos

Los sideróforos constituyen una familia de compuestos de bajo peso molecular, generalmente en un rango de 600 a 1500 Da que son capaces de complejar hierro con una gran afinidad (constante aproximada de 10^{30} M^{-1}). Poseen grupos funcionales con átomos donadores de electrones, uniéndose al hierro formando complejos hexacoordinados. Aunque existe una gran variedad de sideróforos, la mayoría tienen en común la presencia de péptidos constituidos por aminoácidos no proteinogénicos y D-aminoácidos.²¹ Para algunos microorganismos, la producción de sideróforos está directamente relacionada con la virulencia.²² Además los genes para su biosíntesis se encuentran en algunos casos en plásmidos que facilitan su transferencia horizontal.²³

Los grupos encargados de formar el complejo de Fe^{3+} se clasifican en tres tipos principales: hidroxámicos, catecoles e α -hidroxiácidos. Muchos sideróforos son mixtos, es decir, contienen uno o dos de los tres tipos (Figura 2.).^{24,25} A continuación, se describen algunos sideróforos que presentan las características de cada tipo de estructura.

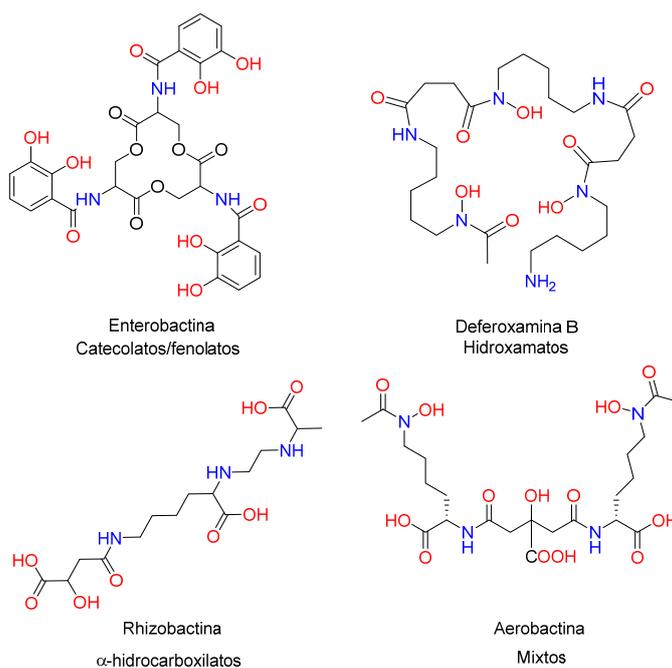


Figura 2. Ejemplos de tipos de sideróforos

Enterobactina (Figura 2), aislada inicialmente de *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*,^{26,27} es producida por varias especies de bacterias, y es el ejemplo clásico de sideróforo tipo catecol. La biosíntesis comienza con la síntesis del ácido 2,3-dihidroxibenzoico, que es unido a una unidad de serina por medio de una péptidosintetasa no ribosomal (NRPS, *nonribosomal peptide synthetase*), uniéndose posteriormente tres unidades por acción de una fosfopantetionil L-transferasa.²⁴

La deferoxamina B (DFO, Figura 2) es un sideróforo lineal que pertenece al grupo de los hidroxamatos. Se produce a gran escala por fermentación del *Streptomyces pilosus* A21784 y es comercializada como mesilato (Desferal® Novartis Inc.).²⁵ En este tipo de sideróforos, la deslocalización de la carga y su consecuente conjugación, incrementa al mismo tiempo la densidad electrónica sobre el oxígeno y su afinidad por el Fe^{3+} . Dentro de este grupo también se encuentran los ferricromos, coprogenos y fusarinas.²⁸ La biosíntesis de este tipo de sideróforos se caracteriza por la incorporación de los aminoácidos ornitina, glicina, lisina y serina, los cuales pueden sufrir variaciones debido a los sistemas enzimáticos de péptidos no ribosomales como la introducción de citrato.²⁸

Los sideróforos tipo α -hidroxicarboxilato como la rizobactina (Figura 2), son altamente selectivos al Fe^{3+} por su elevado pK_a , ya que este compite fácilmente por los protones de las funciones alcóxido en comparación con otro tipo de cationes. Son biosintetizados a partir de citrato, o por hidroxilación de aspartato por mediación de dioxigenasas.²⁸

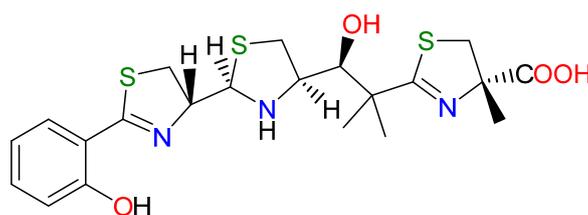


Figura 3. Estructura del sideróforo yersiniabactina producida por *Yersinia pestis*.

Existen variaciones que dan como resultado sideróforos que contienen anillos heterocíclicos de 5 miembros tipo tiazolinas y oxazolinas, a partir de la ciclación de los aminoácidos cisteína, serina o treonina. Algunas veces las tiazolinas son reducidas a tiazolidinas, cuya conversión tiene una influencia crítica en la estereoquímica de la molécula, como en el caso de yersiniabactina (Figura 3).²⁸

1.2. Mecanismo de captación de hierro mediante sideróforos en bacterias

Bacterias Gram-negativas

La mayoría de los estudios realizados en sistemas de captación de Fe^{3+} han sido enfocados hacia bacterias entéricas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Sus paredes celulares están constituidas por una membrana externa y una capa de peptidoglicano, actuando como un tamiz molecular permitiendo además su estabilidad mecánica. Esto es muy importante ya que el citoplasma se encuentra protegido tanto de la acción de sales biliares como de las enzimas hidrolíticas presentes en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. La membrana externa consiste en una bicapa lipídica, rica en lipopolisacáridos y porinas, confiriéndole una permeabilidad adecuada frente a moléculas hidrofílicas pequeñas. La región entre la membrana externa y el citoplasma se denomina espacio periplasmático y contiene aproximadamente el 20% del total de agua en la célula.²⁸

En general, los complejos sideróforo-Fe(III) poseen tamaños superiores a los 600 Da, lo que impide su paso a través de las porinas, requiriendo, por tanto, un mecanismo de transporte de proteínas específico dependiente de energía. Estos transportadores tienen una alta afinidad por los complejos sideróforo-Fe(III) dado que este mecanismo se activa solo cuando los niveles de hierro son bajos, requiriendo una concentración de este entre 1-50 nM para ser llevados desde el receptor hasta el espacio periplasmático. Desde aquí los complejos se unen a proteínas periplasmáticas (PBP, *periplasmic binding protein*) que son transportadas hacia la membrana citoplasmática, para finalmente ser llevadas hacia el interior del citoplasma por transportadores del tipo ABC. Una vez el complejo se encuentra en el citoplasma, el Fe^{3+} se puede liberar mediante una reducción a Fe^{2+} o por degradación del sideróforo (Figura 4).²⁹

Este mecanismo puede sufrir una variación, como en el caso de la pioverdina, sideróforo de la bacteria *Pseudomonas aureginosa*. El complejo sideróforo-Fe(III) es reconocido y transportado al espacio periplasmático por un receptor específico. Una vez en el periplasma, se libera el Fe^{3+} mediante una reducción sin modificación química del sideróforo. El Fe^{2+} es posteriormente transportado al citoplasma por un transportador tipo ABC y el sideróforo se recicla mediante una bomba de expulsión para repetir el ciclo (Figura 4).³⁰

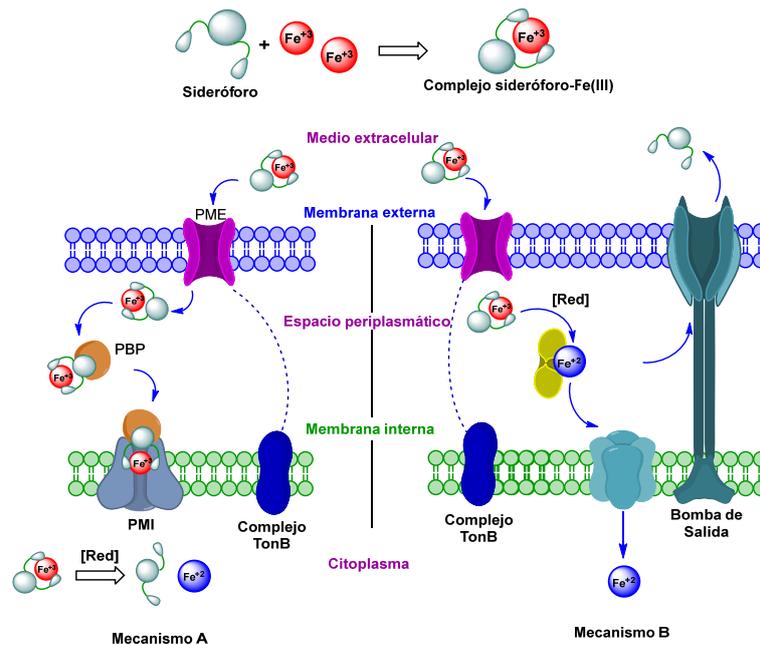


Figura 4. Mecanismos de transporte de hierro mediante sideróforos en bacterias Gram-negativas. PME: proteína de membrana externa, PMI proteína de membrana interna, PBP Proteínas periplásmica de unión (*periplasmic binding protein*) Red: reducción.

Bacterias Gram-positivas

Hay pocos estudios referentes a los mecanismos de captación de hierro en bacterias Gram-positivas. La mayoría de las investigaciones en este tipo de bacterias se han enfocado en *Bacillus subtilis*.³¹⁻³⁴ Las bacterias Gram-positivas no poseen membrana externa y su sistema de captación es similar al que se encuentra en la membrana interna de una Gram-negativa. Una lipoproteína que se encuentra unida a la membrana hace el papel de la PBP.³³ Estas lipoproteínas interactúan con transportadores tipo ABC y comparten similitudes estructurales con las PBPs.³⁵

Proteínas receptoras de sideróforos

De una manera general, las proteínas receptoras de los complejos sideróforo-Fe(III) están constituidas por 22 laminas- β que forman una estructura tipo barril a través del cual se transporta el complejo. Se caracterizan por presentar *loops* periplásmicos cortos y extracelulares largos que se pueden extender 40 Å por encima de la superficie de la membrana. Los *loops* extracelulares han mostrado ser de gran importancia para el reconocimiento del complejo sideróforo-Fe(III) además de prevenir la entrada de especies no deseadas.³⁶ Otra particularidad de estos receptores es que el extremo N-terminal actúa como un tapón y se caracteriza por una secuencia conservada de siete aminoácidos localizados en el extremo N-terminal (Figura 5A, caja TonB en el interior

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

del barril, color rojo), que se denomina caja TonB. Cuando el complejo sideróforo-Fe(III) es reconocido por su proteína receptora, éste se une a la hélice- α de la caja TonB provocando un cambio conformacional. Para liberar el sideróforo en el periplasma es necesario revertir ese cambio conformacional, para lo cual el complejo TonB proporciona la energía necesaria. Por esta razón esas proteínas son conocidas como transportadores dependientes de TonB (*TonB-Dependent Transporters*, TBDTs).^{36–38}

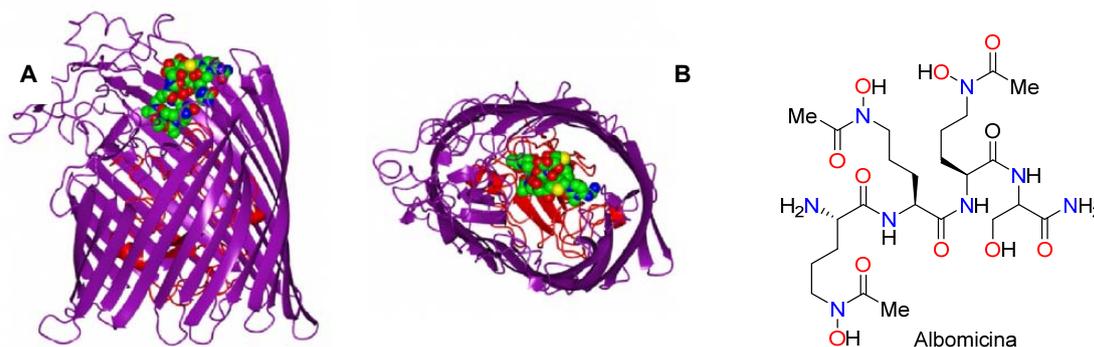


Figura 5. A. Complejo del receptor de ferrihidroxamato FhuA³⁷ con el complejo albomicina-Fe(III) B. Albomicina.

Complejo TonB

El complejo TonB está formado por tres proteínas: TonB, ExbB y ExbD. La proteína TonB interactúa con ExbB y ExbD localizadas en la membrana citoplasmática, mientras el extremo C-terminal de TonB se extiende por el periplasma y se conecta a la caja TonB de la proteína receptora. El complejo TonB es un “transportador de energía metabólica”, transfiriendo la energía desde la membrana citoplasmática hasta la membrana externa. El mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso aún no se encuentra claramente descrito puesto que, al parecer, involucra varios cambios de conformación. Los genes para TonB se han identificado en 65 géneros de bacterias Gram-negativas y, algunas poseen diferentes proteínas TonB.³⁹

Proteínas periplásmicas de unión (PBPs).

Las PBPs son las proteínas encargadas de unirse a los complejos sideróforo-Fe(III), una vez que han pasado a través del receptor al periplasma. Existen diferentes tipos de PBPs uniéndose a los complejos metálicos, incluyendo los complejos sideróforo-Fe(III) (FepB, FhuD, CeuE etc.) y la vitamina B₁₂ (BtuF). Las secuencias de PBP tienden a ser muy variables, con un porcentaje de similaridad solo del 10%.⁴⁰ Sin embargo, en general su forma nativa es muy similar, inclusive su estructura terciaria.

En muchas PBPs de catecolatos férricos se conservan residuos de arginina que originan una región cargada positivamente que atraen a los complejos de hierro de catecolatos que están cargados negativamente. En el caso de sideróforos tetradentados que no se coordinan completamente con el Fe^{3+} , la PBP CeuE de *Campylobacter jejuni* es capaz de completar la esfera de coordinación por la presencia de residuos de tirosina e histidina (Figura 6).⁴¹ Por otra parte, no todas las PBPs poseen los mismos residuos de aminoácidos en el sitio de unión, por ejemplo, FepB de *E. coli* no presenta residuos de tirosina, arginina o histidinas.³⁵

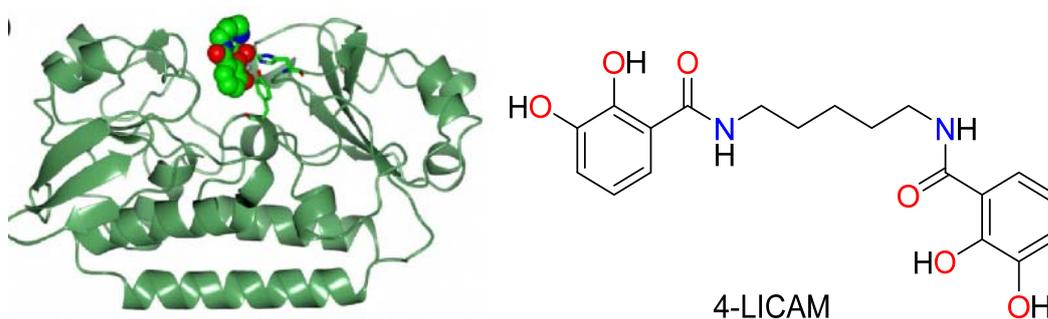


Figura 6. Proteína de periplásmica de unión *CeuE* de *Campylobacter jejuni* interactuando con el complejo 4-LICAM-Fe(III).⁴¹

Transportadores ABC (ATP Binding Cassette)

Un vez el complejo sideróforo-Fe(III) se ha unido a la PBP, y es transportado hacia la membrana citoplasmática, debe atravesar la membrana interna para llegar al citoplasma. Este paso es llevado a cabo por los transportadores ABC. Estos realizan simultáneamente la hidrólisis de ATP y el transporte del sustrato a través de la membrana interna. Muchos transportadores ABC consisten en cuatro dominios estructurales, dos transmembrana que forman un canal por el que atraviesa el sustrato y dos de unión a ATP.⁴⁰ Los transportadores ABC son un conjunto de proteínas ensambladas y sus componentes están codificados como proteínas individuales. Hasta la fecha solo han sido completamente caracterizados los transportadores BtuC₂D₂ y el transportador putativo de molibdato ModB₂C₂.^{42,43}

1.3. Desarrollo de vacunas en la industria de la acuicultura

La industria de la acuicultura demanda vacunas seguras y efectivas para la prevención de enfermedades. Recientemente, la producción de productos biológicos para peces se ha desarrollado a partir de fabricantes locales que se han convertido en empresas especializadas. Una vacuna debe ser segura, eficaz, rápida de desarrollar y

registrar, y de fácil administración en un número de dosis suficiente a bajo coste. Por lo que, dependiendo del patógeno de interés, debe diseñarse de tal manera que proporcione la mejor relación de estos factores. El uso de proteínas recombinantes tiene la ventaja de que, normalmente, su producción puede realizarse en diferentes sistemas de expresión (bacterias, levaduras, células de insectos, etc.), su cultivo y escalado es más sencillo, y no se trabaja directamente con el organismo causante de la enfermedad, lo cual se traduce en una reducción de los costes de producción tras superar las etapas iniciales de investigación.⁴⁴ Las vacunas diseñadas para peces se dividen en tres categorías: vacunas vivas (atenuadas o replicantes), vacunas inactivadas (no replicantes) y vacunas génicas (ADN).⁴⁴

- **Vacunas vivas:** Son bacterias capaces de replicarse sin producir la infección. Aunque son las más eficaces, puesto que simulan la infección natural y activan el sistema inmune. Tienen mayor número de efectos adversos y existe el riesgo de que la bacteria recupere su virulencia.
- **Vacunas inactivadas:** Están constituidas por bacterias inactivadas (bacterinas) o por una subunidad recombinante. Este tipo de vacunas son más seguras en comparación con las vacunas vivas, pero presentan menor protección por lo que deben usarse en concentraciones más altas junto con refuerzos.
- **Vacunas génicas:** Este tipo de vacunas emplean uno o varios genes que codifican para los antígenos deseados. Generalmente, es un constructo formado por genes derivados del patógeno, diseñado específicamente para que se sintetice la proteína encargada de producir la respuesta inmune.

Las proteínas receptoras de sideróforos, al encontrarse en la membrana externa de las bacterias, se consideran como un agente inmunogénico potencial (antígeno) y por lo tanto se pueden usar en el desarrollo de nuevas vacunas. El estudio del proteoma de *Acinetobacter baumannii*, junto con una aproximación *in silico* para determinar los epítomos y su respuesta frente a células T del sistema inmune, determinó que la proteína receptora del complejo de Fe³⁺ feroxamina B FhuE es una buena candidata para el desarrollo de una vacuna.⁴⁵

Las proteínas receptoras de sideróforos son expresadas en deficiencia de hierro y se consideran un factor de virulencia importante, siendo capaces de generar una respuesta inmune en el organismo del hospedador. El uso de estos receptores como vacunas potenciales se ha comprobado en algunos estudios: a) el uso del receptor

iroN generó protección frente a *Salmonella entérica* en pollos; b) el receptor FyuA de yersiniabactina, confirió protección frente a cepas uropatógenicas de *E. coli* en modelo de ratón; y la proteína TdrA (TonB-dependent receptor A) de *Pseudomonas fluorescens* rindió respuesta inmunogénica en lenguado obteniéndose una fuerte protección frente a este patógeno.⁴⁶⁻⁴⁹

Recientemente, en la Universidad de Ciencia y Tecnología de China del Este (Shanghai) se ha desarrollado una vacuna viva atenuada para la prevención de vibriosis en pez tigre. Los resultados de este estudio revelaron que la vacuna fue capaz de generar protección en especímenes jóvenes siguiendo la producción de anticuerpos sin alterar su crecimiento, obteniendo una tasa de supervivencia del 90.7 y 80.3 en peces jóvenes y adultos respectivamente.⁵⁰

En nuestro grupo de investigación, y como uno de los objetivos de la Tesis Doctoral de la Dra. Katherine Valderrama se obtuvo la proteína recombinante rFrpA receptora de piscibactina en *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*. Los ensayos de vacunación en lenguado mostraron una supervivencia del 74%, resultado similar al uso de la bacterina en donde se alcanzó un 80%. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de las proteínas de membrana externa receptoras de sideróforos es un camino adecuado para el desarrollo de vacunas efectivas para la prevención de las enfermedades que más problemas y pérdidas causan en piscifactorías.^{51,52}

FvtA proteína receptora de vancrobactina en *Vibrio anguillarum*

Vibrio anguillarum posee una disposición específica de factores de virulencia que le permite causar vibriosis en diferentes variedades de animales marinos (Figura 7).⁵ Existen más de 20 serotipos reconocidos, sin embargo, los serotipos O1 y O2 son los que están directamente implicados en los brotes de la infección.⁵³ Nuestro grupo de investigación logró determinar el segundo sideróforo implicado en el sistema de captación de hierro que denominamos vancrobactina (Vb).⁵⁴ Puesto que se conoce que la habilidad para captar hierro por medio de sideróforos contribuye significativamente a la virulencia de esta bacteria, se ha estudiado el sistema de captación de hierro mediado por vancrobactina, en donde se determinó que la proteína de membrana FvtA es la encargada de su reconocimiento específico.⁵³⁻⁵⁶



Figura 7. Lubina infectada por *Vibrio anguillarum*, presenta sangrado en externo en piel y agallas, distensión de estómago y ojos fuera de sus orbitas. (Imagen obtenida en http://www.vetcare.gr/ARTPRES/pics_vibriosis_lesions.htm 19/03/2018)

FstC proteína receptora de amonabactinas en *Aeromonas salmonicida*

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* es la bacteria causante de la forunculosis (Figura 8), enfermedad responsable de importante pérdidas económicas de piscifactorías de salmónidos de agua dulce y salada, y que también es capaz de afectar a otras especies.⁵ El análisis del genoma de *A. salmonicida* reveló la presencia de dos *clusters* de genes involucrados en la síntesis de sideróforos. Uno de ellos corresponde a la síntesis de acinetobactina, sideróforo producido también por el patógeno humano *Acinetobacter baumannii*, mientras que el segundo mostró similitud con los genes que codifican para la síntesis de amonobactinas en *Aeromonas hydrophila*. Lo anterior, fue determinando en un estudio realizado en nuestro de grupo de investigación, en donde se emplearon una combinación de análisis genómicos, mutagénesis, ensayos biológicos, purificación química y determinación estructural, demostrando que varias cepas de *A. salmonicida* subsp *salmonicida* producen simultáneamente los dos tipos de sideróforos. Adicionalmente, estos genes codifican para los respectivos receptores de membrana externa FstB y FstC.^{54,57}

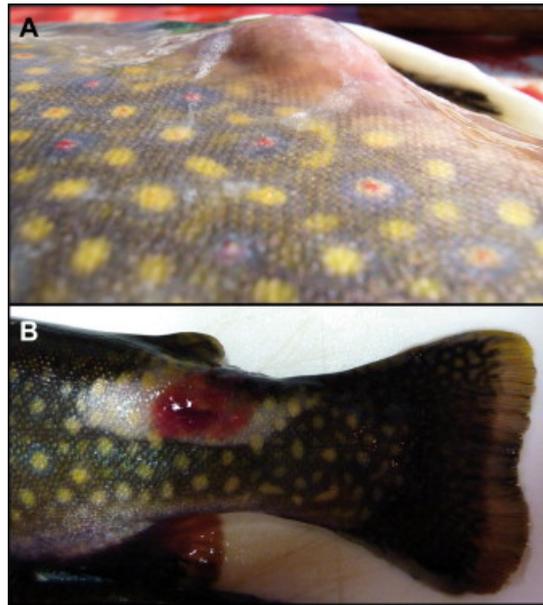


Figura 8. Sintomatología de la infección con *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. **A.** Forúnculo en la piel del pez infectado. **B.** Hinchazón alrededor de la lesión, secreción de sangre y tejido necrótico.⁵⁸

Teniendo en cuenta estos precedentes, y dando continuación al estudio de las proteínas de membrana externa para su aplicación como vacunas en la industria de la acuicultura se plantearon los objetivos descritos a continuación.

2. Objetivos

Debido a que las infecciones causadas por las bacterias patógenas *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* son responsables de grandes pérdidas económicas de las granjas de acuicultura, junto con el hecho de que el empleo de agentes antimicrobianos y tratamientos tradicionales como los antibióticos promueven la aparición de cepas resistentes y con la consiguiente pérdida de efectividad, se hace necesario el desarrollo de medidas de prevención efectivas como son vacunas y de tratamientos con mejores agentes antimicrobianos. En el informe del año 2018 del Comité de Disponibilidad de Medicamentos Veterinarios (CODI-VET) del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, indica que es una prioridad.⁵⁹

Se definen como objetivos específicos la obtención de las proteínas recombinantes de membrana receptoras de los siguientes sideróforos:

- a. Vancrobactina procedente de *Vibrio anguillarum* a la que denominaremos rFvtA
- b. Acinetobactina procedente de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, a la que denominaremos rFstB
- c. Amonabactinas procedentes de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, a la que denominaremos rFstC

Para alcanzar estos objetivos específicos se propone:

- Realizar el clonaje, expresión y purificación de las proteínas FvtA y FstC en *E. coli*, y su posterior purificación y caracterización.
- Conseguir la expresión y purificación de rFstB.
- Probar rFvtA contra *V. anguillarum*, rFstB y rFstC contra *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* respectivamente en ensayos de vacunación.

3. Discusión de resultados

3.1. Clonaje y expresión de las proteínas FvtA, receptora de vanrobactina en *Vibrio anguillarum*, y de FstC, receptora de las amonabactinas en *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

3.1.1. Clonaje en el plásmido pET20b(+)

Para el clonaje y expresión de las proteínas recombinantes se empleó el plásmido pET20b(+) (Figura 9) un vector de 3716 pares de bases. Los genes correspondientes a cada proteína se clonaron bajo el control del promotor T7 que cataliza la síntesis de ARN y la secuencia pelB líder que se une al extremo N-terminal de la proteína recombinante para que, una vez sintetizada, sea transportada al periplasma. De esta manera se aumenta el rendimiento de proteínas tóxicas, puesto que se alojan fuera del citoplasma, y generalmente incrementa la estabilidad de las proteínas producidas. El gen de la proteína insertada se encuentra a continuación del promotor de inducción por IPTG (β -D-1-tiogalactopiranósido de isopropilo) para obtener la proteína recombinante con una cola de 6 histidinas (6-His-tag) que permite su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.⁶⁰

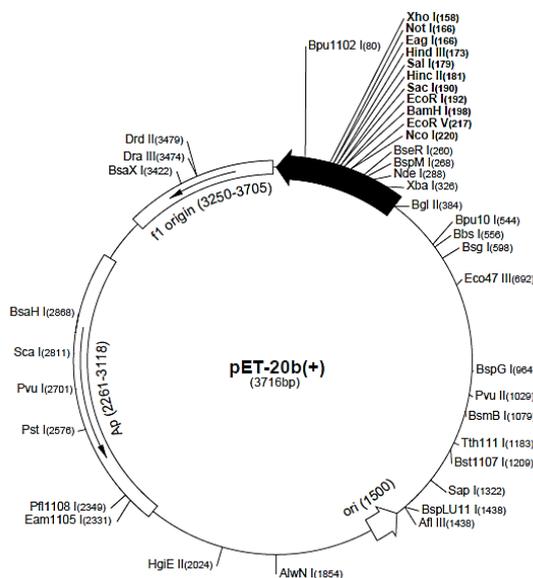


Figura 9. Mapa del plásmido pET20b(+) (imagen obtenida de http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-20b_map.pdf)

Para la expresión de FvtA y FstC se prepararon constructos empleando las enzimas de restricción NcoI y XhoI para FvtA y BamHI y XhoI para FstC. Los fragmentos se amplificaron suprimiendo la secuencia señal a partir de ADN genómico de las cepas

CAPITULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Vibrio aguilarrum RV22 y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* VT45 mediante primers diseñados para generar dos constructos: el primero con el 6-His-tag en el extremo C-terminal eliminando el codón de terminación y el segundo con el 6-His-tag en el extremo N-terminal insertando las histidinas al inicio de la secuencia.

La posición del 6-His-tag se debe tener cuenta para la expresión de este tipo de proteínas, puesto que para estudios de cristalización se requiere una alta concentración de proteína en su forma nativa, y esto solo es posible si la proteína es direccionada y plegada correctamente en la membrana externa.⁶¹ En nuestro caso las proteínas obtenidas serán empleadas para ensayos de vacunación y no es necesario que la proteína total esté en su forma nativa.

Una vez obtenidos los constructos pET20b(+)-N6His-FvtA, pET20b(+)-C6His-FvtA, pET20b(+)-N6His-FstC, pET20b(+)-C6His-FstC se transformó en *E. coli* Top10 para la su propagación y por medio de PCR de colonia se comprobó la presencia de los fragmentos insertados (Figura 10). En el caso de pET20b(+)-N6His-FvtA (1962 pb) se seleccionó la cepa transformada N2 (Figura 10A), pET20b(+)-C6His-FvtA (2082 pb) se seleccionó C1, para pET20b(+)-C6His-FstC se seleccionó la colonia C1 (2109 pb) (Figura 10B) y para pET20b(+)-N6His-FstC se seleccionó la colonia N2 (2130 pb) (Figura 10B). Cada cepa seleccionada fue conservada a -80°C para posteriormente preparar cultivos saturados para la extracción de ADN plásmidico, el cual fue secuenciado para confirmar que cada secuencia era la correcta.

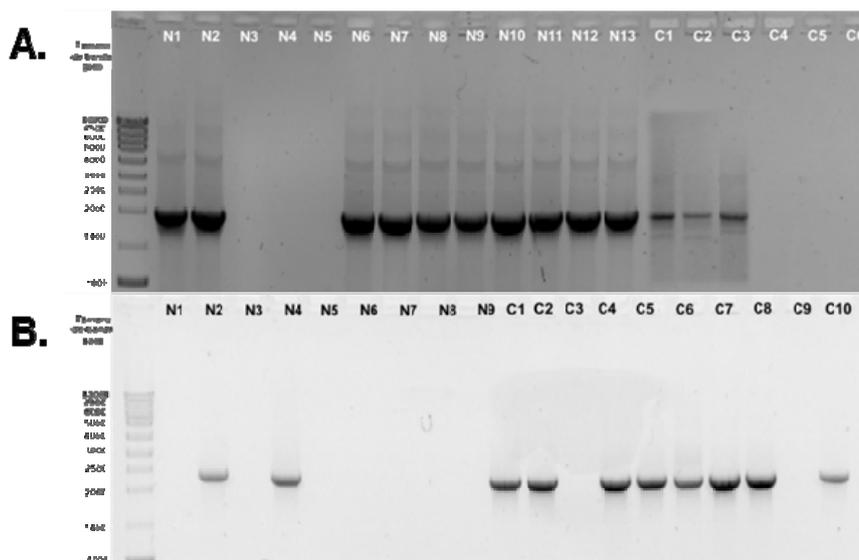


Figura 10. A. Gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para identificar las colonias que contienen el plásmido pET20b(+)-FvtA **B.** Gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para identificar las colonias que contienen el plásmido pET20b(+)-FstC.

3.1.2. Selección del sistema de expresión

Para la expresión se transformaron las cepas *E. coli* BL21(DE3) y BL21 C43(DE3) con cada uno de los plásmidos descritos anteriormente. En la tabla 1 se describen las cepas empleadas para la transformación y las generadas para el estudio de expresión.

Tabla 1. Cepas empleadas para la transformación con los plásmidos que contienen FvtA y FvtC.

Cepa	Descripción
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Cepa deficiente de la proteasa Lon (citoplasma) y de la proteasa OmpT (membrana externa), para la expresión de las proteínas recombinantes.
<i>E. coli</i> BL21 C43(DE3)	Cepa derivada de BL21(DE3), con características mejoradas para la expresión de proteínas tóxicas como es el caso de varias proteínas de membrana.
BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA	BL21(DE3) y BL21C43(DE3) conteniendo el plásmido pET20b(+)-FvtA marcadas con His-tag en las posiciones N y C terminal.
BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FstC BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FstC BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC	BL21(DE3) y BL21C43(DE3) conteniendo el plásmido pET20b(+)-FstC marcadas con His-tag en las posiciones N y C terminal.

Con el fin de determinar que cepa es la más adecuada para la expresión de rFvtA y rFstC, cada una fue cultivada en 3 mL de medio LB o *Terrific Broth* (TB) según sea el caso, ambos suplementados con ampicilina 100 µg/mL. Los cultivos se llevaron hasta una OD₆₀₀ entre 0.4-0.6 para inducir con IPTG 1 mM (en todos los casos se usó siempre la misma concentración) y se incubaron a 37 °C durante 3 h con agitación de 200 rpm. Este mismo procedimiento se llevó a cabo a 25 °C y 30 °C, variando el tiempo de incubación después de la inducción a 16 h con agitación de 200 rpm. Finalizado el tiempo de cultivo, se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó, los sedimentos resultantes se resuspendieron en tampón Laemmli 2X para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y *Western Blot*.

3.2.1.1. Proteína rFvtA

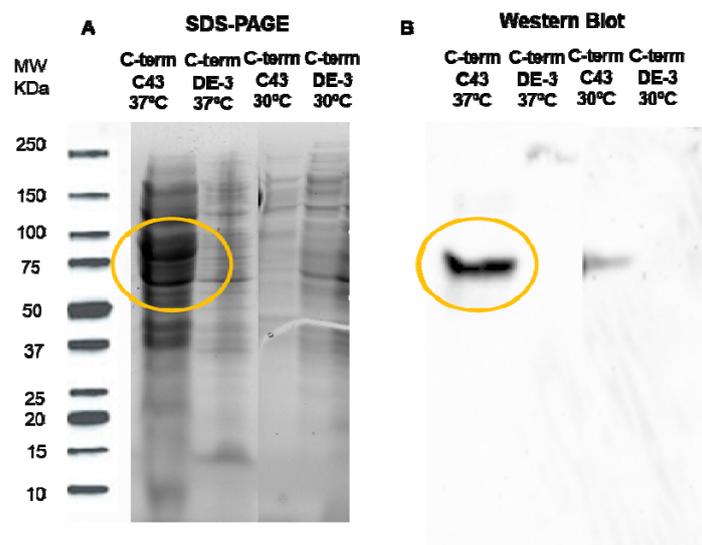


Figura 11. Ensayos de expresión de rFvtA (75.115 KDa) en **BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA**. **A.** SDS-PAGE 12% del lisado de cada cultivo en medio LB a 30 y 37 °C, IPTG 1 mM **B.** *Western Blot*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las cepas **BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA** (Figura 11), en donde rFvtA está marcada con el 6-His-tag en el extremo C-terminal y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA** es capaz de producir la proteína cultivando en medio LB a 37 °C. Se deduce también que el nivel de inducción de la misma cepa es menor a 30 °C y que **BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FvtA** no es capaz de producir rFvtA en ninguna de las dos condiciones probadas. En todos los casos, se debe tener en cuenta que el anticuerpo empleado para el *Western Blot* interacciona preferentemente con el 6-His-tag en la posición N-terminal y, por lo tanto, podría afectar a la detección de las proteínas marcadas en el extremo C-terminal.

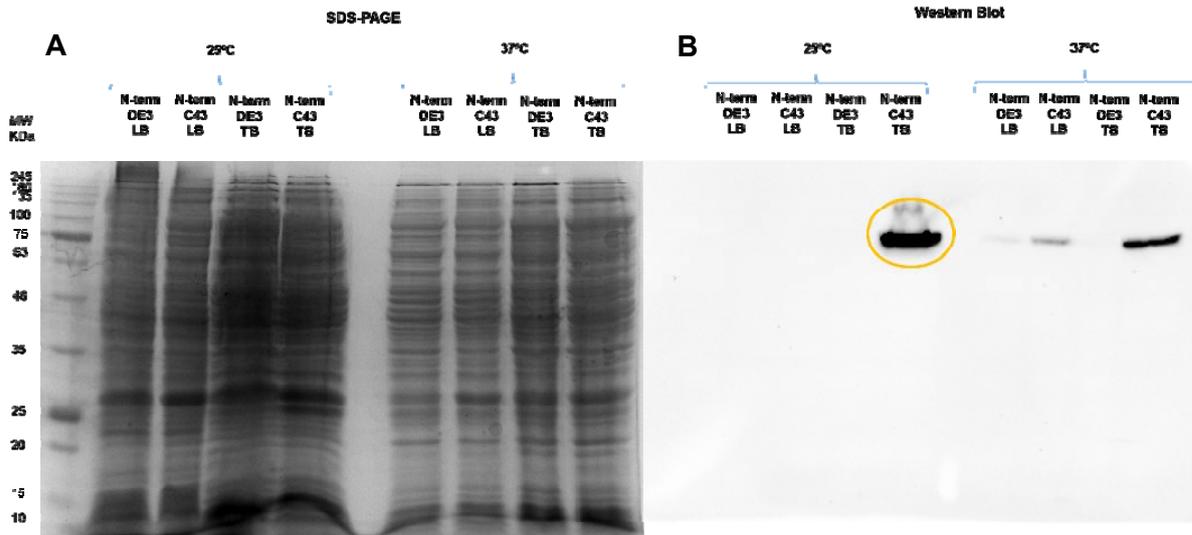


Figura 12. Ensayos de expresión de rFvtA (75.115 KDa) en **BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA**. **A.** SDS-PAGE 12% del lisado de cada cultivo en medio LB y TB a 25 y 37 °C, IPTG 1 mM. **B.** *Western Blot*.

En el caso de **BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** se decidió ensayar las condiciones empladas por la Dra. Katherine Valderrama en su tesis doctoral para la proteína rFrpA usando el sistema pET20b(+).⁵¹ Teniendo en cuenta la intensidad de la banda en el *Western Blot* (Figura 12B) se observó que el cultivo de **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** en medio TB a 25 °C, induciendo con IPTG 1mM, es el que produce mayor cantidad de proteína. También se puede observar dos bandas tenues correspondientes a los lisados de los cultivos de las cepas **BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** en medio LB a 37 °C así como una banda de mayor intensidad para **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** cultivada en medio TB a 37 °C. Por lo tanto, se seleccionó para la expresión a gran escala de rFvtA **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** cultivado en medio TB a 25 °C durante 16 h y agitando a 200 rpm.

CAPITULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1.2.2. Proteína FstC

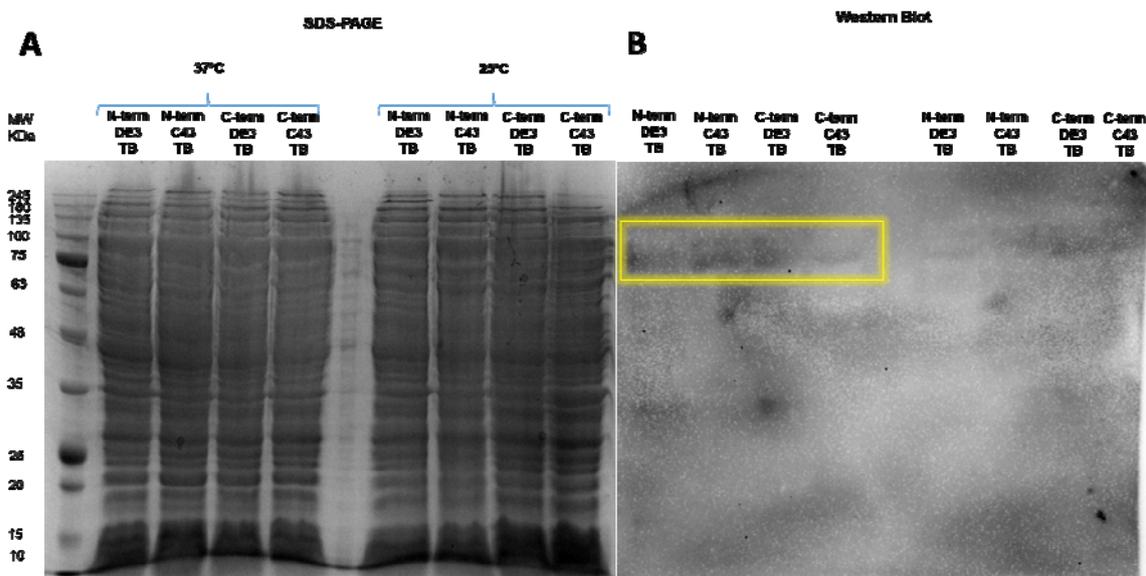


Figura 13. Ensayos de expresión de rFstC (74.711 KDa) en **BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC**, **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC**, **BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FstC** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FstC**. A. SDS-PAGE 12% del lisado de cada cultivo en medio TB a 25 y 37 °C, IPTG 1 mM. B. Western Blot.

Se probaron las condiciones similares a las descritas en el apartado anterior, usando los medios LB y TB a 25 y 37 °C. En el caso del medio TB (Figura 13A) se observan bandas muy tenues en el análisis mediante *Western Blot* (Figura 13B), lo cual indica que se produce poca cantidad de proteína tanto a 25 ° como a 37 °C.

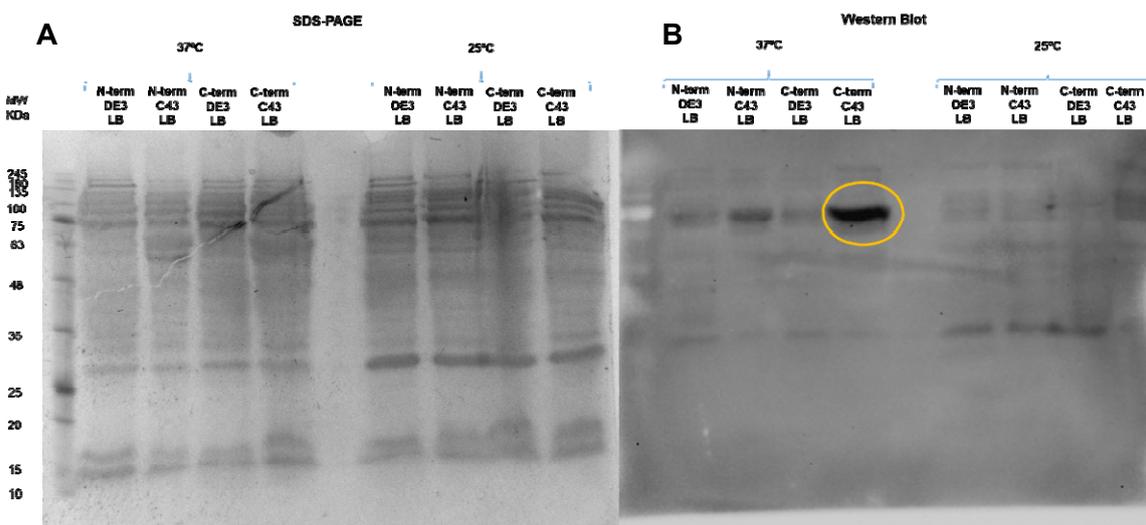


Figura 14. Ensayos de expresión de rFstC (74.711 KDa) en **BL21(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC**, **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC**, **BL21(DE3)/pET20b(+)-N6His-FstC** y **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FstC**. A. SDS-PAGE 12% del lisado de cada cultivo en medio LB a 25 y 37 °C, IPTG 1 mM. B. Western Blot

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de expresión en medio LB (Figura 14A), se determinó por medio del análisis de *Western Blot* (Figura 14B) que las mejores condiciones para producir rFstC corresponden al cultivo de **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC** en medio LB incubado a una temperatura de 37 °C.

Una vez seleccionado los sistemas de expresión y las condiciones de cultivo (Tabla 2), se incluyó el sistema BL21(DE3)pET-Loop6His-FstB cuyas condiciones fueron determinadas por la Dra. Katherine Valderrama,⁵¹ y se procedió al cultivo a gran escala de cada proteína.

Tabla 2. Cepas seleccionadas para la expresión de rFvtA, rFstB y rFvtC, y sus condiciones de cultivo.

Cepa	Condiciones
BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA	<i>Terrific broth</i> -Ampicilina (100 µg/mL), 25 °C, 200 rpm, 1 mM IPTG, 16 h post-inducción
BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC	LB-Ampicilina (100 µg/mL), 37 °C, 200 rpm, 1 mM IPTG, 3h post-inducción
BL21(DE3)pET-Loop6His-FstB	LB-Ampicilina (100 µg/mL), 37 °C, 200 rpm, 1 mM IPTG, 3h post-inducción

Se confirmó mediante análisis de huella peptídica y fragmentación por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF que las proteínas rFvtA y rFstC expresadas corresponden a los respectivos receptores de sideróforos. Los fragmentos de péptidos permitieron comprobar la identidad de cada proteína (Ver Anexos).

3.2. Escalado de la expresión de las proteínas recombinantes rFvtA, rFstB y rFstC para ensayos de vacunación.

Una vez que se establecieron las condiciones de cultivo para la expresión de cada proteína, se prepararon cultivos a gran escala para obtener cantidades suficientes de las proteínas recombinantes, para posteriormente ser ensayadas en experimentos de vacunación en peces.

En cada caso se prepararon de 8 a 10 L de cultivo suplementado con ampicilina (100 µg/mL) teniendo en cuenta la capacidad de los erlenmeyers, ya que esto influye directamente en la aireación del cultivo. A partir de erlenmeyers de 5 y 3 L se prepararon con 2 y 1 L de medio de cultivo respectivamente, y cada uno fue inoculado con un cultivo de 200 y 100 mL de 12 h de crecimiento a partir de cada una de las

CAPITULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

cepas conservadas. El cultivo se incubó a 25 °C en el caso de **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** y a 37 °C para **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC** y BL21(DE3)pET-Loop6His-FstB, agitando a 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.4 y 0.6. A continuación, se agregó el inductor IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se dejó incubando 16 h para **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA** y 3 h para **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC** y BL21(DE3)pET-Loop6His-FstB.

Finalizado el tiempo de cultivo es necesario separar las células del medio de cultivo, para ello se centrifugó y el sobrenadante se descartó. El sedimento obtenido se resuspendió en tampón tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Imidazol 10 mM (TNI-10) con inhibidor de proteasas, lisozima y ADNasaI y las células se lisaron con partículas de zirconia/sílice en un disruptor de células. Las proteínas localizadas en el periplasma se liberaron con lauril sarcosinato de sodio que disuelve las membranas internas de la célula. Posteriormente, con el fin de separar la fracción de las membranas externas, para esto se realizó una ultracentrifugación de la que se separó el sobrenadante y un sedimento que corresponde a las membranas externas. El sedimento obtenido se trató con un tampón TNI-10 y Elugent al 5 %, con el fin de solubilizar la proteína. La fracción insoluble (membranas y proteínas precipitadas) se retiró mediante ultracentrifugación y las proteínas solubilizadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad en una resina de níquel.

Para cada purificación se obtuvo un cromatograma (ver anexos) y se analizó cada paso por SDS-PAGE. En todos los geles se observa que hay una cantidad significativa de la proteína de interés en la fracción insoluble en Elugent 5% (carril 3, Figura 15), lo cual se debe a la formación de cuerpos de inclusión. Se comprobó también la presencia de la proteína en la fracción soluble en Elugent al 5% antes de la purificación y la ausencia de la proteína en la fracción no retenida en la columna carril 5 en todos los casos (Figura 15). En el caso de rFstB se observa que parte de la proteína aún se encuentra en la fracción no retenida (Figura 15B). Esto puede suceder cuando la cola de histidinas en la proteína recombinante no está bien expuesta para interactuar con la resina o también por desgaste de la columna, ya que al eluir con altas concentraciones de imidazol puede causar la pérdida del níquel que contiene en la resina.

Las fracciones en donde se encuentra la proteína se mezclaron y concentraron, intercambiando el tampón por uno de fosfato salino pH 7.6 (PBS). Se obtuvieron a

partir de 8 L de cultivo entre 400 y 500 μ L a concentraciones de 1.5-2.0 mg/mL de rFvtA, 3.0-3.5 mg/mL de rFstB y 4.5-5.0 mg/mL de rFstC.

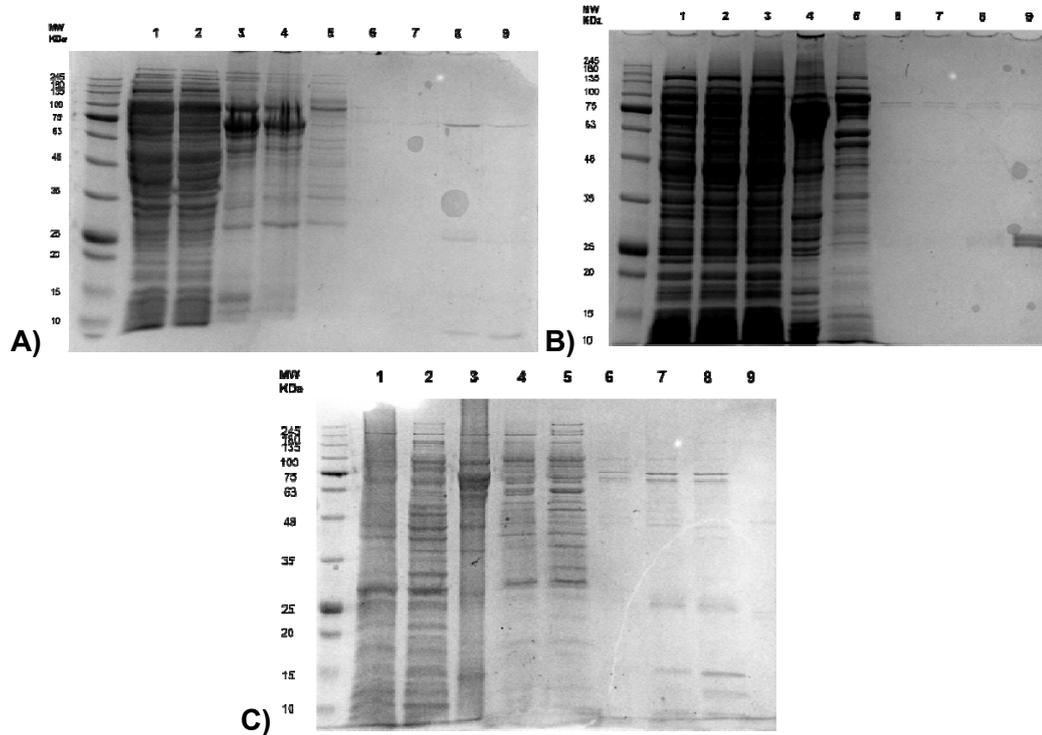


Figura 15. SDS-PAGE al 12 % de las fracciones obtenidas de la purificación en resina de níquel de **A.** rFvtA (75.115 KDa), cultivo de **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-N6His-FvtA**, medio TB, 25°C, IPTG 1 mM, 16 h. **B.** rFstB (84.802 KDa), cultivo de BL21(DE3)pET-Loop6His-FstB, medio LB, 37°C, IPTG 1 mM, 3 h. **C.** rFstC (74.711 KDa), cultivo de **BL21C43(DE3)/pET20b(+)-C6His-FstC** medio LB, 37°C, IPTG 1mM, 3 h. **1.** Lisado **2.** Sobrenadante con lauril sarcosinato de sodio **3.** Fracción no soluble Elugent al 5 % **4.** Fracción soluble Elugent al 5%. **5.** Fracción no retenida en la columna de níquel. **6,7,8,** y **9.** Fracciones eluidas con 100% de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Imidazol 250 mM, Elugent 0.25% (TNI-250).

3.3. Ensayos de vacunación con rFvtA

Para evaluar la posible protección contra la vibriosis en lenguados, se realizó un ensayo de vacunación en el que se observó la capacidad de rFvtA para generar anticuerpos contra *Vibrio anguillarum*. Los ensayos se realizaron en los laboratorios del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela a los que pertenece el grupo de investigación que coordina el Profesor Manuel L. Lemos del Departamento de Microbiología y Parasitología.

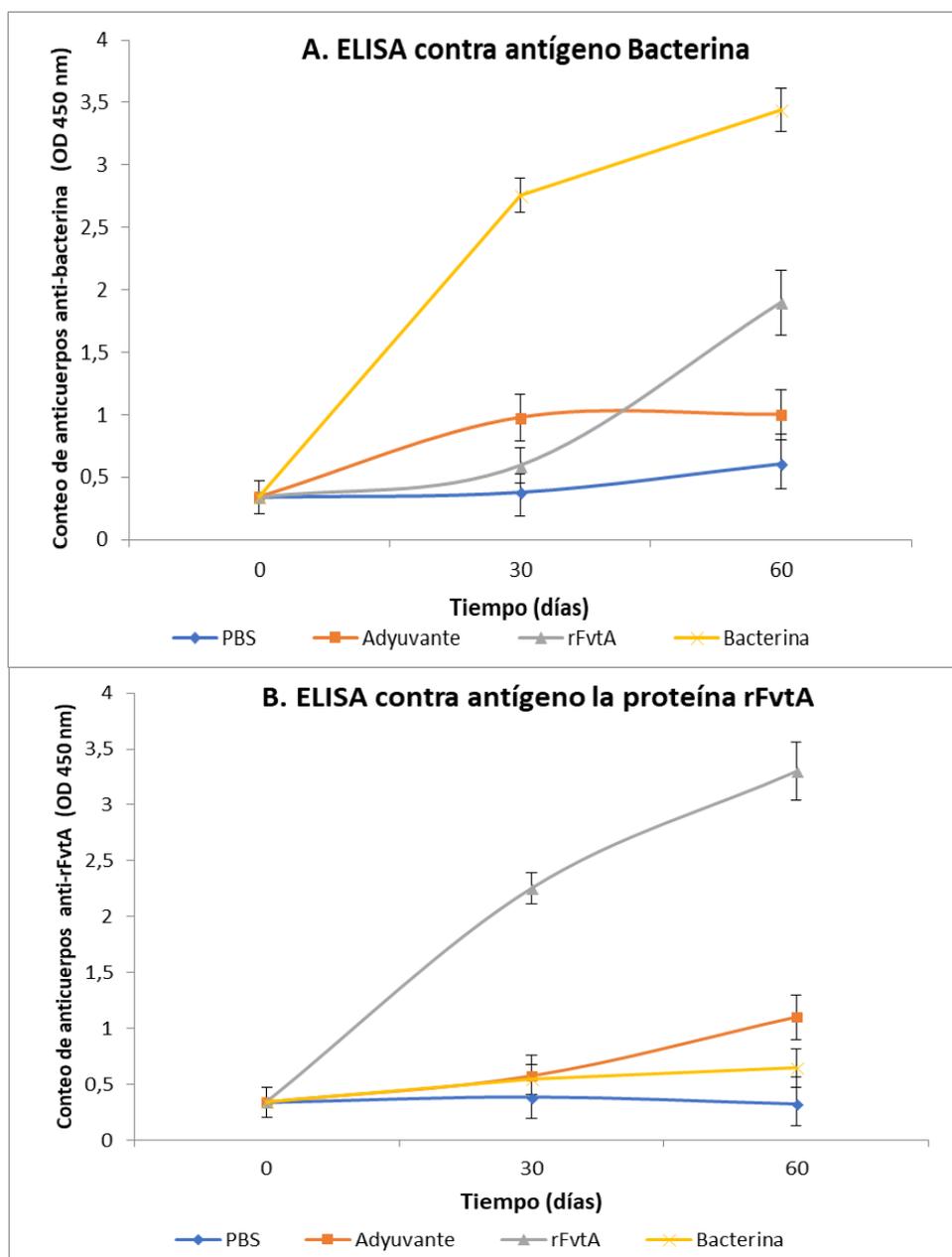


Figura 16. Nivel de anticuerpos frente a **A.** bacterina de *Vibrio anguillarum* RV22 **B.** la proteína recombinante FvtA presente en el suero de los peces inmunizados.

En la figura 16 se puede observar la respuesta inmunológica durante el ensayo de vacunación de los lenguados con la bacterina, la proteína rFvtA, y los dos controles negativos PBS y adyuvante. Como es de esperar, en el caso de los controles negativos, no se observa producción de inmunoglobulinas IgG en contra a la proteína FvtA durante la inmunización. De la misma manera, la inmunización con la bacterina no genera producción de anticuerpos en contra de la proteína. En el caso de la inmunización con la proteína rFvtA, después de 30 días de la primera inmunización se observa un incremento en la producción de inmunoglobulinas G (IgG), donde se tomó la primera muestra del suero de los lenguados. También se detecta un incremento a

los 30 días después de realizar una segunda inmunización de refuerzo en el día 60. Estos resultados demuestran que la proteína FvtA genera una importante respuesta inmunogénica.

Sin embargo, a pesar de de la producción de anticuerpos, al inducir la infección al grupo de lenguados inmunizados con rFvtA, la mortalidad fue del 100%, concluyéndose que esta proteína recombinante no ofrece protección. Una posible explicación de este resultado se expresará en el capítulo III.

3.4. Ensayos de vacunación con rFstB y rFstC

Para evaluar la capacidad de protección de las proteínas rFstB y rFstC contra la furunculosis generada por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, se llevó a cabo el ensayo de vacunación en lenguados, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para rFvtA.

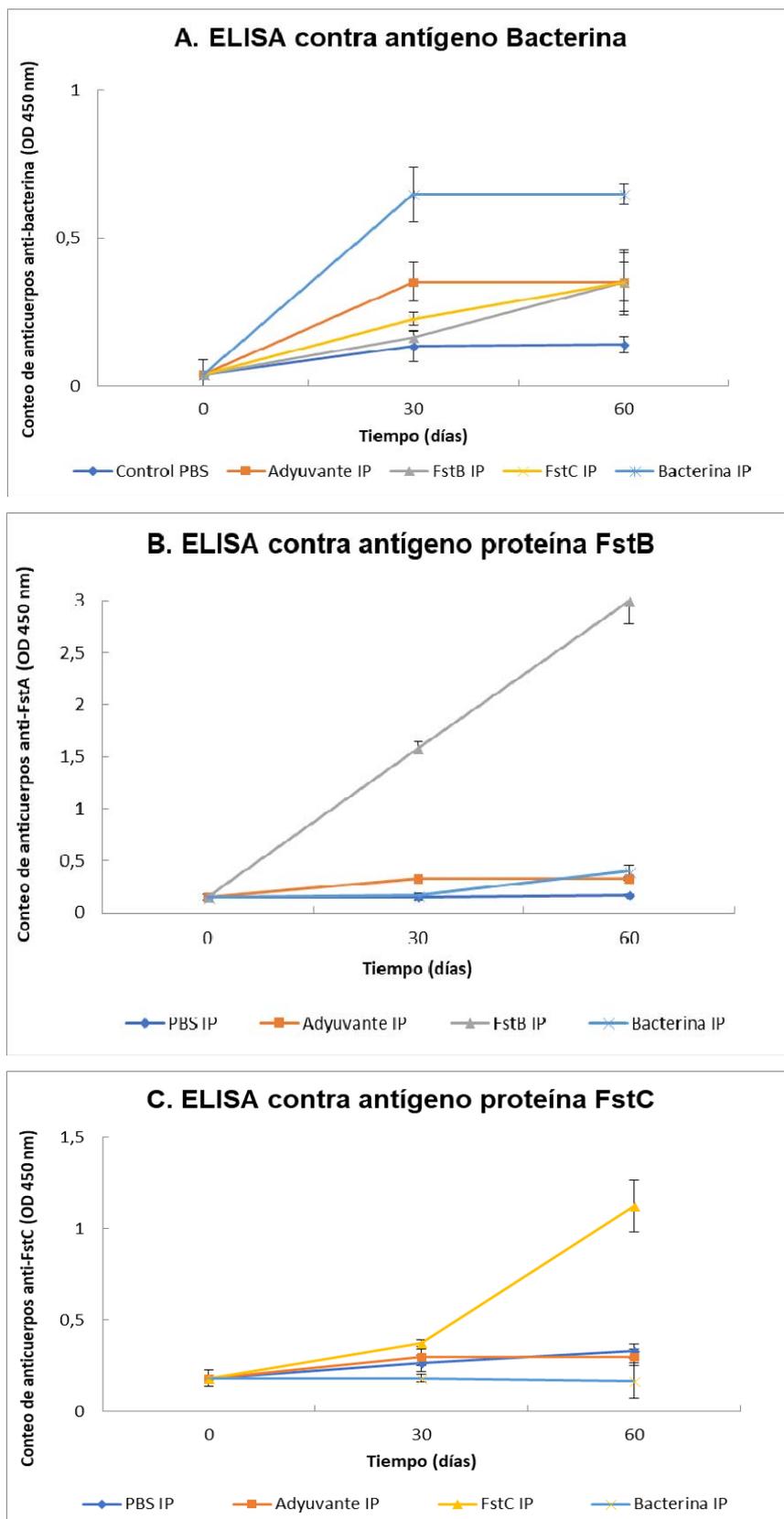


Figura 17. Nivel de anticuerpos frente producidos frente a *A. Bacterina* de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* **B.** Proteína recombinante rFstB y **C.** Proteína recombinante rFstC presentes en el suero de los peces inmunizados.

La respuesta inmunológica frente a la bacterina, las proteínas rFstB y rFstC y los controles negativos PBS y adyuvante durante el ensayo de vacunación se muestra en las gráficas de la Figura 17. En el caso de la bacterina se observa que a partir de la segunda inmunización no hay un aumento en la producción de anticuerpos, mientras que en el caso de las proteínas recombinantes, la respuesta aumenta. En el caso de rFstB se puede ver un aumento constante del nivel de anticuerpos mientras que para rFstC se observa un aumento moderado a partir de la segunda inmunización.

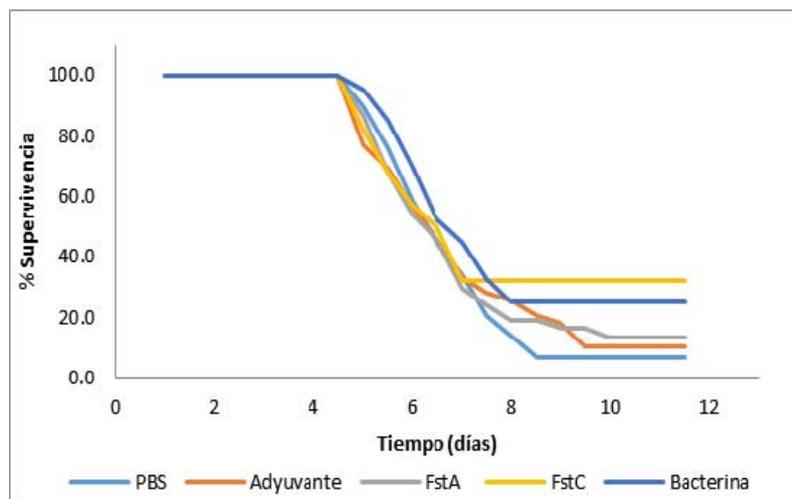


Figura 18. Porcentajes de supervivencia de los peces inmunizados con la bacterina, las proteínas rFstB y rFstC y los controles negativos negativos PBS y adyuvante.

Pasado el tiempo los 60 días de inmunización, se indujo la infección y se realizó un seguimiento hasta que no se presentaron más muertes en los grupos inmunizados. En la Figura 18 se observa que, a los 9 días la mayoría de los peces tratados con los controles negativos (PBS y adyuvante) mueren. Por otra parte, en los individuos inmunizados con rFstB, a pesar de tener la mejor respuesta inmunológica en cuanto a producción de anticuerpos, el porcentaje de supervivencia es muy bajo (13.5%). Por el contrario, con rFstC aunque el nivel de IgG es menor, se observa una mayor protección ya que se alcanza un porcentaje de supervivencia de 32.1%. Se debe resaltar que la bacterina presentó un porcentaje de supervivencia de 25%, siendo este valor muy bajo teniendo cuenta que la membrana de la bacteria debería presentar mas antígenos. Una posible explicación de la baja respuesta del sistema inmunológico podría ser que las cepas de *A. salmonicida* tienden a generar una capsula rica en polisacáridos que evitan la exposición de dichos antígenos.⁶²

Los resultados indican que ambas proteínas generan una buena respuesta de anticuerpos, destacando que FstB es significativamente más inmunogénica que FstC. Sin embargo, durante la infección experimental, el grupo vacunado con FstB presentó

CAPITULO I: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

una mortalidad similar al grupo control, mientras que FstC redujo la mortalidad hasta valores similares a los obtenidos con una bacterina de *A. salmonicida*. Los resultados de la regulación génica indican que la expresión de FstB en *A. salmonicida* presenta unos niveles muy bajos mientras que FstC tiene unos niveles de expresión mucho más altos. Esto puede explicar la mayor eficacia de FstC como protector frente a la forunculosis. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que FstC sería el mejor candidato para su posible uso en formulaciones vacunales contra la forunculosis producida por *A. salmonicida*.

4. Parte experimental

4.1. Metodología general

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). La visualización y digitalización de los geles de poliacrilamida y agarosa se realizó con los fotodocumentadores CHEMIDOC MP (Bio-Rad). La secuenciación automática de ADN se llevó a cabo en los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña (SAI) utilizando el Sistema de análisis genético 3130xl (Applied Biosystems). La cuantificación de las proteínas se realizó en un espectrofotómetro Myspec (VWR) a 280 nm por medio de microgota. Los análisis de huella peptídica y fragmentación de las proteínas se realizaron en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) usando un espectrómetro de masas AB Sciex 4800 Proteomics Analyzer (Framingham, MA) utilizando la técnica MALDI-TOF/TOF y el software Explorer™ 4000 Series de AB Sciex. Los datos se analizaron usando el software Protein Pilot 4.0 también de AB Sciex.

Para la lisis se emplearon partículas de zirconia /sílice de 0.1 mm y un disruptor celular (Biospec Products).

La purificación de las proteínas se llevó a cabo mediante un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) NGC Quest 10 Plus (Bio-Rad). Se emplearon columnas HisTrap HP GE Healthcare. Las fases móviles se filtraron usando membranas de 0.45 µm (FilterLab) con desgasificación al vacío o mediante burbujeo con nitrógeno.

Se usaron geles de poliacrilamida al 12% como gel de separación y al 4% como gel de preconcentración. Se usó un tampón tris-glicina a pH 8.3 (3 g de tris base, 14.4 g de glicina y 1 g de SDS disueltos en 1 L de agua Milli-Q) y para la tinción se usó Blue Safe de la compañía NZYTech.

Los medios de cultivo y materiales fueron esterilizados con vapor a 121 °C y 1.2 bar durante 30 minutos en una autoclave de la marca Matachana.

4.2. Metodología para el clonaje y expresión de rFvtA y rFstC

Cepas

En este estudio se emplearon las cepas que se describen en la tabla 3

Tabla 3. Cepas empleadas para la extracción de ADN genómico y expresión.

Cepa	Características
<i>Vibrio anguillarum</i> RV22	Patógeno obtenido de peces con vibriosis.
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> VT45	Patógeno obtenido de peces con forunculosis.
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Cepa de propagación de plásmidos
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Cepa de expresión
<i>Escherichia coli</i> BL21 C43(DE3)	Cepa de expresión

Medios de cultivo

Para los cultivos y producción de las proteínas recombinantes se emplearon los medios de cultivos cuyas composiciones se muestran en a tabla 4.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados.

Luria Bertani (LB)	Terrific broth (TB)*
Triptona 10 g/L	Triptona 12g
Extracto de levadura 5 g/L	Extracto de levadura 24 g
NaCl 10 g/L	Glicerol 4 mL
	KH ₂ PO ₄ 0.17 M
	K ₂ HPO ₄ 0.72 M

*El medio y el tampón de fosfatos se esterilizaron por separado y se mezclaron antes de su uso teniendo en cuenta que las cantidades de los componentes nutritivos se prepararon en 900 mL para luego adicionar 100 mL del tampón de fosfatos. En todos los casos se empleó agua destilada.

Suplementos y antibióticos

Los medios de cultivo para mantenimiento del plásmido se suplementaron con ampicilina 100 µg/mL, y la expresión de las proteínas recombinantes se indujo con β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 mM. Las disoluciones se esterilizaron con filtros de 0.2 µm y se almacenaron a -20 °C.

Primers

Los *primers* para el clonaje y secuenciación se adquirieron en Sigma-Aldrich teniéndose en cuenta los sitios de restricción adecuados y el marco de lectura (Tabla

5). Se solubilizaron en agua Milli-Q hasta una concentración de 100 μM y posteriormente se prepararon disoluciones de trabajo a 10 μM

Tabla 5. Primers empleados para el clonaje y verificación de los genes.

Primer	Secuencia 5'→3'	Sitio de restricción	Uso
FvtA CpET Fw FvtA CpET Rev FvtA NpET Fw FvtA NpET Rev	GTACCCATGGATCAGCTCGAAAAAAGAG GTACCTCGAGGAACTGGTAATCAGCGACT ATATCCATGGTACACCACCACCACCAGCTCGAAAAAAGAG TATACCTCGAGCTAGAACTGGTAATCAGC	NcoI XhoI NcoI XhoI	Expresión de FvtA
FvtA1-740 Rev FvtA741-1550 Fw FvtA741-1550 Rev FvtA1551-1991 Fw	TATAATATTGCCCTCTTCATTACGG ATATACCAACTTCGTTACCAAG TATAAACTTCCGTACCGTAAGT ATATGAAGCCTCTTACTGGTTGATTCT		Identificación del gen FvtA
FstC CpET Fw FstC CpET Rev FstC NpET Fw FstC NpET Rev	TATAGGATCCAATTCATGGAGTTTTGACTA ATATCTCGAGCAGCTTGTAAATCACCCC TATAGGATCCACACCACCACCACCATTCATGGAGTTTTGACT ATATCTCGAGCTCGAGTTACAGCTTGTAAATTCAC	BamHI XhoI BamHI XhoI	Expresión de FstC
FstC 1-600 Rev FstC 500-1200 Fw FstC 500-1200 Rev FstC 1200-1887 Fw FstC 1200-1887 Rev	TATACATCCAGGTTGTTGGACTGATC ATATTGTCTCCGGTGCCTCAT TATACGGCGCCACCCTTGATCAC ATATGGCAAGCGTTCAAGGCA TATATTACAGCTTGTAAATCACCCCGG		Identificación del gen FstC
pET20(+) Fw pET20(+) Rev	TAATACGACTCACTATAGG GCTAGTTATTGCTCAGCG		Identificación de los genes de FvtA y FstC dentro del plásmido

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes del receptor de vancomicina, FvtA (protein ID CAL44983.1, NCBI) y del receptor de colicina, FstC (protein ID AAS13461.1, NCBI), se realizó a partir de ADN genómico de *Vibrio anguillarum* RV22 y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* respectivamente. Se empleó la polimerasa de Q5 de alta fidelidad (New England Biolabs) para la amplificación y la Taq polimerasa en mezcla con tampón de carga Supreme NZYProof 2x Green Master Mix (NZYtech) para las verificaciones de rutina en cada paso del clonaje.

Tabla 6. Programas generales de PCR para las reacciones con Taq polimerasa y Q5 polimerasa

Paso del ciclo	Taq-polimerasa		Q5		Ciclos
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95 °C	30 s	98 °C	30 s	1
Desnaturalización	95 °C	10 s	98 °C	10 s	
Hibridación	X	30 s	X	30 s	25
Extensión	72 °C	1 min/Kb	72 °C	1 min/Kb	
Extensión Final	72 °C	10 min	72 °C	10 min	1

La temperatura de hibridación (X) y el tiempo de extensión fueron ajustados a las condiciones del fragmento que se amplifica y a la enzima empleada.

Procedimiento general de clonaje

A partir del ADN genómico se realizó una PCR de colonia usando los *primers* diseñados para cada caso dependiendo de la posición deseada para la cola de histidinas, NpET para las marcadas en el extremo N-terminal y CpET para las marcadas en C-terminal (Tabla 5) de cada proteína y la polimerasa Q5. Los insertos obtenidos se purificaron usando el kit GenElute™ (Sigma-Aldrich). El plásmido pET20b(+) y los insertos se digirieron con las enzimas NcoI y XhoI Speedy (NZYtech) para los insertos de FvtA N y C-terminal y BamHI y XhoI Speedy (NZYtech) para los insertos de FstC N y C-terminal, durante 30 min a 37 °C. Las enzimas fueron inactivadas a 80 °C durante 10 minutos. Los fragmentos digeridos se ligaron con ligasa T4 (Takara) a 22 °C durante 16 horas. La ligasa se inactivó a 65 °C durante 10 min y se transformó en *E. coli* Top10. Las colonias seleccionadas se cultivaron en placas de agar suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se verificó la presencia del plásmido mediante electroforesis. Se seleccionaron 2 colonias y con ellas se preparó un cultivo saturado para extraer el plásmido y verificar por medio de secuenciación de ADN la secuencia de cada vector generado por medio del programa VectorNTI y la herramienta en línea LALIGN.

Preparación de células competentes

Para la incorporación del ADN plasmídico en las células de *E. coli* se sometieron al siguiente procedimiento para obtener células competentes. Se inocularon 50 mL de medio LB con un cultivo saturado de la bacteria de interés (Top10, BL21 (DE3) o BL21 C43(DE3)). Posteriormente se dejó crecer a 37 °C hasta hasta una OD₆₀₀ entre 0.6 y 0.8, después se dejaron sobre hielo (0 °C) durante 10 minutos y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió suavemente en 25 mL de CaCl₂ 50 mM estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. El sedimento obtenido se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 50 mM y se dejó a 0 °C durante una hora. Pasado este tiempo se repitió la centrifugación y el sedimento se resuspendió en 1 mL de de CaCl₂ 50mM. Las suspensión de bacterias competentes se dividió en alícuotas de 100 µL para ser usadas inmediatamente o conservadas a -80 °C.

Transformación mediante choque térmico

Las muestras y las disoluciones de trabajo se mantuvieron en hielo durante el

proceso de transformación. Para la transformación de las células mediante choque térmico, se mezclaron 5 μ L de ADN plasmídico con 100 μ L de una suspensión de células competentes. Las células se incubaron durante 1 hora a 0 °C y a continuación se llevaron a 42 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Finalizado este tiempo se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos y se retiraron 900 μ L de medio. El sedimento se resuspendió en el medio restante, se transfirió a placas con medio LB agar suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y se dejó durante toda la noche a 37 °C.

Gel de agarosa 1%

Para la identificación y purificación de los fragmentos de ADN se usaron geles de agarosa de 1 %, tampón tris-borato-EDTA (TEB, Tris: 108 g, ácido bórico: 55 g y 80 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0) y RealSafe Staining solution (NZYTech) para la tinción. El gel se colocó en la celda de electroforesis Mini-Sub® GT cell (Bio-Rad) y se cubrió completamente con el tampón TBE. El tamaño de los fragmentos se estimó por medio del marcador DNA Ladder III (NZYtech). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 60 min usando la fuente PowerPac™ (Bio-Rad).

Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizaron los kits NZYMiniprep (NZYTech) y GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Se prepararon cultivos de 3 mL en medio LB saturados y se siguió el protocolo establecido por el fabricante.

Ensayos de expresión de rFvtA y rFstC

Una vez se verificaron las secuencias de los vectores pET20b(+)-N6His-FvtA, pET20b(+)-6His-FstC, pET20b(+)-C6His-FstC, se transformaron las cepas *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* BL21 C43(DE3). Para los ensayos de expresión se prepararon 3 mL de cultivo LB o TB de cada cepa transformada con un cultivo saturado de cada una de ellas, se dejaron crecer a 37 °C o 25 °C hasta llegar a un OD₆₀₀ alrededor de 0.6 y se indujo con IPTG 1mM a 37 °C o 25 °C. Después de 3 horas de inducción en el caso de los cultivos a 37 °C y 16 h en el caso de los cultivos a 25 °C, se tomó 1 mL de cultivo, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sedimentos se resuspendieron en tampón Laemmli de carga para geles de poliacrilamida, hasta tener una relación de OD₆₀₀ de 0.3 en 10 μ L de tampón. Las muestras se analizaron mediante Western blot. Para pET20b(+)-C6His-FvtA solamente se ensayó el medio LB a 30° y 37 °C.

CAPITULO I: PARTE EXPERIMENTAL

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Para la electroforesis de poliacrilamida se prepararon los geles de forma manual, para el gel de separación de poliacrilamida al 12% se mezclaron 6 mL de acrilamida 40% (NZYtech), 5 mL de tampón Tris-HCl pH 8.8, 200 µL de dodecilsulfato de sodio al 10%, 8.7 mL de agua Milli-Q, 10 µL de *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 100 µL de persulfato de amonio (PSA). El gel de concentración al 4% se preparó mezclando 1 mL de acrilamida 40% (NZYtech), 2.52 mL de tampón Tris-HCl pH 6.8, 100 µL de dodecilsulfato de sodio al 10%, 6.3 mL de agua Milli-Q, 10 µL de *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 50 µL de persulfato de amonio (PSA).

La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 60 min usando la fuente PowerPac™ (Bio-Rad) y tampón tris-Glicina.

Western blot

Se realizó la transferencia del gel a la membrana usando tampón tris-glicina (200 mL de etanol, 3 g de tris-amino, 14.4 g de glicina y 1 mL de SDS al 20% en 1 L de agua). La membrana se lavó usando tampón PBS con tween 20 al 0.05 % y se bloqueó con una solución al 5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Pasado este tiempo, se lavó 3 veces con PBS tween 20 0.05% 5 min de cada vez. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo primario (Anti-polyHistidine, Clone HIS-1 producido en ratón, Sigma-Aldrich), el cual se dejó en contacto con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó con tampón PBS tween 20 al 0.05%, 3 veces durante 5 min de cada vez, y se adicionó el anticuerpo secundario (ECL Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab, GE Healthcare Life Sciences) que se dejó en contacto con la membrana durante 45 minutos. Finalmente, la membrana se lavó con tampón PBS tween 20 al 0.05%, 2 veces durante 10 min de cada vez, se reveló usando Luminata clásico, *Western* HRP Substrate (Millipore) y se visualizó en un fotodocumentador.

4.3. Escalado de cultivos y purificación de las proteínas rFvtA, rFstB y rFstC

Cultivo a gran escala y preparación de membranas para la purificación de las proteínas recombinantes.

Método general: 1 L (ó 2 L) de medio LB (o TB) suplementado con ampicilina se inocularon con 100 mL (o 200 mL) de cultivo saturado, se dejaron crecer a 37 °C (o 25

°C) hasta alcanzar un OD₆₀₀ de 0.6 y posteriormente se indujo con IPTG a concentración final de 1 mM. El cultivo se mantuvo a la temperatura de trabajo durante 3 h (ó 16 h) y luego se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, lisozima 0.1% y ADNasa 0.004% e inhibidor de proteasas, se lisó empleando partículas de zirconio/sílice en un disruptor de células y los restos celulares se retiraron por centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos. Al sobrenadante se le adicionó lauril sarcosinato de sodio hasta alcanzar una concentración del 1%, se sonicó en un baño para ayudar a resuspender el detergente y posteriormente se centrifugó 1 hora a 125000 g a 4 °C. El sedimento de las membranas externas se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM y Elugent al 5 % y se agitó durante toda la noche a 4 °C. Pasado este tiempo se repitió la centrifugación a 125000 g por 1 hora a 4 °C y el sobrenadante que contiene la fracción de proteína solubilizada se mantuvo a 4 °C para su purificación.

Purificación por medio de cromatografía de afinidad en columna níquel

El sobrenadante que contiene rFvtA, rFstB o rFstC solubilizada con Elugent 5%, se purificó usando FPLC y una columna de níquel de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences), usando como tampón A: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 50 mM y Elugent al 0.25% y como tampón B: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM y Elugent al 0.25%. La muestra se cargó en la columna, se lavó con 10 mL de tampón A y la elución con 6 mL de 100% de tampón B. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE.

*Ensayo de vacunación contra *Vibrio anguillarum**

Se realizó un ensayo de inmunización de lenguados a los que se les administró por vía intraperitoneal diferentes tratamientos. La producción de anticuerpos frente a *Vibrio anguillarum* RV22 se realizó por medio de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*).

Se utilizaron 250 lenguados de 10 g de peso que se distribuyeron al azar en 5 grupos de 50 peces. Un grupo de peces actuó como testigo del experimento, los 4 grupos restantes fueron inmunizados con los siguientes tratamientos:

CAPITULO I: PARTE EXPERIMENTAL

1. 100 μ L de una solución inmunogénica que contenía la proteína rFvtA. A cada pez se le suministró 30 μ g de rFrpA resuspendida en una disolución de PBS con 0.25 % de Elugent y adyuvante de Freund en una proporción 1:1.
2. Bacterina (vacuna tradicional) obtenida al inactivar un cultivo de *V. anguillarum* con formol al 0.1 %. Este cultivo inactivado se ajustó con PBS a una $DO_{600} = 1$
3. Adyuvante de Freund. A este grupo de peces se les suministró una solución de PBS y adyuvante de Freund en una proporción 1:1.
4. El grupo control sin vacunar tratado con PBS.

Para cuantificar la respuesta inmune generada en los peces, los días 0, 30 y 60 se obtuvieron muestras de suero, con las que se realizó el ensayo de ELISA.

5. Conclusiones

Empleando la metodología descrita en este capítulo, la proteína FvtA receptora de vancrobactina, uno de los sideróforos implicados en los sistemas de captación de hierro perteneciente *Vibrio anguillarum* RV22 y FstC receptora de amonabactinas sideróforo correspondiente a *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, se clonaron en el plásmido pET20b(+), cambiando la secuencia señal por pelB y adicionando una cola de histidinas en las regiones C y N-terminal de la proteína.

En cada caso se seleccionó el sistema de expresión más adecuado para rFvtA y rFstC y se purificaron en cantidades de miligramos. Para el sistema FstB se utilizaron las condiciones establecidas en la tesis doctoral de la Dra. A. Katherine Valderrama para su producción.

Se preparó la vacuna rFvtA (30 µg de rFvtA en PBS y adyuvante de Freund en una proporción 1:1) y se realizó un ensayo en el que se emplearon lenguados. Aunque, se obtuvo un 100% de mortalidad en la muestra de peces, se detectó la producción anticuerpos frente a la proteína confirmando su carácter inmunogénico.

Se prepararon las vacunas rFstB y rFstC y se realizó el ensayo empleando lenguados de la misma manera que con rFvtA. Se obtuvo un 13.5 y 32.1 % de supervivencia en los peces inmunizados con rFstB y rFstC respectivamente, concluyéndose que rFstC confiere protección en los peces vacunados.

CAPÍTULO II

Síntesis de un conjugado de sideróforo y nanopartículas magnéticas: Detección de bacterias patógenas

Capítulo II

Introducción

1. Aplicaciones de los sideróforos

Como se ha descrito anteriormente, los sideróforos juegan un papel fundamental en el crecimiento bacteriano y procesos infecciosos. Las propiedades intrínsecas de los sideróforos para ser reconocidos específicamente por sus receptores en la membrana externa de bacterias, hace que se puedan desarrollar aplicaciones interesantes en la agricultura, la industria de los alimentos, la biorremediación, la medicina y la farmacología. A continuación se describirán algunas aplicaciones de los sideróforos.

1.1. Medicina y farmacología

Los metabolitos producidos por bacterias y microorganismos en general, tienen el potencial de convertirse en biomarcadores para la selección de dianas farmacológicas o tener efectos terapéuticos. El primero de los aspectos mejor estudiados de los sideróforos es el tratamiento de la sobrecarga de hierro debida a condiciones donde no se presenta hemorragia.^{63,64} Uno de los ejemplos más destacables es el uso de desferoxamina B en el tratamiento de la talasemia,⁶⁵ que es un tipo de anemia hereditaria que conlleva una destrucción de los glóbulos rojos. Se presenta de modo preferente en individuos de países mediterráneos y se debe a un trastorno en la producción de hemoglobina,⁶⁶ además de envenenamiento o sobrecarga por hierro.

Otra herramienta biotecnológica interesante es la modificación química para la producción de conjugados antimicrobianos. Esta aplicación consiste en unir el sideróforo a un antibiótico a través de un espaciador (Figura 19), una de las estrategias denominada "Caballo de Troya".⁶⁷⁻⁶⁹ Así, se facilita la entrada de antibióticos a través de la membrana por medio de los receptores de sideróforos. En nuestro grupo de investigación, Souto y colaboradores prepararon análogos del sideróforo vanrobactina (producido por *Vibrio anguillarum*) que fueron conjugados con el antibiótico norfloxacin (Figura 20), mostrando una actividad moderada contra *V. anguillarum*.⁷⁰



Figura 19. Estructura de un conjugado empleado en la estrategia “Caballo de Troya”.

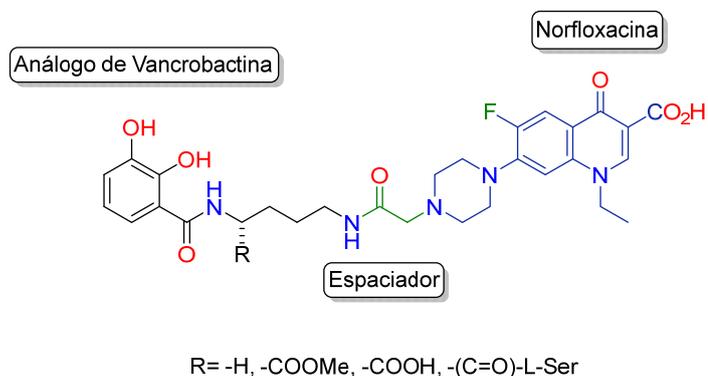


Figura 20. Estructura general de conjugados de análogos de vancomicina y el antibiótico norfloxacina.

Otro ejemplo importante del uso de sideróforos transportadores de antibióticos es el cefiderocol, que es un conjugado de un sideróforo sintético y cefalosporina (Figura 21). Ha sido desarrollado recientemente para el tratamiento de infecciones severas como neumonía, infecciones del tracto urinario y del torrente sanguíneo, causadas por bacterias Gram-negativas que desarrollaron resistencia a diferentes antibióticos. El cefiderocol es inyectado directamente por vía intravenosa eliminando las bacterias causantes de la infección. En este momento es un fármaco que se encuentra en estudios clínicos en fase III del *National Institute for Health Research* (NHS, Reino Unido).⁷¹

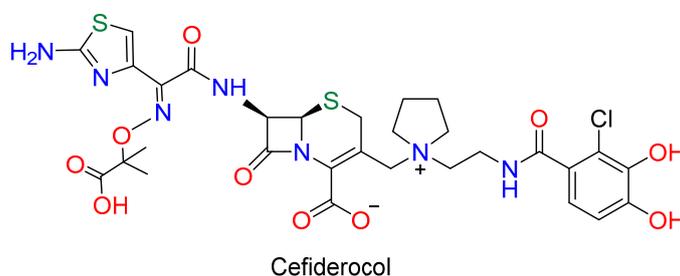


Figura 21. Estructura del cefiderocol, conjugado de sideróforo-cefalosporina sintético para el tratamiento de infecciones severas como neumonía y del tracto urinario.

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

Otra estrategia consiste en el uso de sideróforos como inhibidores de la biosíntesis de los mismos en otras especies de bacterias. Un ejemplo de ello, son los sideróforos baulamicina A y baulamicina B (Figura 22) producidos por *Streptomyces tempisqueusis*, los cuales presentan una fuerte actividad inhibitoria de la biosíntesis de sideróforos en un amplio rango de bacterias, entre ellas *S. aureus* y *E. coli*.^{72,73}

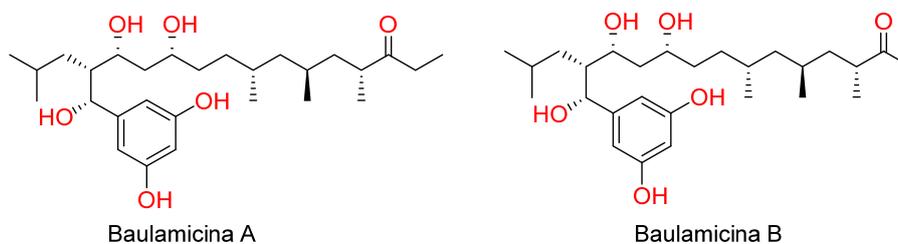


Figura 22. Estructura de baulamicinas A y B, inhibidores de la biosíntesis de sideróforos

El uso de sideróforos en el desarrollo de vacunas también ha sido ampliamente estudiado.⁷⁴⁻⁷⁶ Bergeron y colaboradores reportaron el uso de un análogo de vibriobactina conjugada a ovoalbúmina (OVA) o albúmina de suero bovino (ASB) y su habilidad de promover la producción de anticuerpos en ratones.⁷⁶ La respuesta inmunogénica fue confirmada por medio de detección de anti-ASB y anti-OVA IgG (inmunoglobulina G) aislada de plasma de ratón.⁷⁴ Recientemente, se han llevado a cabo investigaciones para el desarrollo de vacunas para el tratamiento del tracto urinario basados en *E. coli* como organismo urinopatogénico.⁴⁷

Por otra parte, también se han encontrado aplicaciones de los sideróforos triacetilfusarina y ferrioxamina E marcados con galio 68 (⁶⁸Ga) como radiofarmacéuticos. Se comprobó en un modelo de ratón y rata infectados con aspergillosis pulmonar, que el hongo *Aspergillus fumigatus* absorbió ambos sideróforos marcados y su seguimiento por tomografía de emisión positrónica (TEP) permitió observar la acumulación en los pulmones y el incremento de estos dependiendo del grado de la infección.⁷⁷

Algunos sideróforos también se han utilizado como inhibidores de metaloenzimas. Estas están asociadas a diversas reacciones biológicas, de manera que cuando su actividad no se encuentra regulada se asocia a enfermedades como cáncer, procesos inflamatorios, hipertensión, infecciones bacterianas y virales.⁷⁸ Los centros metálicos de las metaloenzimas funcionan como cofactores y son fundamentales para los procesos catalíticos. Por esta razón, la habilidad de los sideróforos para acomplejar Fe³⁺ y los diferentes grados de afinidad permite desarrollar inhibidores de la actividad

de estas proteínas como es el caso del zileuton y el vorinostat (Figura 23). El mecanismo de acción del zileuton consiste en la inhibición del ionoforo de calcio, impidiendo la formación de neutrófilos en procesos inflamatorios relacionados con el asma.⁷⁹ Por otra parte, vorinostat se emplea para el tratamiento de linfoma cutáneo de células-T. Es un inhibidor de la histona desacetilasa, interfiriendo en el proceso de acetilación de histonas asociadas a la cromatina, factores de transcripción y proteínas de regulación de proliferación, migración y muerte celular.⁸⁰ Ambos fármacos han sido aprobados por la FDA.

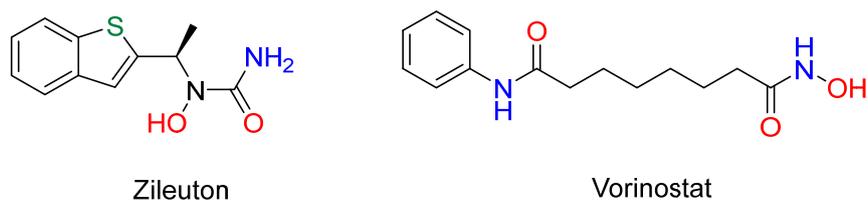


Figura 23. Estructuras del zileuton y vorinostat, sideróforos aprobados por la FDA para el tratamiento del asma y linfoma cutáneo de células-T.

Otra aplicación en medicina está relacionado con los sideróforos coprogen y ferriocromo (ambos de tipo hidroxamato), de los cuales se ha reportado su potencial como agentes anti-arterioescleróticos, puesto que se ha comprobado que la degradación de lípidos depende del grado de acumulación de hierro en lesiones arterioescleróticas.^{81,82}

1.2. Agricultura y biocontrol de patógenos

Recientemente se han publicado estudios para aprovechar la capacidad de los sideróforos de concentrar hierro de forma natural. Por ejemplo, los organismos endófitos utilizan sideróforos para mejorar la absorción de hierro a partir del suelo, además de ayudar en la producción de ácido 3-indol acético, el cual es una hormona de crecimiento vegetal.⁸³ Las bacterias endófitas de la especie invasora *Sorghum* sp. son capaces de alterar la población del rizobio de las plantas nativas, lo que le permite la supervivencia. Por otra parte, se ha podido observar que ocurre transferencia horizontal en el rizoma. Plantas simples como las briofitas (musgos) de especies como *Racomitrium japonicum*, se benefician de sus bacterias endófitas debido a que éstas inhiben el crecimiento de hongos patógenos y mejoran el crecimiento de la planta.⁸⁴

El uso de estas bacterias como biofertilizantes ha sido estudiado, ya que son un potencial tecnológico para mejorar el crecimiento de musgos en la industria de los techos verdes. Sideróforos como la pioverdina, que es producida por *Pseudomonas fluorescens* y que está relacionada con la virulencia de esta bacteria patógena a nivel

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

clínico,⁸⁵⁻⁸⁷ pueden ser empleados como biofertilizantes en el cultivo de tomates puesto que mejoran la adquisición de hierro de la planta y por lo tanto la producción.⁸⁸

Como se puede observar, diferentes sideróforos producidos por microorganismos pueden usados en biofertilizantes, inóculos de rizobio, difusores de agentes de biocontrol para mejorar la producción y la calidad de muchos cultivos de consumo humano.⁸⁹

1.3. Industria de los alimentos

Existen pocos estudios de cómo utilizar los sideróforos en la industria alimentaria. Sin embargo, se conoce que la deferriferricrisina producida por el hongo *Aspergillus oryzae* puede reducir la oxidación en alimentos.⁹⁰ La producción de deferriferricrisina fue optimizada hasta producir 2800 mg por litro de cultivo. Es estable a diferentes temperaturas y su actividad antioxidante fue medida frente a ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como control. Otro ejemplo de sideróforos con posible aplicación es la 2,3-dihidroxibenzoilglicina producido por el probiótico *Bacillus* sp. aislado a partir de la microbiota humana, demostrando ser capaz de inhibir el crecimiento de diferentes patógenos. Por lo expuesto anteriormente, es necesario desarrollar experimentos capaces de determinar si estos sideróforos benefician a bacterias probióticas, lo cual abriría una nueva aplicación de estos compuestos para la industria alimenticia.⁸⁹

1.4. Aplicaciones en biorremediación y biodegradación

El empleo de sideróforos para retirar contaminantes del medio como el suelo, agua, océanos, etc, se encuadra dentro de las estrategias denominadas de biorremediación. Dentro de los contaminantes más nocivos y persistentes se encuentran los metales pesados como el plomo, níquel, cobre, cadmio, zinc, cromo, arsénico, estroncio y titanio. Estos pueden encontrarse distribuidos en sedimentos y aguas, así como también, en otros contaminantes como el petróleo o elementos radiactivos.⁹¹⁻⁹⁶ Estos contaminantes contribuyen al detrimento de los ecosistemas. Algunos microorganismos son capaces de emplear sideróforos para inmovilizarlos y sobrevivir en su presencia.^{97,98}

Un ejemplo de utilización de sideróforos es el uso para inmovilización de arsénico en suelos. Los sideróforos producidos por *Pseudomonas azotoformans* mostraron que son capaces de extraer hasta un 92.8% de arsénico en comparación con el ácido cítrico y el EDTA (70 % y 77.3% respectivamente).⁹⁹ Otro ejemplo de esta aplicación,

es el empleo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Ralstonia metallidurans* como inóculos en rizobio en la planta de maíz, incrementando la fitorremediación de Cr y Pb.¹⁰⁰ En el caso de elementos radioactivos como el uranio, se ha encontrado que la pioverdina y desferoxamina B producida por *P. fluorescens* y *Streptomyces pilosus*, respectivamente, son capaces de reducir su solubilidad en agua.^{101,102} Algunos sideróforos hidroxámicos producidos por bacterias marinas han mostrado capacidad de complejar polonio y protactinio.¹⁰³

Por otra parte, la bacteria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* que es capaz de degradar hidrocarburos del petróleo, produce el sideróforo petrobactina. Aunque, no existen estudios que relacionen directamente el efecto de los sideróforos sobre los hidrocarburos, se sabe que la petrobactina es capaz de captar el Fe³⁺ a partir de los componentes del petróleo. Todavía, se requieren más estudios que permitan establecer si la producción de este sideróforo es esencial en el proceso de biorremediación.¹⁰⁴

2. Aplicaciones de los sideróforos en la detección bacteriana

Recientemente se han estudiado algunas estrategias para el desarrollo de métodos de detección de bacterias patógenas usando sideróforos y nanomateriales para ampliar su campo de aplicación. A continuación, se describirán las características de las nanopartículas magnéticas y su versatilidad para ser funcionalizadas con diversas biomoléculas.

2.1. Nanopartículas magnéticas y síntesis de conjugados

El uso de nanopartículas magnéticas (MNP, por sus siglas en inglés *Magnetic Nano Particles*) en aplicaciones biológicas y clínicas es sin duda uno de los campos de investigación con más retos en el campo de la bio-nanotecnología.¹⁰⁵ Una de las características más notables de estos materiales es la gran facilidad de síntesis y funcionalización junto con sus propiedades físicas y térmicas.¹⁰⁵

Primero es necesario destacar el rango de tamaño, el cual puede llegar a ser más pequeño o comparable con células (10-100 µm), virus (20-450 nm), proteínas (5-50 nm) o genes (2 nm de ancho por 10-100 nm de largo). Esto significa que se puede estar muy cerca de la entidad biológica de interés. Por lo tanto, su funcionalización provee control o el direccionamiento de la interacción con la entidad biológica de estudio.¹⁰⁵ Segundo, la relación entre el tamaño de partícula y el superparamagnetismo, permite que respondan a un campo magnético mientras son expuestas a éste, pero en su ausencia se mantienen en una suspensión homogénea,

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

lo que facilita las interacciones en disoluciones de sistemas *in vivo* y su manipulación por medio de campos magnéticos externos.¹⁰⁶

Teniendo en cuenta esto, se puede definir la funcionalización de MNPs como “la adición de un grupo funcional que modifica la superficie y que facilita su organización, otorga compatibilidad y potencializa las aplicaciones”.¹⁰⁷ Los avances de la nanotecnología han permitido la producción de MNPs con morfologías de superficie específicas y la posibilidad de manipular su superficie teniendo en cuenta la aplicación. Existen tres aspectos claves que se deben tener cuenta dependiendo la aplicación:

- La estabilidad de las MNPs en medio acuoso, puesto que los procesos bioquímicos ocurren en este medio.
- Aspectos relacionados con la salud y la seguridad, pues es necesario estudiar los efectos en el organismo y en el medio ambiente.
- La conjugación con moléculas bioactivas para aplicaciones específicas.

2.2. Requerimientos para la funcionalización de MNPs

El uso de MNPs para aplicaciones biológicas específicas requiere la funcionalización de su superficie para otorgarle propiedades que les permitan ser compatibles en disolución acuosa para interactuar con la entidad biológica deseada. Los requerimientos a tener cuenta son la prevención de la agregación, el control magnético, estabilización de la superficie, biocompatibilidad, baja toxicidad y permitir la unión de sustancias con actividad biológica (ADN, proteínas, antibióticos, péptidos, entre otras).¹⁰⁵ Estos requerimientos serán discutidos con mayor detalle a continuación.

Prevención de la agregación

Las MNPs tienen la tendencia de asociarse observándose el fenómeno de agregación y aglomeración, que está controlado por factores termodinámicos y magnéticos. La prevención de la agregación se logra mediante la funcionalización, logrando así una suspensión estable que permita tanto la interacción con las entidades biológicas y su control magnético.¹⁰⁸ La estabilidad se logra llegando al equilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas. Las atracciones isotrópicas de corto rango son inducidas por fuerzas de van der Waals, mientras que las fuerzas de repulsión electrostáticas pueden ser atenuadas por la adición de sal a la suspensión.^{109,110} Estas

fuerzas inducen las interacciones anisotrópicas, por lo que, la estabilización se logra mediante el control de una o ambas fuerzas de repulsión estérica y electrostática.¹¹¹

Estabilización estérica

Las fuerzas de repulsión estérica se deben tener en cuenta cuando las MNPs se han recubierto con polímeros para su posterior funcionalización, lo cual es difícil de predecir y cuantificar. Recubrir las MNPs con un ligando o embeberlas en una matriz inorgánica o polimérica ayuda a alcanzar la estabilidad de la suspensión, y este efecto depende de la densidad del polímero, y del recubrimiento que se forma con interacciones irreversibles y de la calidad de los disolventes empleados. La estabilización ocurre gracias al aumento del volumen de la superficie, impidiendo que los centros magnéticos se aglomeren, disminuyendo la entropía y aumentando la presión osmótica entre las MNPs (Figura 24A).^{112,113}

Estabilización electrostática

La estabilización electrostática puede ser entendida a través de potencial de difusión, cuyo valor se encuentra cercano al potencial zeta y el radio de Debye-Huckel, ambos dependientes de la fuerza iónica y el pH del medio en el cual se dispersan las MNPs.^{114,115}

El factor de estabilidad coloidal como función de la sal añadida permite encontrar una concentración crítica de iones donde ocurre la coagulación, es decir que los iones en disolución logran el efecto de repulsión entre las MNPs y tanto por la desaparición de la doble capa eléctrica, dando paso a una suspensión estable por un efecto electrostático (Figura 24B).¹¹⁶⁻¹¹⁸

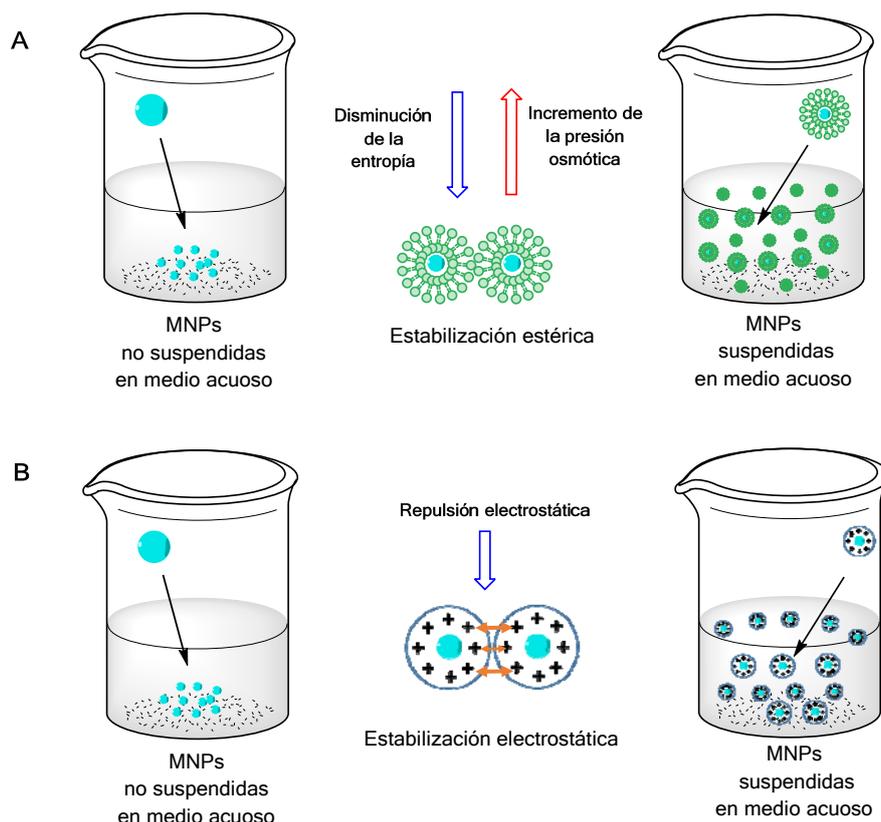


Figura 24. Tipos de estabilización de las MNPs en suspensión **A.** Estabilización estérica; **B.** Estabilización electrostática.¹⁰⁵

Compatibilidad con el medio acuoso

Muchas de las MNPs usadas en aplicaciones biológicas son sintetizadas a través de procesos que requieren el uso de disolventes orgánicos y altas temperaturas. Sin embargo, las MNPs resultantes suelen ser solubles en disolventes apolares como cloroformo, hexano y tolueno, lo cual las hace incompatibles con disoluciones acuosas. La compatibilidad se logra conjugando las MNPs con ligandos hidrofílicos. Existen varias estrategias como la adición de surfactantes donde la parte hidrofóbica queda en contacto con la superficie y la parte hidrofílica queda dispuesta en la parte externa mejorando su solubilidad en agua.¹⁰⁵ Otra estrategia consiste recubrir las MNPs con sílice que, debido a su carácter hidrofílico, también mejora la compatibilidad en el medio acuoso.¹¹⁹

Control magnético

La saturación magnética (M_s) es un parámetro esencial que describe la respuesta magnética de las MNPs. Para que pueden ser separadas y transportadas por medio de un campo magnético externo es necesario se retenga un alto M_s .¹²⁰ Una parte importante en la funcionalización de las MNPs es que debe permitir que las propiedades magnéticas se mantengan. Se ha observado además que el control es

más efectivo cuando se forman pequeños aglomerados en comparación de cuando las partículas se encuentran como entidades individuales.¹⁰⁵

Protección, estabilidad de la superficie de las MNPs y biocompatibilidad

La superficie de las MNPs debe ser protegida de la influencia de factores externos que puedan afectar las propiedades magnéticas. La funcionalización debe prevenir reacciones no deseadas de las MNPs con los componentes biológicos así como debe protegerlas de la oxidación promovida por el oxígeno.¹²¹ Por ejemplo, los recubrimientos poliméricos protegen la superficie en sus tres dimensiones, a través de la polimerización del monómero en toda la superficie, por formación de enlaces cruzados y formación de una capa polimérica unida covalentemente a través de grupos funcionales en la superficie.^{122,123}

Por otra parte, las MNPs pueden resultar altamente tóxicas debido su alta área superficial y su reactividad química, ya que son capaces de generar especies reactivas de oxígeno que penetran las células y tejidos. El tamaño, hidrofilia y carga son factores fundamentales en cuanto a biocompatibilidad. Estas propiedades dependen de la masa y la carga de las moléculas que forman el recubrimiento. Las MNPs cargadas negativamente exhiben una buena biocompatibilidad, mientras aquellas que tienen carga positiva han demostrado tener mejor compatibilidad en sistemas biológicos, sin embargo esto depende del efecto de ionización y de adsorción en la diana biológica deseada.¹²³⁻¹²⁵

2.1. Métodos de funcionalización de superficie

Funcionalización de superficie *in situ*

El método de funcionalización *in situ* se hace en un solo paso. Con este procedimiento se consigue una reducción del tamaño de partícula y una mejor distribución. Tanto la funcionalización como la formación de las MNPs se consiguen simultáneamente. Durante la reacción, el proceso de recubrimiento empieza en cuanto se inicia la nucleación, previniendo el crecimiento de las partículas. Un aspecto limitante de este método es la incompatibilidad de los grupos funcionales con el proceso de formación de las partículas. Los grupos más usados son los carboxilatos, fosfonatos y tioles.¹⁰⁵

Funcionalización de la superficie post síntesis

Con este método la formación de las MNPs y la modificación de su superficie se hace en dos pasos. Se emplean compuesto bifuncionales, con un extremo que se une

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

directamente a la superficie de la MNP y otro con un grupo que permita la unión de otros ligandos. Este procedimiento permite cubrir la totalidad de la partícula por medio de enlaces fuertes, teniendo en cuenta principalmente que la afinidad por la superficie debe ser fuerte y no deben formarse agregados.¹⁰⁵

2.2. Mecanismos de funcionalización

La funcionalización de MNPs puede darse por medio de tres mecanismos: adición de ligandos, intercambio de ligandos y encapsulación, los cuales serán descritos a continuación.^{126,127}

Adición de ligando

Este procedimiento consiste en añadir un ligando sobre la MNP sin eliminar un ligando existente (Figura 25A). Existen cuatro tipos de metodologías: (1) Adición de ligandos sobre las MNPs preparadas sin recubrimiento, (2) adición indirecta de ligando; donde primero se prepara una superficie de carácter inorgánico sobre la superficie de la MNP y posteriormente se une un ligando, (3) recubrimiento por medio de atracciones hidrofóbicas para intercalar grupos polares y apolares, en el caso que ya exista una superficie hidrofóbica sobre la MNP y (4) la formación de enlaces covalentes con un ligando.¹⁰⁵

Intercambio de ligando

En el intercambio de ligando, usualmente un ligando hidrofóbico es reemplazado por un ligando hidrofílico (Figura 25B). De esta forma, las MNPs se transfieren de la fase orgánica a la fase acuosa como resultado del intercambio, consiguiéndose así la hidrofilia necesaria para aplicaciones biológicas.¹⁰⁵

Encapsulación

Las MNPs recubiertas con ligandos hidrofóbicos pueden ser nuevamente recubiertas con materiales anfífilos en el proceso de encapsulación (Figura 25C). De esta manera, se logra que la parte polar esté en contacto con la disolución, compatibilizando la MNP con el medio acuoso. Este método también permite conjugación posterior con otros ligandos.¹⁰⁵

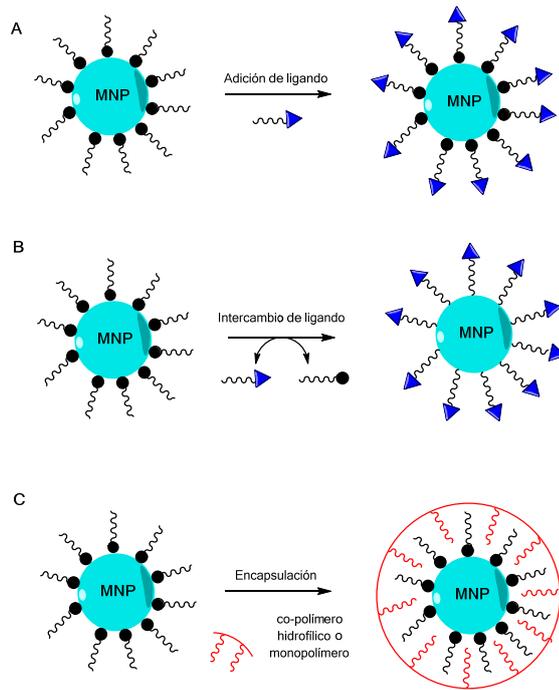


Figura 25. Mecanismos de funcionalización de MNPs por medio de diferentes estrategias **A.** Adición de ligando, **B.** Intercambio de ligando, **C.** Encapsulación.¹⁰⁵

2.3. Materiales usados para la funcionalización de MNPs

La funcionalización de MNPs permite ampliar su rango de aplicaciones biológicas, permitiendo conseguir estabilidad, orientación específica y reconocimiento de especies biológicas. Pueden usarse diferentes tipos de materiales para la modificación de la superficie de las MNPs y pueden ser categorizados como se muestra en la Figura 26.

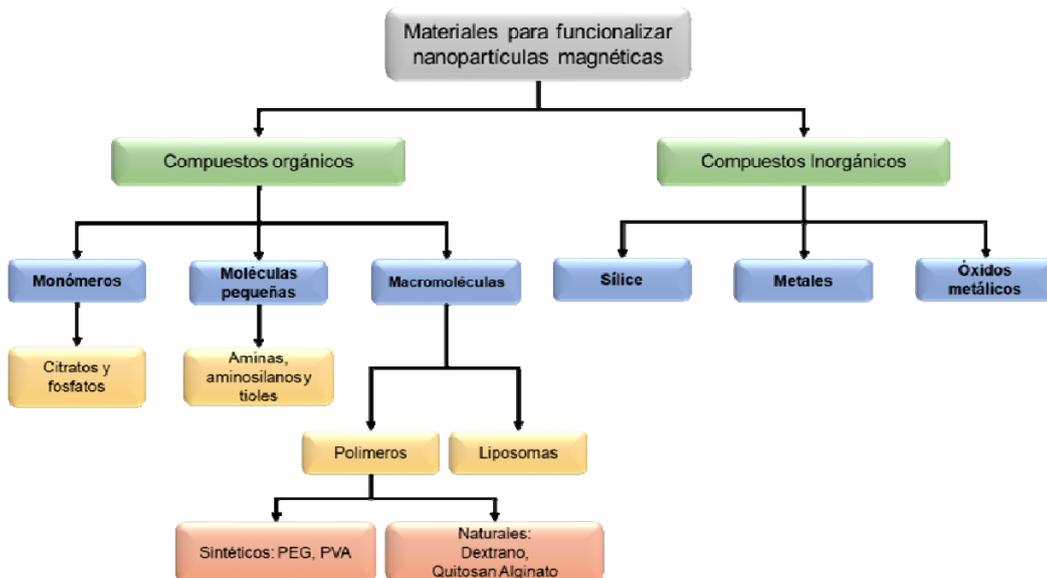


Figura 26. Materiales usados para la funcionalización de nanopartículas magnéticas.

2.3.1. Compuestos orgánicos

Las MNPs funcionalizadas con compuestos orgánicos son empleadas en aplicaciones biológicas por tener características como biocompatibilidad y biodegradabilidad. Proveen una gran variedad de grupos funcionales tipo aldehído, amino, carboxilo o hidroxilo que posteriormente permiten ser usados para la síntesis de conjugados con moléculas más complejas como anticuerpos, ADN, enzimas o proteínas.¹⁰⁵

Dentro de los compuestos que suelen utilizarse, se encuentran el citrato y los fosfatos considerados como unidades monoméricas, aminas, amino silanos y tioles que son clasificados como moléculas pequeñas y finalmente polímeros y liposomas denominados macromoléculas (Figura 26).

Monómeros

- **Citratos.** La superficie de las MNPs puede ser estabilizada en medio acuoso mediante la adsorción de ácido cítrico. Otros monómeros que contienen unidades de citrato con múltiples grupos carboxilato son muy utilizados para lograr estabilidad coloidal. Los citratos se coordinan en la superficie de las nanopartículas por medio de uno o dos grupos carboxilato dependiendo del tamaño y la forma de la partícula. Los grupos carboxilo restantes que quedan en contacto con la disolución brindan una carga negativa suficiente para dar el carácter hidrofílico.^{128,129}
- **Fosfatos.** Pueden ser usados ácidos alcan- y alquensulfónicos como surfactantes, interactuando de forma efectiva con la superficie de las MNPs y estabilizando su dispersión en medio acuoso.^{130,131} Este tipo de ligandos forman una especie de bicapa, en donde la primera capa se une fuertemente a la superficie de las MNPs. La formación de un enlace Fe-O se ha confirmado por medio de espectroscopia infrarroja. Este recubrimiento resulta en una encapsulación de las MNPs brindando una buena biocompatibilidad.^{132,133}

Moléculas pequeñas

La funcionalización con moléculas pequeñas se caracteriza por ser rápida y permitir conjugación por medio de procedimientos sencillos. Este tipo de compuestos permite estabilizar las MNPs, se consiguen radios hidrodinámicos pequeños, se protege de cambios químicos y disminuye la toxicidad, lo cual es una ventaja para aplicaciones

biomédicas. Además, los grupos funcionales expuestos en la superficie permiten la conjugación con moléculas bioactivas.^{134,135}

- **Aminas y amino silanos.** Aminas de cadena corta y diferentes tipos de aminosilanos han sido utilizados para mejorar la compatibilidad de las MNPs en medio acuoso. Los grupos amino terminales pueden ser usados como puente de unión para la posterior funcionalización con moléculas con actividad biológica como péptidos, antibióticos o fármacos entre otros.^{136,137}
- **Tioles.** Los tioles poseen una alta afinidad por la superficie de las MNPs. El ácido 2,3-*meso*-dimercaptosuccínico (ADMS) tiene dos grupos carboxilo y dos tioles. Al funcionalizar por medio de un intercambio de ligandos se obtiene una suspensión estable de las MNPs. Este tipo de compuestos se usa específicamente para aplicaciones de transporte de medicamentos a su diana farmacológica.¹³⁸

Macromoléculas

El uso de macromoléculas, como los polímeros, es un método de funcionalización alternativo a las moléculas pequeñas. Brindan una excelente estabilidad coloidal, puesto que este tipo de recubrimiento aumenta las fuerzas de repulsión balanceando el carácter magnético y las fuerzas de atracción de Van de Waals. Las MNPs pueden ser adaptadas a las propiedades deseadas escogiendo polímeros pasivantes o activantes en las adecuadas condiciones de reacción. En la tabla 7 se presentan los diferentes tipos de macromoléculas empleadas y sus propiedades.¹³⁹

Tabla 7. Polímeros y sus características en la funcionalización de nanopartículas magnéticas¹³⁹

Tipos de polímeros	Polímeros	Características
Polímeros naturales	Dextrano	Permite interacciones polares con la superficie de las MNPs, circulan mejor por el torrente sanguíneo, mejorar la estabilidad y la biocompatibilidad
	Quitosano	No tóxico, alcalino, hidrofílico, muy utilizado como un sistema no viral de transporte de genes y biocompatible
	Almidón	Mejora la biocompatibilidad, excelente para imágenes de resonancia magnética y liberación controlada de fármacos
	Gelatina	Agente gelificante, emulsificante hidrofílico y biocompatible
	Alginato	Mejora la estabilidad y biocompatibilidad
Polímeros sintéticos	Polietilenglicol (PEG)	Mejora la hidrofiliidad, biocompatibilidad y mejor transporte por torrente sanguíneo
	Alcohol polivinílico	Previene la formación de aglomerados, mejora las

	(PVA)	monodispersiones
	Ácido poliláctico (APL)	Mejora, biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad en el cuerpo humano
	Polimetilmetacrilato (PMMA)	Usado como transportador de medicamentos termosensibles y permite separación de células
	Ácido poliacrílico (APA)	Mejora la estabilidad, biocompatibilidad

2.3.2. Compuestos inorgánicos

Uno de los retos más grandes cuando se busca funcionalizar MNPs es la búsqueda de un ligando que proteja y permita la conjugación. Sin embargo, cuando se considera la funcionalización por medio de compuestos orgánicos, es necesario seleccionar grupos funcionales específicos que tengan una alta afinidad a la superficie de las MNPs.¹⁴⁰ Cuando se emplean compuestos orgánicos, el control simultáneo de la forma, estabilidad, biocompatibilidad, estructura de la superficie y propiedades magnéticas todavía siguen siendo un tema de estudio, lo cual limita su uso en aplicaciones biológicas. Por otra parte, usar recubrimientos de naturaleza inorgánica evita la oxidación de la MNP y aumenta las posibilidades de su uso en sistemas vivos. Por tanto su empleo se puede extender a aplicaciones tales como biomarcado, separación y catálisis. Los materiales más empleados son: la sílice, el oro y la plata, entre otros.^{116,139}

- **Sílice.** La sílice es uno de los materiales más empleados para el recubrimiento de MNPs. Este recubrimiento se logra de forma similar al mecanismo de adsorción de ligandos y presenta muchas ventajas como la estabilidad coloidal, fotoestabilidad, y solubilidad en agua.^{118,141} Uno de los métodos más empleados es el bien conocido proceso de Stöber, en donde la sílice se forma *in situ* a través de un proceso de hidrólisis y condensación del precursor como el ortosilicato de tetraetilo (TEOS).¹⁴² Gracias a este recubrimiento es posible la funcionalización con biomoléculas empleando alcoxisilanos con diferentes grupos funcionales, como el aminopropilsilano o el mercaptopropilsilano.¹⁰⁵
- **Recubrimiento con metales.** Los recubrimientos con metales actúan como una capa protectora relativamente inerte y se lleva a cabo a través de un proceso químico. El recubrimiento metálico permite la funcionalización de una forma más sencilla que las MNPs desnudas. El oro es uno de los metales más usados ya que posee una gran afinidad por los enlaces sulfuro, lo cual permite

synthetizar una gran variedad de conjugados con biomoléculas. Las MNPs recubiertas con oro son muy estables dado su carácter inerte.¹⁴³ La plata es otro elemento empleado en el recubrimiento de MNPs por sus propiedades antisépticas, debido a su actividad germicida.¹⁴⁴ El oro y la plata juntos producen un efecto sinérgico que pueden mejorar sus aplicaciones biomédicas. Algunos elementos del grupo de las tierras raras pueden ser usados también. Por ejemplo, se ha sintetizado una nanoestructura de tipo $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NaLuF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ que atenúa los rayos X y mejora el incremento de la luminiscencia por excitación debajo de 980 nm. El uso de este material permite obtener imágenes multimodales de resonancia magnética *in vivo*, tomografía computacional (TC) e imágenes de luminiscencia en ratones con tumores.¹⁴⁵

- **Óxidos metálicos y sulfuros.** El recubrimiento con óxidos y sulfuros metálicos protege al centro magnético de la oxidación. Además, si se emplean otros metales magnéticos, las propiedades del material cambian de forma drástica. La combinación de dos fases magnéticas permite aumentar el valor de saturación de la magnetización (M_s) y la coercitividad (H_c). La funcionalización de las MNPs con óxidos y sulfuros brinda propiedades ópticas y eléctricas que amplía su rango de aplicaciones.^{146,147}

2.4. Bioconjugación

Se han estudiado diferentes estrategias de funcionalización para mejorar la estabilidad en agua y conferir compatibilidad en ambientes fisiológicos. La conjugación con biomoléculas bioactivas pequeñas, como pueden ser los péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, permite la interacción con dianas biológicas aumentando su rango de aplicación. Para escoger una estrategia de funcionalización se debe tener en cuenta factores tales como el tamaño, la forma, la estructura, la química de la superficie y el tipo material de las MNPs, y de esta manera determinar los ligandos y el grupo funcional más adecuado para la bioconjugación.¹⁰⁵

La conjugación se puede dar por medio de interacciones físicas o mediante la creación de enlaces covalentes. En el primer caso, la monovalencia permite realizar uniones sencillas del ligando y la MNPs. Cuanto mayor sea el número de grupos que puedan interaccionar por carga, mayores serán las interacciones desordenadas y como resultado se obtendrá una sobre-conjugación perdiendo la actividad biológica. En el caso de proteínas, enzimas y anticuerpos se debe identificar el sitio de unión, para que el centro activo quede expuesto y dichas entidades biológicas no pierdan la actividad. Por otra parte, en algunos casos se requiere una conjugación reversible

cuando se busca un sistema de liberación controlada de fármacos en el centro activo.¹⁰⁵

2.4.1. Estrategias de bioconjugación

Como se ha mencionado anteriormente, existen dos aproximaciones para lograr la bioconjugación de MNPs: por medio de interacciones físicas y por formación de enlaces covalentes. A continuación se describirán los mecanismos por los cuales se logra la conjugación con biomoléculas.

- **Interacciones físicas.** Este tipo de conjugación tiene como ventajas la unión rápida de ligandos, su alta eficiencia y que no requiere de pasos de síntesis intermedios. En esta categoría se incluyen las interacciones electrostáticas, hidrofóbicas/hidrofílicas y de afinidad (Figura 27). De los mecanismos anteriormente mencionados, el método de funcionalización por interacciones electrostáticas es uno de los más empleados (Figura 27A). Por ejemplo, ha resultado ser muy útil en el ensamblaje de plásmidos sobre la superficie de las MNPs, ya que la formación de este tipo de conjugados se debe a la alta carga negativa que presentan los grupos fosfatos en los ácidos nucleicos. Sin embargo el pH y la fuerza iónica deben ser cuidadosamente optimizados.¹⁴⁸

Por otra parte, la funcionalización mediante interacciones hidrofóbicas (Figura 27B) se utiliza para absorción de fármacos de carácter hidrofóbico sobre la superficie de las MNPs. Una vez el conjugado se encuentra en el medio intracelular, el fármaco se libera por degradación del recubrimiento.¹⁴⁹ Las interacciones por afinidad permiten una funcionalización fuerte y específica. Como se muestra en la Figura 27C, la estreptavidina se une de manera específica a la superficie biotinilada de la MNP. La unión formada es una las interacciones no covalentes más fuertes en comparación con las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, además no es sensible a las condiciones ambientales, como cambios de pH, salinidad o hidrofilia.¹⁵⁰

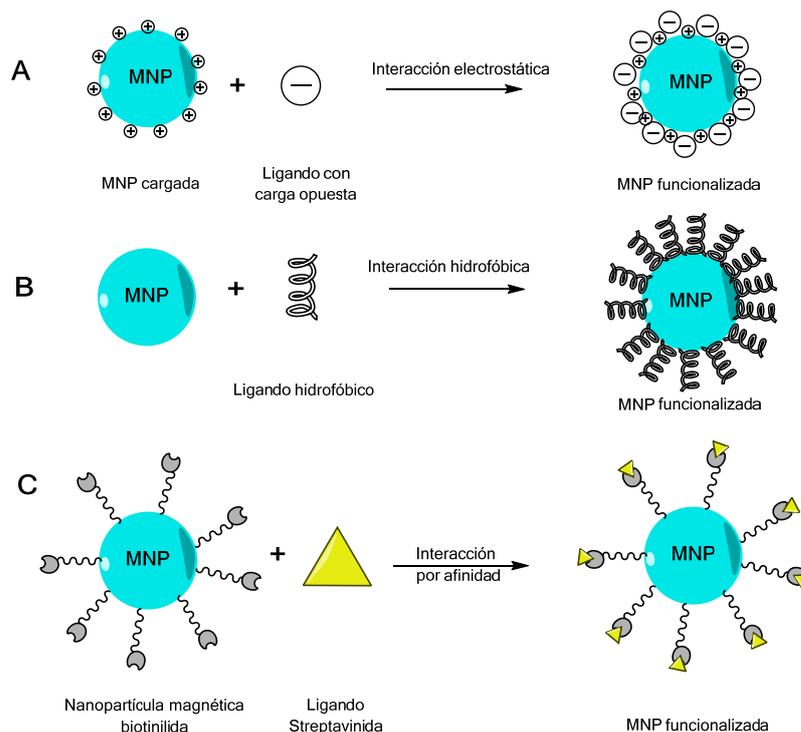


Figura 27. Tipos de funcionalización de MNPs por interacciones físicas **A.** por interacción electrostática **B.** por interacciones hidrofóbicas y **C.** interacción por afinidad.¹⁰⁵

- **Química covalente.** La conjugación mediante enlaces covalentes permite formar uniones más fuertes y estables que pueden ser formados específicamente entre diferentes grupos funcionales. Típicamente se emplean grupos amino, tioles, aldehídos, entre otros (Figura 28). Esta estrategia se utiliza de forma habitual para conjugar moléculas pequeñas como pigmentos, péptidos pequeños y anticuerpos. A excepción de los grupos amino, algunos grupos funcionales pueden generar reacciones de entrecruzamiento, disminuyendo la posibilidad de unir efectivamente la biomolécula deseada.¹⁰⁵ Dentro de las reacciones más empleadas se encuentra la reacción de acoplamiento de carbodiimida (Figura 28A) en donde se forma un enlace amida entre la MNP y la biomolécula; acoplamiento con maleimida (Figura 28B) usado para conjugar aminas primarias de proteínas con grupos tioles; y por formación de iminas (Figura 28C).¹⁰⁵

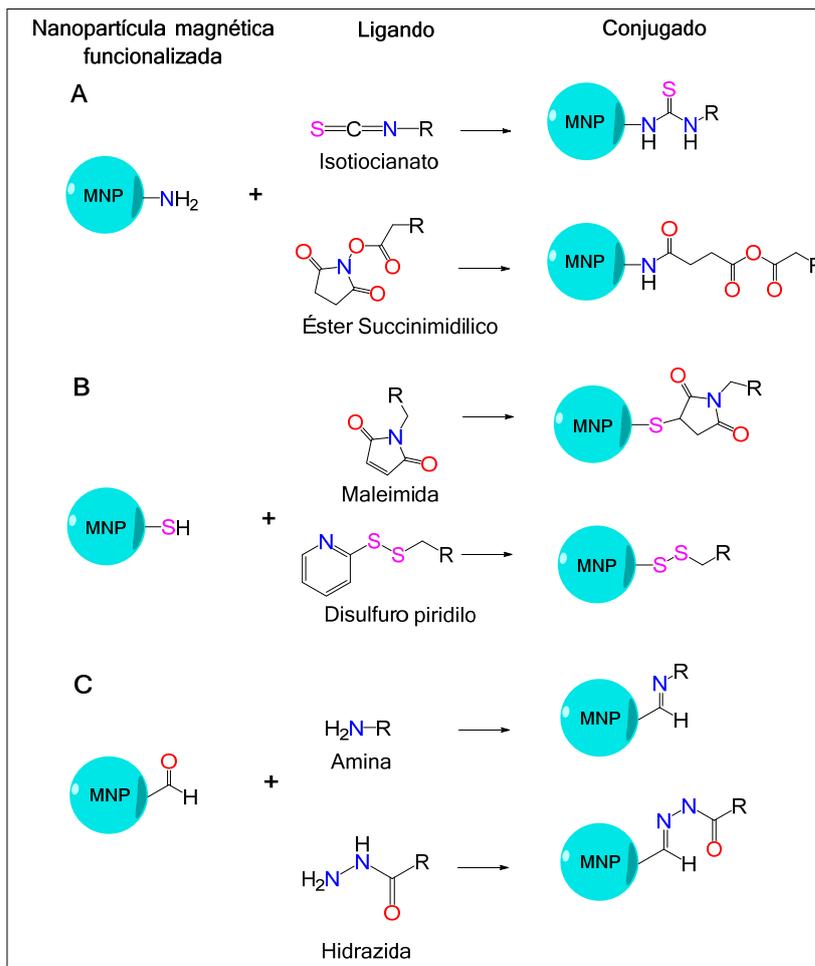


Figura 28. Funcionalización de MNPs por interacción covalente **A.** Unión de ligando mediante grupos amino **B.** Unión de ligando mediante grupos tiol y **C.** Unión de ligando mediante grupos aldehído.¹⁰⁵

2.5. Aplicaciones de las MNPs

El uso de las nanopartículas magnéticas para aplicaciones biológicas y clínicas es una de las ramas de investigación de la nanotecnología que presenta grandes desafíos. Las propiedades intrínsecas de este material son las que han impulsado los esfuerzos en el desarrollo de aplicaciones biomédicas como las de hipertermia magnética, resonancia magnética nuclear de imágenes, liberación controlada de fármacos, detección de bacterias, marcaje celular y separación magnética y enriquecimiento de ADN.¹⁰⁵

2.5.1. Hipertermia magnética

La hipertermia es una técnica que se usa en el tratamiento del cáncer. Las células cancerígenas se someten a un aumento de temperatura provocando su muerte (42-46 °C). Una de las ventajas principales de esta técnica es el tratamiento local, reduciendo

los efectos secundarios en comparación con la quimio- y radioterapia. Adicionalmente, se ha demostrado su efectividad en combinación con tratamientos convencionales.^{151,152} Las nanopartículas magnéticas se inyectan como fluidos directamente en el tumor y se aplica un campo magnético alternante que aumenta la temperatura. De esta forma, se debilita o causa la muerte celular de manera localizada.¹⁵³

2.5.2. Resonancia magnética de imagen (RMI)

La resonancia magnética de imagen es una técnica no invasiva esencial para obtener imágenes espaciales de alta resolución de órganos internos. RMI es una de las herramientas más utilizadas para determinar la presencia, localización y tamaño de un tumor. Sin embargo, no es lo suficientemente potente para el diagnóstico de cáncer metastásico o células cancerígenas individuales.¹⁵³

Las imágenes de RMI son obtenidas gracias a la relajación de los spines electrónicos de los protones en el cuerpo humano, que son excitados mediante una radiofrecuencia y un fuerte campo magnético. Por sí sola, esta técnica permite obtener imágenes detalladas, aunque, no es posible diferenciar entre los tejidos normales y lesiones pues la diferencia entre el tiempo de relajación es muy pequeña. Por tanto, con la combinación de agentes de contraste y las MNPs se puede incrementar el nivel de visualización en MRI cuando se usan biomarcadores específicos a nivel molecular y celular.

Se utilizan principalmente dos tiempos de relajación para la generación de las imágenes (T_1 y T_2). Los agentes de contraste basados en Gd incrementan la señal en T_1 .¹⁵⁴ Por otra parte, el óxido de hierro superparamagnético (SPIO, *superparamagnetic iron oxide*) genera un fuerte contraste en T_2 .¹⁵⁵ El uso de este agente nanoparticulado fue el primer sistema desarrollado para obtener imágenes de MRI para hígado que todavía se utiliza clínicamente.¹⁵⁶

2.5.3. Liberación controlada de fármacos

El premio nobel de medicina Paul Ehrlich propuso, que si un agente puede ser llevado selectivamente a un microorganismo causante de una enfermedad, entonces puede transportar una toxina capaz de eliminarlo, lo que se denomina la “bala mágica” que sería capaz de matar el organismo diana.¹⁵⁷ El mecanismo de liberación controlada de fármacos requiere transportarlos directamente a la diana farmacológica. Para esto se deben cumplir cuatro elementos clave: retener, evadir, atacar y liberar.

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

Las formulaciones destinadas a la administración intravenosa requieren una carga de fármaco eficiente en algún tipo de vehículo portador, de modo que circule por el torrente sanguíneo para llegar a los lugares del cuerpo en donde debe actuar.¹⁵⁸

El fármaco debe ser liberado en respuesta a un estímulo externo como un cambio de pH, fuerza iónica o de temperatura en el lugar de acción. Preferiblemente, el sistema transporte puede ser natural o sintético, brindando un soporte no tóxico y que pueda ser manufacturado a nivel industrial. Estos sistemas tienen como ventaja el uso de dosis más bajas de fármacos, efecto uniforme del principio activo y reducción de los niveles de fluctuación del fármaco en la circulación.¹⁵⁸

Las MNPs son un candidato ideal para la liberación controlada de fármacos porque no solo actúa como transportadores, dirigiendo las nanopartículas al lugar deseado a través de un campo magnético, sino también porque es posible recubrir o depositar el fármaco sobre la superficie de la MNP.¹⁵⁸ Las diferencias morfológicas de las superficies de los tejidos normales y aquellos afectados por cáncer permite una penetración selectiva de las MNPs en el tumor. Los tumores sólidos se caracterizan por ser vascularizados, lo que promueve la penetración y retención de las MNPs en el tumor. Por otra parte, también es posible usar la liberación controlada del fármaco asistido por hipertermia, obteniendo el doble efecto tanto del fármaco como la muerte celular por el aumento de la temperatura.¹⁵⁹ Diferentes fármacos como paclitaxel, doxorubicina, epirubicina y metotrexato han sido incorporados con éxito a superficies de las MNPs.¹⁰⁵

2.5.4. Detección de bacterias

El interés en el uso de nanopartículas magnéticas para la detección de bacterias se debe a factores relacionadas con su tamaño, su comportamiento magnético y su habilidad para ser funcionalizadas con biomoléculas tales como proteínas y sondas de nucleótidos. Habitualmente la detección de bacterias en bajas concentraciones requiere de mucho tiempo con las técnicas convencionales. Una de las ventajas más importantes de las MNPs es el uso de un imán para la separación de las bacterias en una muestra biológica.¹⁶⁰ Para lograr una interacción específica, las MNPs son funcionalizadas con moléculas de bioconocimiento como anticuerpos, aptámeros, proteínas y carbohidratos, lo que permite a la bacteria el reconocimiento específico.¹⁶¹ Un ejemplo de estos casos, es la detección de *E. coli* en muy baja concentración por medio de un conjugado de vancomicina y nanopartículas de FePt.¹⁶²

2.5.5. Inmovilización de enzimas

En el proceso de inmovilización de enzimas se requiere confinar estas proteínas en una superficie y que el centro activo permanezca expuesto, conservando su actividad catalítica. Como una estrategia prometedora, se han empleado nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) para el soporte de enzimas, dada su gran área superficial, movilidad y alta transferencias de masa. La alta relación superficie-volumen promueve la formación de conjugados con enzimas manteniendo la capacidad de catálisis. El control magnético permite recuperar la enzima previniendo la contaminación del producto final, aumentar la estabilidad de la enzima y por lo tanto disminuir los gastos de operación.^{163,164}

Un ejemplo de este caso es la inmovilización de celulasa, la cual retiene cerca de un 64% de su actividad después de ser usada durante seis ciclos catalíticos. Las nanopartículas de cobalto y ferrita funcionalizadas con grupos amino permitieron la unión covalente de celulasa, pudiéndose usar a gran escala para aplicaciones industriales.¹⁰⁸ En la tabla 8 se presentan diferentes aplicaciones de inmovilización de enzimas en nanopartículas magnéticas.

Tabla 8. Uso de MNPs para bioaplicaciones de inmovilización de enzimas.¹⁰⁵

Enzima	Nanopartícula utilizada	Aplicación
α-Amilasa	Fe_3O_4 recubierta de celulosa	Degradación de almidón
Colesterol oxidasa	Fe_3O_4	Análisis de colesterol total en suero
Haloalcano deshalogenasa	Óxido de hierro recubierto de sílice	Producción de proteínas que contienen secuencias de deshalogenasa
Queratinasa	Fe_3O_4	Síntesis de queratinasa
Lactasa	Quitosan-MNPs	Biorremediación
Lipasa	Fe_3O_4	Hidrólisis de <i>p</i> -nitrofosfofenol (pNFF)

2.5.6. Marcaje de células y separación magnética

en medicina es importante, en ciertas ocasiones la separación de entidades biológicas específicas de su ambiente, para que la muestra pueda ser concentrada para su posterior análisis. El uso de MNPs biocompatibles es una de las maneras de lograrlo. Para ello se requiere que la entidad biológica pueda ser localizada o marcada y luego separada por medio de una separación basada en fluidos magnéticos. El marcaje es posible gracias la modificación química en la superficie de las MNPs.¹⁰⁵ La

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

funcionalización de MNPs con anticuerpos, hormonas o ácido fólico permiten la unión específica a ciertas enzimas. Por ejemplo, MNPs recubiertas con agentes inmuno-específicos han permitido la unión a glóbulos rojos, vesículas de Golgi y células de cáncer de pulmón.¹⁵⁵

Gracias a la alta sensibilidad de esta técnica se han podido detectar células cancerosas en sangre, incluso a baja concentración.¹⁶⁵ Otra aplicación ha combinado la separación magnética con la detección óptica. Las enzimas marcadas con sondas fluorescentes permiten observar el número de células marcadas sobre una superficie y la movilidad de las MNPs permite menor tiempo de reacción y el uso de menos volumen de reactivos en inmunoensayos estándar.^{166,167} También se ha desarrollado un método para inmovilizar anticuerpos, separados por precipitación magnética que posteriormente son re-dispersados en ausencia del campo magnético externo. Pueden ser modificados usando un anticuerpo secundario para cuantificarlos por medio que resonancia magnética.¹⁶⁸

2.5.7. Enriquecimiento de ADN

Los sensores altamente selectivos al ADN son una prioridad en el campo de la ingeniería genética. El estudio del ADN permite el diagnóstico de enfermedades genéticas, la detección de agentes infecciosos, y la utilización de la terapia genética y la identificación en el campo forense y ambiental.¹⁰⁵ La técnica de reacción de polimerasa en cadena (*polymerase chain reaction*, PCR), permite la amplificación de genes a partir de una baja cantidad de ADN para obtener mayores cantidades. Sin embargo, esta técnica demanda tiempo de preparación de muestra, equipos sofisticados y operadores entrenados. Algunos estudios han demostrado que nanopartículas magnéticas de cobalto ferrita permiten el aislamiento de ADN genómico por procesos de adsorción y desorción que permiten su purificación.¹⁶⁹

En este capítulo se describirá la síntesis de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ (magnetita), el proceso de recubrimiento y funcionalización, hasta obtener el conjugado con el sideróforo feroxamina.

3. Objectives

The main goal of the present chapter of this PhD thesis is the synthesis of a conjugate MNP-siderophore, and its evaluation for pathogenic bacteria detection on the basis of the molecular recognition between the siderophore and the outer membrane protein receptor.

To achieve the main goal, the following specific objectives were proposed:

- Synthesis of coated and functionalized magnetic nanoparticles of Fe_3O_4 to allow the conjugation with the siderophore feroxamine ($\text{MNP}@ \text{SiO}_2 @ \text{NH}@ \text{Fa}$).
- Characterization of intermediates of the MNPs by Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Magnetization hysteresis loops, Thermogravimetry analysis (TGA), X-ray diffraction, Energy-dispersive, X-ray, FT-IR and Raman spectroscopy.
- Preparation of the conjugate between functionalized MNP's and the siderophore feroxamine with a succinyl terminal group as a linker.
- Evaluation for the capture of wild type (WC-A) and a mutant lacking feroxamine receptor FoxA (FoxA WC-A 12-8) *Yersinia enterocolitica* strains.
- Synthesis of an enterobactin analogue for its possible use as MNP-conjugate.

4. Results and Discussion

The development of rapid, sensitive and reliable methods for the detection and identification of infectious microorganisms is one of the main concerns in food and health industries. Nowadays, this interest became more important with the emerge of increasing virulent strains of common pathogenic bacteria and the need of limiting the spread of contagious diseases. The traditional methods based on cell culturing are usually very slow and time-consuming. Numerous rapid and sensitive methods for microbial detection have been developed (e.g., immunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), polymerase chain reaction methodologies (PCR)¹⁷⁰; however, they are not effective in complex systems when bacteria are present in a very low concentration. An emerging research area based on the magnetic, electronic, photonic, and optical properties by functionalization of MNP has being adopted to develop alternative methods based on the isolation of pathogenic bacteria using nanomaterials for biological identification.¹⁷¹

The specificity of MNP is based on the chemical recognition of pathogenic bacteria through the conjugation of MNP with antibodies, aptamers, bioprotein, carbohydrates and bacteriophages¹⁷²; however, MNP can be also coupled to siderophores in order to increase their specificity as they are recognized by specific siderophore membrane receptors of microorganisms.¹⁵ So far, three different approaches have been documented for the detection of microbial pathogens using siderophore scaffolds. The first one uses an immobilized siderophore to capture human pathogens through a bovine serum albumin (BSA) conjugate. The siderophore conjugate can be attached to gold-plated glass chips;^{173,174} other example is a modified, artificial siderophore complex attached to the surface of an Au electrode and placed on quartz crystal microbalance (QCM) chips.^{175,176} The second approach employs a siderophore attached to functionalized quantum dots (QDs) for the bacterial interaction with a specific receptor.¹⁷⁷ The third approach uses functionalized agarose columns bound to a specific bacterial protein for the capture of siderophore-binding proteins.¹⁷⁸ However, the conjugation of siderophores and magnetic nanoparticles to isolate and capture pathogenic bacteria has not been studied yet.

4.1. Surface modification and characterization

The preparation of the conjugate between feroxamine and functionalized silica-coated magnetite nanoparticles through the formation of an amide bond is shown in Figure 1. First, magnetite (Fe_3O_4 , MNP) was synthesized using iron (III) acetylacetonate

(Fe(acac)₃) and benzyl alcohol,^{179,180} followed by coating with SiO₂ using tetraethoxysilane (TEOS).¹¹⁹ The silica-coated magnetite (MNP@SiO₂) was then functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) using a sol-gel method¹⁸¹ that provides abundant NH₂ terminal functional groups on the coated particle surface. In parallel, commercial deferoxamine mesylate salt (**1**) was complexed with iron (III) using aqueous Fe(acac)₃ to produce ferroxamine complex (**2**) that was then treated with succinic anhydride to form the corresponding *N*-succinylferoxamine (**3**).¹⁸ The coupling between the amine functionalized silica coated MNP (MNP@SiO₂@NH₂) and *N*-succinylferoxamine (**3**) using BOP and HOBt¹⁸² finally formed the desired MNP@SiO₂@NH@Fa conjugate (**4**). Further functionalization of MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) using Boc₂O and succinic anhydride allowed us the introduction of Boc and carboxylic acid groups in their free amine groups to obtain the nanoparticles MNP@SiO₂@NHBoc and MNP@SiO₂@NHCOOH and the conjugates MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**) and MNP@SiO₂@NH@Fa (**6**).

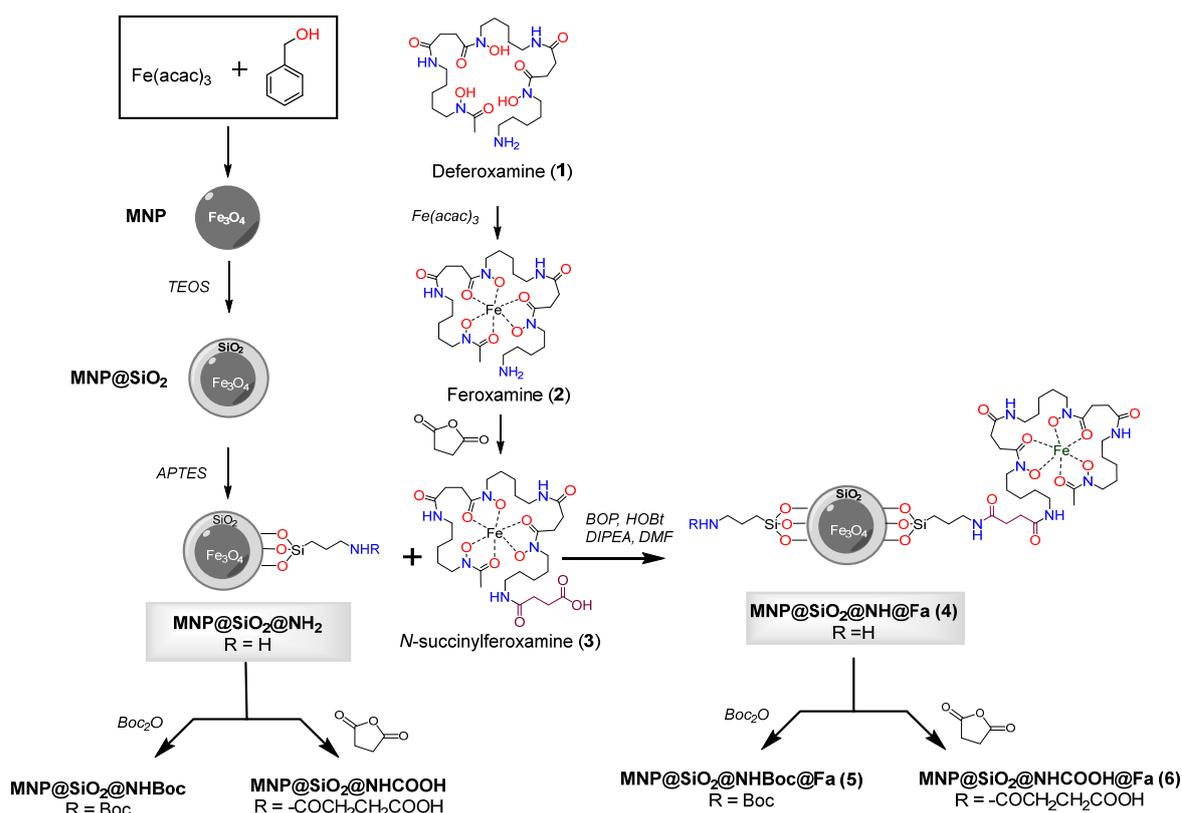


Figure 29. Synthesis of conjugates MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**), MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**) and MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (**6**).

The final MNP@SiO₂@NH@Fa conjugate (**4**) and the MNP intermediate solids were characterized by different methods including powder XRD, Raman Spectroscopy, FTIR, magnetization studies, TEM and EDX mapping.

XRD analyses confirmed the crystalline structure of our synthetic magnetite (MNP) by comparison with the diffraction peaks of a standard magnetite with JCPDS file 00-003-0863 (Appendix). Raman analyses of the MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) conjugate and intermediates allowed us to confirm the silica coating and functionalization of the bare MNP (Figure 30). The peaks at 305.8, 537.2 and 665.6 cm⁻¹ present in all Raman spectra correspond to Fe-O vibrations.¹⁸³ The appearance of a shoulder on the peak at 713.5 cm⁻¹ in all spectra of silica coated MNP, relates to Si-O-Si vibrations.¹⁸⁴ The MNP@SiO₂@NH₂ spectrum shows also two intense peaks at 1001.5 and 1027.4 cm⁻¹ also associated to the presence of SiO₂. The presence of two intense and well-defined peaks at 1578.6 and 1597.9 cm⁻¹ in the MNP@SiO₂@NH₂ spectrum confirmed the formation of Si-C bonds. Moreover, a shoulder observed at 703.0 cm⁻¹ confirmed the presence of APTES (Figure 30C).^{185,186} The two intense peaks in the MNP@SiO₂@NH₂ spectrum at ~1570 and 1590 cm⁻¹ related to Si-C bonds become a single broader peak centred at ~1580 cm⁻¹ in the Raman spectrum of the MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) conjugate due to amide vibrations (~ 1630-1680 cm⁻¹).¹⁸⁶

Figure 31 displays the FTIR spectra of MNP, MNP@SiO₂, MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**). The beginning of a band within the spectral range of the analysis at 600 cm⁻¹ in all the FTIR spectra is related to Fe-O vibrations. The FTIR spectrum of MNP@SiO₂ showed an intense and broad band at 1050 cm⁻¹ corresponding to the Si-O-Si stretching vibration, this band was also present in the MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) spectra confirming the silica coating. The broad band between 830 and 1275 cm⁻¹ in the FTIR spectrum of MNP@SiO₂, mainly related to Si-O bond, becomes more intense in the FTIR spectrum of MNP@SiO₂@NH₂ as a result of the functionalization of MNP@SiO₂ with APTES and it is probably due to the Si-C bond expected between 1175 and 1250 cm⁻¹. Finally, the FTIR spectrum of MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) shows bands at 2995 cm⁻¹ (C-H stretching bonds), at 1640 cm⁻¹ (O=C amide vibration) and at 1577 cm⁻¹ (O=C-N hydroxamic acid vibration) that confirmed the presence of feroxamine conjugated with the nanoparticles.¹⁸⁷ FTIR spectra for MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**) and MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (**6**) are shown in Appendix.

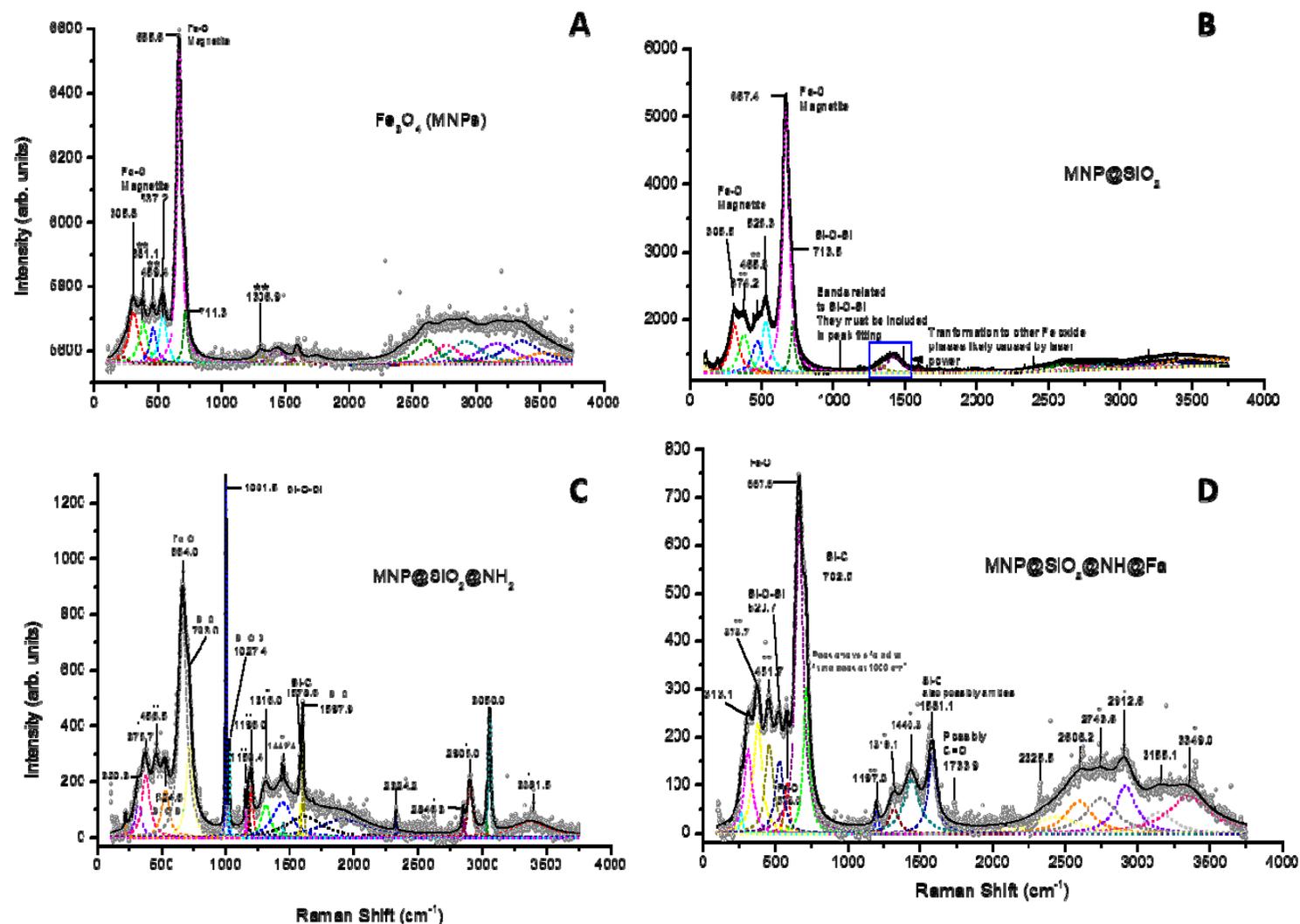


Figure 30. Raman spectra of bare iron oxide (Fe_3O_4) MNP (A), $\text{MNP}@SiO_2$ (B), $\text{MNP}@SiO_2@NH_2$ (C) and $\text{MNP}@SiO_2@NH@Fa$ (D). (*) APTES, (**) Other iron oxide phases, likely formed from the transformation of magnetite by the laser power.

Figure 31 displays the FTIR spectra of MNP, MNP@SiO₂, MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**). The beginning of a band within the spectral range of the analysis at 600 cm⁻¹ in all the FTIR spectra is related to Fe–O vibrations. The FTIR spectrum of MNP@SiO₂ showed an intense and broad band at 1050 cm⁻¹ corresponding to the Si-O-Si stretching vibration, this band was also present in the MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) spectra confirming the silica coating. The broad band between 830 and 1275 cm⁻¹ in the FTIR spectrum of MNP@SiO₂, mainly related to Si-O bond, becomes more intense in the FTIR spectrum of MNP@SiO₂@NH₂ as a result of the functionalization of MNP@SiO₂ with APTES and it is probably due to the Si-C bond expected between 1175 and 1250 cm⁻¹. Finally, the FTIR spectrum of MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) shows bands at 2995 cm⁻¹ (C-H stretching bonds), at 1640 cm⁻¹ (O=C amide vibration) and at 1577 cm⁻¹ (O=C-N hydroxamic acid vibration) that confirmed the presence of feroxamine conjugated with the nanoparticles.¹⁸⁷ FTIR spectra for MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**) and MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (**6**) are shown in Appendix.

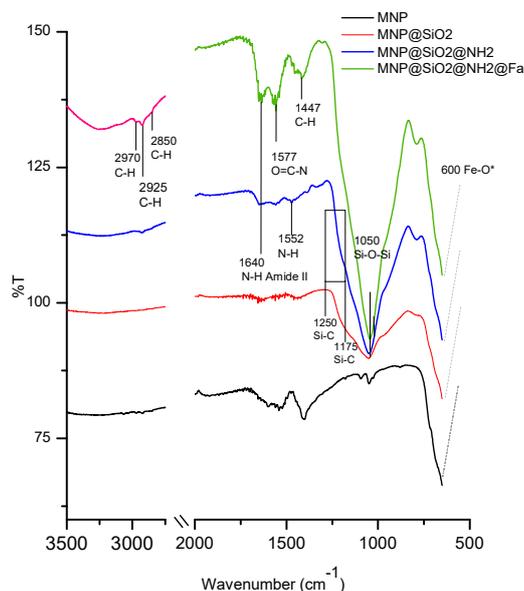


Figure 31. FT-IR spectra of bare iron oxide (Fe₃O₄) MNP (**black**), MNP@SiO₂ (**red**), MNP@SiO₂@NH₂ (**blue**) and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) (**green**).

Magnetization studies after coating and functionalization treatments were performed using hysteresis loop tests. The particles exhibit a superparamagnetic behavior, with only a little remanence and coercivity, which suggests the presence of a long-range magnetic dipole-dipole interaction among the assemblies of superparamagnetic

particles. The progressive decrease in magnetization saturation, 68.6 emu/g for MNP, 26.5 emu/g for MNP@SiO₂, 30.5 emu/g and 2.53 emu/g for MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**), indicates the addition of diamagnetic material on the MNP surface (Appendix) and probably, the electron exchange between the surface Fe atoms and the ligands. Despite of magnetization decrease, the MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) retained their superparamagnetic behavior after the treatments, suggesting that their magnetic properties are still active to allow magnetic separation after interaction with bacteria.

Thermogravimetric analyses (TGA) also confirmed the functionalization of MNP (Figure 32). The thermal loss of MNP (red line) from 50 to 900 °C was 1.5 %, which might be due to residual loss of water and alcohol (the temperature range from 30 to 150 °C). The weight loss in 5.6 % for MNP@SiO₂@NH₂ was attributed to APTES degradation and also to the loss of small amount of water absorbed. The largest weight loss (11.1 %) was found to be for the conjugate MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**), clearly indicating the presence of organic material on the surface. Furthermore, the TGA allowed us to estimate that MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) were obtained with approximately 7.62×10^{-5} mmol of feroxamine per 1 mg MNP@SiO₂@NH₂ (see Appendix). The TGA data for MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**) and MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (**6**) conjugates can be seen in (Appendix).

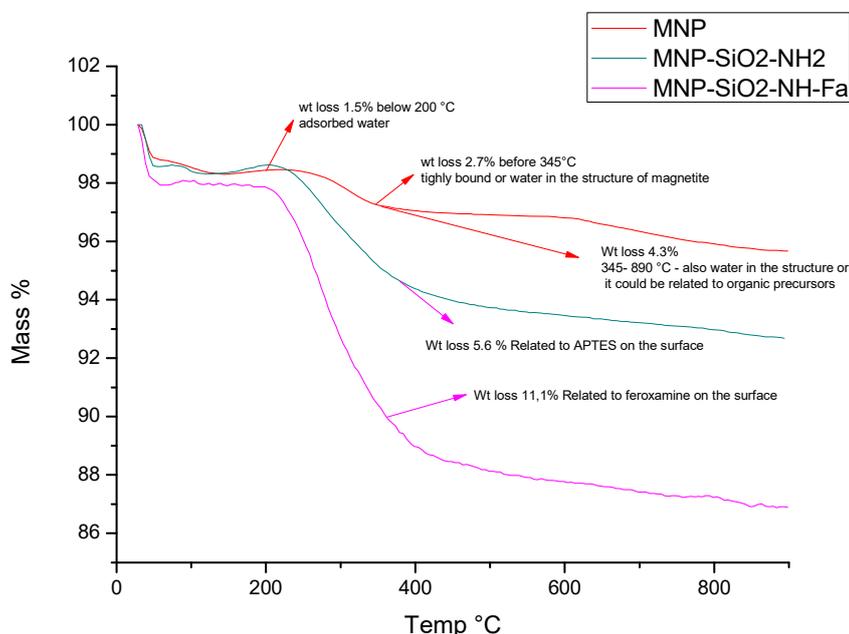


Figure 32. Thermogravimetric analysis of MNP (red), MNP@SiO₂@NH₂ (green), and MNP@SiO₂@NH@Fa (pink).

Figure 33 shows bright field TEM images at medium and high resolution of bare MNP and MNP@SiO₂@NH₂@Fa (**4**). Figure 33A revealed that MNP were ~10 nm in diameter, although bigger particles (~20 nm) were also present. High resolution images (Figure 33B) confirmed the crystallinity of these nanoparticles as previously observed from XRD analyses. The fringes observed in the TEM image correspond to d-spacings of 2.9 and 2.4 Å of the crystal planes (220) and (311) of magnetite.¹⁸⁸ The electron diffraction pattern showed bright spots that match with the (111), (220), (311), (400), (422), (511) and (440) diffraction planes of magnetite corresponding to d-spacings of 4.9, 2.9, 2.4, 2.0, 1.7, 1.6 and 1.4 Å, respectively (Figure 33C). In addition, the presence of rings along with the small spots demonstrated the formation of a polynanocrystalline magnetite. TEM images of MNP@SiO₂@NH₂@Fa (**4**) showed dispersed MNP particles (~10 nm) embedded in the amorphous inorganic-organic material (Figures 33D and 33E), the crystalline fringes of magnetite are still visible in high resolution and in the electron diffraction images (Figure 33F).

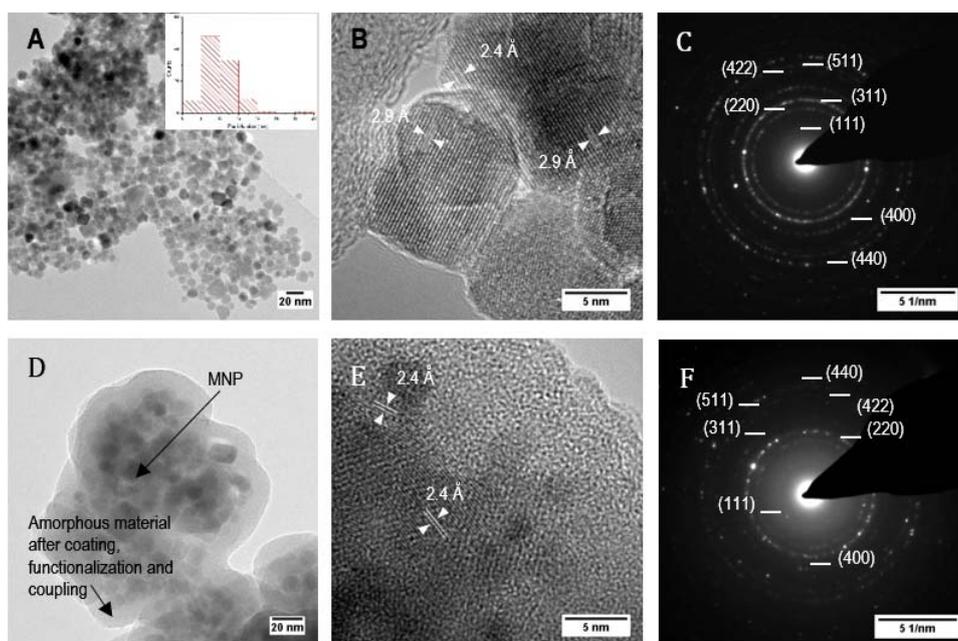


Figure 33. Bright field TEM images and electron diffraction of bare MNP (**A**, **B** and **C**), of MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) (**D**, **E** and **F**). Images at medium and high resolution.

Chemical composition of the nanoparticles after the Si coating was determined by energy dispersive X-ray (EDX) maps. Figure 34A shows the high angle annular dark field (HAADF) image of MNP@SiO₂ and the maps for Fe, Si, O and C. They show that Fe is homogeneously distributed all over the MNP@SiO₂ while Si appears widely distributed not only throughout the nanoparticle, but also extended to the sides (i.e., coating layer is observed in the darker area of the HAADF image). On the other hand,

C was detected in low concentrations likely due to contamination. Although similar results were observed for Fe, Si and O in the MNP@SiO₂@NH@Fa (4) results, the concentration of C increased homogenously due to the addition of carbon layers on the nanoparticle surface (Figure 34B).

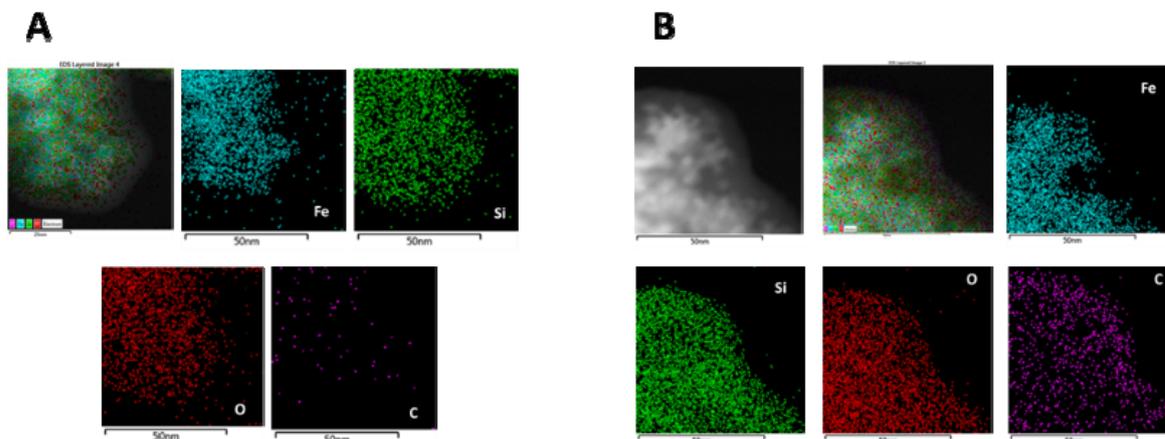


Figure 34. EDX maps of MNP@SiO₂: HAADF image and the corresponding Fe, Si, O and C maps of **A.** MNP@SiO₂ and **B.** MNP@SiO₂@NH@Fa (4)

4.2. Bacteria capture studies

Once the MNP were characterized, we carried out experiments to evaluate the capabilities of bare and functionalized magnetic nanoparticles to capture wild type (WC-A) and a mutant lacking feroxamine receptor FoxA (FoxA WC-A 12-8) *Y. enterocolitica* strains.

Bare MNP and functionalized MNPs were incubated for 1 h in a PBS solution containing each *Y. enterocolitica* strain. The aggregates were then separated from the bacteria suspension by using a magnet. After rinsing the separated aggregates two times with PBS, they were re-suspended in PBS, to prepare serial dilutions that were plated and incubated for 24 h at 37 °C.

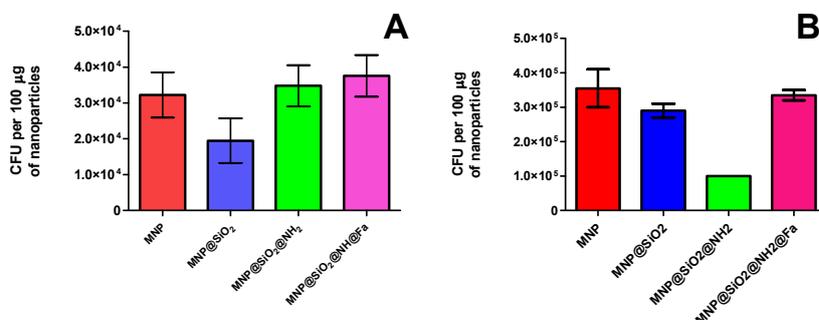


Figure 35. CFU of *Y. enterocolitica* captured per 100 µg of magnetic nanoparticles: bare, MNP@SiO₂, MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**). **A.** WC-A (wild type) **B.** FoxA WC-A 12-8 (mutant lacking feroxamine receptor FoxA).

The results obtained from colony counting are shown in Figure 35. They indicated that both *Y. enterocolitica* strains did not show a significant binding specificity for the functionalized MNP in relation to bare MNP. The lack of binding specificity is likely caused by the surface interactions between nanoparticles and bacteria. Most bacteria have a net negative surface charge, particularly during the early stationary phase of cell growth,^{189,190} that makes them to preferentially interact with positively charged surfaces such as MNP@SiO₂@NH₂, due to the presence of free amine groups through protonation in physiologic solution. Therefore, our results are in good agreement with previous works reporting bacteria adsorption through free amine groups of functionalized MNP.^{191–193} The bacteria adsorption achieved with MNP@SiO₂ particles can be attributed to mutually hydrophobic interaction.¹⁷⁷

In order to decrease the non-specific binding due to the electrostatic interactions between the free amine functionalized nanoparticles and bacteria, we tried to block the surface of the particles with two different groups, one of them of neutral nature (Boc) and the second one with polar character (COOH). Boc groups were introduced onto MNP@SiO₂@NH₂ and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) by using (Boc)₂O to give MNP@SiO₂@NHBoc and conjugate MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**), respectively. Carboxylic groups were also introduced onto the same species by using succinic anhydride to give the corresponding MNP@SiO₂@NHCOOH and the conjugate MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (**6**). Amine silica coated functionalized MNP bearing carboxylic groups were recently reported by Gunawan and coworkers.¹⁹¹

When repeating the same process as described before, the colony counting for MNP@SiO₂@NHBoc and conjugate MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**) did not show any significant changes for the adsorption of *Y. enterocolitica* WC-A (wild type strain) as it is shown in Figure 36A and 36B. Thus, these modifications were not enough to attenuate the electrostatic interactions between bacteria and these modified nanoparticles and hence, the molecular recognition of the siderophore were not observed. This was confirmed when the experiment was repeated with and without iron deficiency growth conditions (Appendix), where any significant changes were observed.

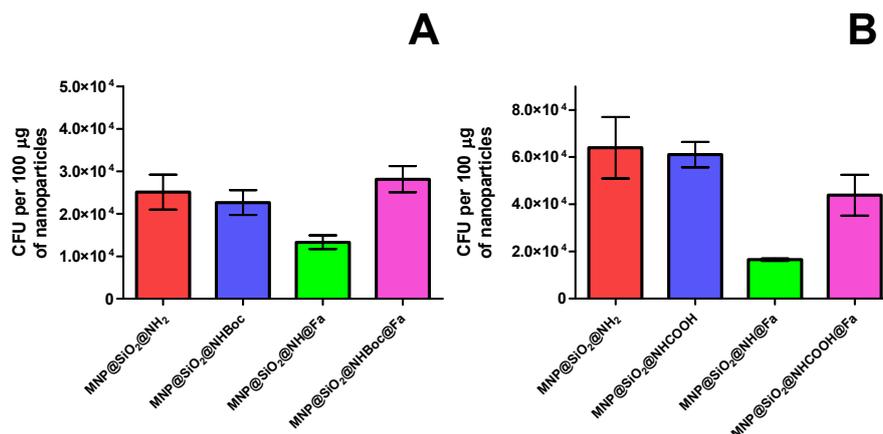


Figure 36. CFU of *Y. enterocolitica* WC-A (wild type) captured per 100 µg of magnetic nanoparticles **A.** MNP@SiO₂@NH₂, MNP@SiO₂@NHBoc, MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**), MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**), **B.** MNP@SiO₂@NH₂, MNP@SiO₂@NHCOOH, MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**), MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (**6**).

SEM and TEM imaging were performed to visualize the interaction between *Y. enterocolitica* WC-A and MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**). Figure 37A shows the attachment of the conjugate **4** to *Y. enterocolitica* WC-A on the membrane. In addition, the corresponding thin-sectioned samples measured by TEM (Figures 37B1 and 37B2) were used to confirm the capability of the modified nanoparticles to attach to the bacterial membrane. Additional images and EDX maps are shown in the appendix.

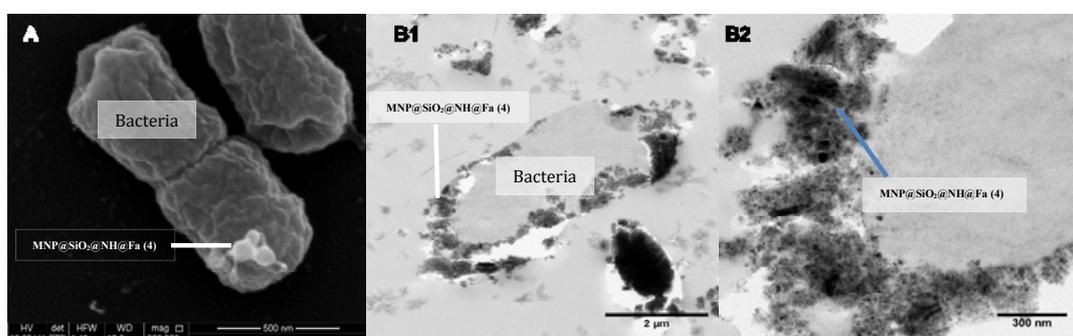


Figure 37. **A.** SEM images of *Y. enterocolitica* WC-A interacting with MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**). **B.** TEM images of *Y. enterocolitica* WC-A interacting with MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**): **B1.** Attachment of nanoparticles to the surface of a single bacteria; **B2.** Detail of the attachment on the bacterial membrane.

4.3. Synthesis of an enterobactin analogue

Siderophores are extremely bioactive compounds, however, for certain applications chemical functionalization is required for some of them. Studies of the receptor binding and transport of Fe^{3+} -enterobactin has revealed that an unsubstituted tris-catechol iron center and the coordinated catechol amide groups are essential for recognition as a siderophore, while trilactone structure is not required and can be replaced.²⁰ In order to test the conjugation of the MNP with siderophore analogues bearing a catechol group instead of hydroxamate functionality, as presents in feroxamine. We planned to synthesize the enterobactin analogue **12**, bearing a suitable group for conjugation (Figure 38).

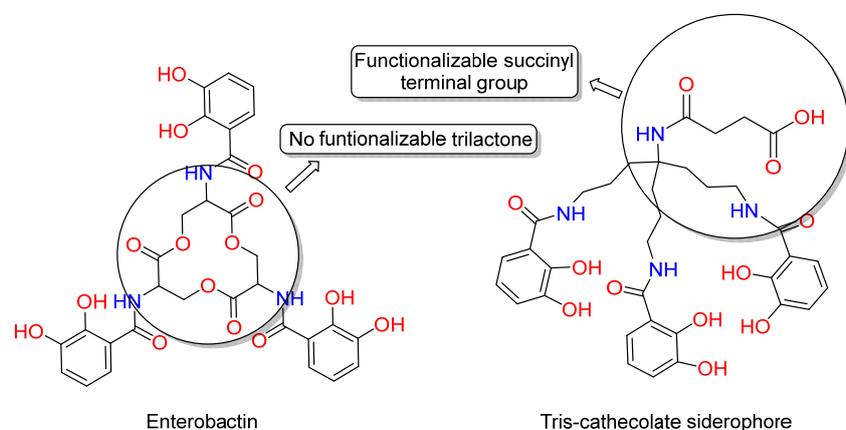


Figure 38. The synthetic scheme for the tris-catecholate enterobactin analogue.

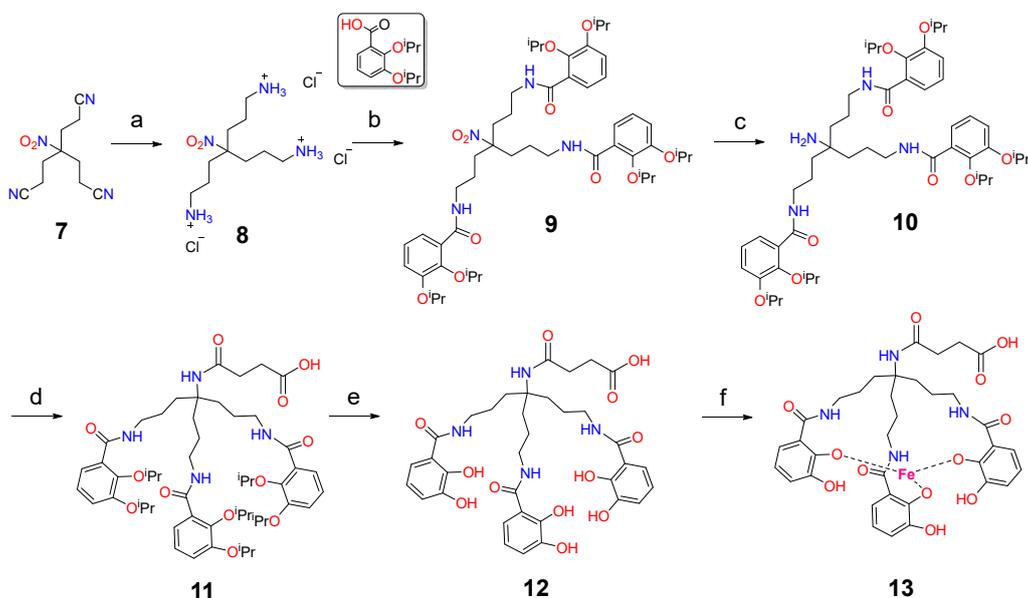


Figure 39. Synthesis of the tris-catecholate siderophore, reagents and conditions: (a) BH_3 -THF, THF; (b) 2,3-diisopropoxybenzoic acid, TBTU, DIPEA, DMF, room temperature; (c) NiCl_2 , NaBH_4 , MeOH, sonication, rt; (d) succinic anhydride, pyridine, rt; (e) 1. BCl_3 , CH_2Cl_2 , $-40\text{ }^\circ\text{C}$; 2. CHCl_3 -MeOH (1:1); (f) $\text{Fe}(\text{acac})_3$, KOH 0.1 M in MeOH, rt.

In order to synthesize the enterobactin analogue tris-catecholate **12** (Figure 39), some synthetic strategies were taken into account.^{194,195} By the experience of our research group and literature search, tris(2-cyanoethyl)nitromethane (**7**) was selected as starting material to obtain, by reduction of cyano groups with BH_3 in THF, an amine triamine hydrochloride **8** (with a yield 98%). Previous synthesis of tris-catecholate using 2,3-dibenzoyloxybenzoic acid and a benzoyl group as catechol hydroxyl protective group. However, when we repeat the conditions reported in the literature using this protector group, we did not get good results when we removed the benzoyl group by a reduction with H_2 , Pd/C. For this reason, the substitution of the benzoyl for isopropyl group gave better results during the deprotection process.

Compound **8** was coupled with 2,3-diisopropoxybenzoic acid to give the tris-catecholate **9** using 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate (TBTU) as coupling reagent. The reduction of nitro group in compound **9** to give the amine **10** was carried out using NaBH_4 in presence of catalytic amount of NiCl_2 under sonication, following the procedure described by Ji *et al.*¹⁹⁶ The addition of succinyl arm to compound **10** was next step by amide formation in pyridine to give *N*-succinyl tris-catecholate **11**. The hydroxyl groups were deprotected by treatment with BCl_3 to give the *N*-succinyl tris-catecholate siderophore **12**. Finally, compound **12** was used to form the complex with iron (III) acetylacetonate in basic MeOH to facilitate deprotonation of catechol hydroxyl groups, following the procedure proposed by Inomata *et al.* to obtain Fe^{3+} -*N*-succinyl tris-catecholate **13**.

5. Experimental Section

Chemicals

All starting materials, reagents and solvents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Argon was used for the moisture and oxygen sensitive reactions. Size exclusion chromatography was performed on Sephadex™ LH-20.

5.1. Synthesis

*Synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNP).*¹⁷⁹ A solution of 0.5 g of Fe(acac)₃ in 10 mL of benzyl alcohol was sonicated for 2 min, transferred to a heating block and reacted at 180 °C for 72 h. After that time, the resulting mixture was allowed to cool down, the precipitates were decanted by centrifugation (5000 rpm for 30 min) and the supernatant was discarded. The solids were rinsed with 96% ethanol, sonicated and recovered using a magnet. This process was repeated five times.

*Synthesis of SiO₂ coating of MNP (MNP@SiO₂).*¹¹⁹ 80 mL of isopropanol, 4 mL of ammonia (21 %), 7.5 mL of distilled water and 0.56 mL of tetraethyl ortosilicate (TEOS) was added, in this order, to 2 g of MNP. The mixture was heated at 40 °C for 2 h with continuous stirring and then sonicated for an additional 1 h. After that time, the MNP were removed from the solution using a magnet and re-dispersed in 30 mL of isopropanol. This coating procedure was repeated a second time. Finally, the SiO₂ coated MNP were rinsed with ethanol and again removed from the dispersion using a magnet.

*Synthesis of MNP@SiO₂@NH₂.*¹⁸¹ A modified procedure described by Chen *et al.* was used for the functionalization of MNP@SiO₂. 500 mg of MNP@SiO₂ were rinsed and sonicated three times with 3 mL of dimethylformamide (DMF). Then, the particles were re-suspended in 9 mL of DMF and 9 mL of APTES and the resulting mixture was shaken at 60 °C for 12 h. Finally, the functionalized particles (MNP@SiO₂@NH₂) were separated with a magnet and sonicated with 96 % ethanol three times.

*Synthesis of feroxamine (2).*¹⁸ Deferoxamine mesylate salt (100 mg, 0.15 mmol) and a stoichiometric amount of Fe(acac)₃ (53.0 mg, 0.15 mmol) were dissolved in 5 mL of distilled water and stirred overnight. The resulting product was washed three times with 20 mL of EtOAc. After removal of the residual EtOAc in the rotavapor under vacuum, the aqueous phase was freeze dried to obtain a red solid (94.4 mg, 78 % yield). (+)-HR-ESIMS *m/z* 614.2751 [M + H]⁺ (calcd. for C₂₅H₄₅FeN₆O₈: 614.2729).

*Synthesis of N-succinylferoxamine (3).*¹⁹⁷ 350 mg (3.50 mmol) of succinic anhydride were added to a solution of 100 mg (0.17 mmol) of feroxamine in 5 mL of pyridine. The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. After that time, the excess of pyridine was eliminated in the rotavapor under vacuum, and the resulting red solid product was purified by size exclusion chromatography using methanol as eluent to give 93.1 mg of *N*-succinylferoxamine (**3**) as a dark red solid. (+)-HR-ESIMS *m/z* 736.2700 [M+Na]⁺; (calcd. for C₂₉H₄₉FeN₆O₁₁Na: 736.2706.). LREIMS and HRESIMS were measured on Applied Biosystems QSTAR Elite.

Synthesis of MNP@SiO₂@NH@Fa (4). 30 mg of dry MNP@SiO₂@NH₂ were rinsed with DMF and sonicated for 30 minutes twice. A solution of *N*-succinylferoxamine (**3**, 0.2 g, 0.30 mmol), benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP, 173.0 mg, 0.45 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (HOBT, 46 mg, 0.39 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 128.8 mg, 1.21 mmol) in 10 mL of DMF was added dropwise to a suspension of 30 mg of MNP@SiO₂@NH₂ in 3 mL of DMF under sonication in dry conditions under argon atmosphere.¹⁸² The mixture was stirred at room temperature overnight. Finally, the resulting conjugate (MNP@SiO₂@NH@Fa, **4**) was separated from the suspension with a magnet and the separated solid was rinsed and sonicated 5 times with 10 mL of ethanol. The solid was vacuum dried for 24 h.

Synthesis of MNP@SiO₂@NHBoc and MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (5). 28.5 mg of MNP@SiO₂@NH₂ was rinsed with dry DMF and sonicated for 5 minutes twice under argon atmosphere and then suspended in 10 mL of dry DMF. Then 200 mg of Boc₂O were dissolved in dry DMF and mixed with the nanoparticles suspension. The reaction mixture was sonicated for 30 min and then, it was stirred at room temperature in an orbital shaker at 200 rpm for 24 h. Finally, it was separated using a magnet, the supernatant was discarded and the solid was rinsed and sonicated 5 times with 10 mL of ethanol and vacuum dried for 24 h to yield 27.5 mg of MNP@SiO₂@NHBoc. The same procedure was repeated for 13.6 mg of MNP@SiO₂@NH@Fa to obtain 13.8 mg of MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (**5**).

Synthesis of MNP@SiO₂@NHCOOH and MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (6). 25 mg of MNP@SiO₂@NH₂ was rinsed with dry pyridine and sonicated for 5 minutes twice under argon atmosphere and then suspended in 10 mL of dry pyridine. Then 200 mg of succinic anhydride were added to the nanoparticles suspension. The reaction mixture was sonicated 30 min and then was stirred at room temperature in an orbital shaker at 200 rpm for 24 h. Finally, it was separated using a magnet, the supernatant was

discarded and the solid was rinsed and sonicated 5 times with 10 mL of ethanol and vacuum dried for 24 h to yield 21.3 mg of $MNP@SiO_2@NHCOOH$. The same procedure was repeated for 9.3 mg of $MNP@SiO_2@NH@Fa$ (**4**) to obtain 8.7 mg of $MNP@SiO_2@NHCOOH@Fa$ (**6**)

5.2. Characterization

The bare nanoparticles (MNP) and the subsequent products after coating, functionalization and coupling reactions were characterized by XRD, Raman, FT-IR spectroscopy, magnetization and TEM.

Powder X-ray diffraction (XRD). XRD analysis of samples containing MNP were performed using a Bruker D8 diffractometer (CuK_{α}) with a scan range from 2-70 degrees 2-theta at 0.05 degrees 2-theta/min. After sample separation and rinsing, MNP containing samples were re-dispersed in ethanol and mounted onto a poly(methyl methacrylate) specimen holder for analysis. Peak identification was performed using X'Pert High Score Plot software. The synthetic MNP was characterized to confirm the nanocrystalline structure of the synthesized magnetite. The diffractogram was compared with the PDF database (Database from International Centre for Diffraction Data) indicating that the MNP is magnetite (Fe_3O_4 , JCPDS 00-003-0863).

FT-IR and Raman spectroscopy. FT-IR analysis were carried out on powered nanoparticle samples using an A2-Technology MicroLab Portable mid-IR spectrometer equipped with a diamond internal reflection (DATR). For the analysis, the background was collected without deposition of the sample and then a sample re-dispersed in ethanol was placed on the diamond window of the instrument. Individual spectra (4096) were acquired between 650 to 4000 cm^{-1} at a resolution of 1 cm^{-1} , and then co-added and processed using Origin 8 (OriginLab, Northhamptom, MA, USA). Raman analysis were carried out in a LabRAM HR 800 Horiba Scientific spectrometer, with a 633 nm laser using a 10% power (~1 mW), as 50X objective and a diffraction grating of 600 ln/mm . Each spectrum includes ten measures of 300 seconds (total measure time 3000 seconds).

Transmission electron microscopy (TEM) and Energy Dispersive X-Ray (EDX) mapping. Imaging analysis was performed using high-resolution transmission electron microscopy (TEM). The bright field images and maps were obtained at room temperature using a Tecnai TF20 FEGTEM operating voltage of 200 keV fitted with a high angle annular dark field (HAADF) detector and a Gatan Orius SC600 CCD camera. EDX maps were obtained at room temperature using a FEI Titan G2 S/TEM

with an operating voltage of 200 keV, a beam current of 0.1 nA, a convergence angle of 18 mrad and a HAADF inner angle of 54 mrad.

Magnetization and Thermogravimetric analysis (TGA). Magnetization was measured using an Oxford Instruments VSM with a magnetic field of 1 T and a sensitivity of 10 micro-emu. Thermogravimetric analysis was carried out using a differential scanning calorimeter STA 449 F3 Jupiter (Netzsch), equipped with a SiC oven. The samples were analyzed in nitrogen atmosphere by an increment of the temperature of 5 °C/min until 900 °C. Weight loss of each sample was obtained by measurements at different temperatures.

5.3. Bacterial capture study with *Y. enterocolitica* WC-A strain

Yersinia enterocolitica WC-A was donated by Prof. Klaus Hantke (University of Tübingen, Germany). Trypticase Soy Broth (TSB) and Agar TSA), Ringers solution and PBS buffer were prepared with distilled water (DW) for the biological assays.

Trypticase soy broth (TSB) 100 µM of 2,2'-bipyridil cultures of *Y. enterocolitica* WC-A (wild type strain) were incubated up to an OD₆₀₀ between 0.5 and 0.8 in iron deficient conditions by addition of 2,2'-bipyridyl up to 100 µM. Then, 100 µL of a 1 mg/mL solution of bare, MNP@SiO₂, MNP@SiO₂@NH₂ or MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) was added to 1 mL of 1:100 dilution of *Y. enterocolitica* WC-A (equivalent to ca. 6 x 10⁶ bacterial cells mL⁻¹) in Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 and incubated during 1 h. The MNPs/*Y. enterocolitica* aggregates were then attracted magnetically and the supernatant was carefully discarded. The remaining aggregates were rinsed twice with PBS and re-suspended again in PBS. Serial tenfold dilutions of this suspension were plated on Trypticase Soy Agar (TSA) plates and incubated at 37°C during 24 h for colony counting.

5.4. Evaluation of bacteria- nanoparticle interaction

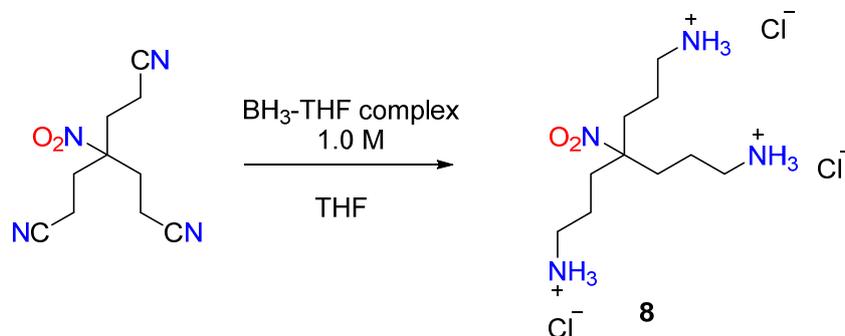
Scanning electron microscopy (SEM). Scanning Electron Microscopy (SEM) images were obtained using a FEI Quanta 650 FEGSEM environmental SEM with an Oxford Instruments INCA 350 EDX system/80mm X-Max SDD detector, EBSD and KE Centaurus EBSD system. The analysis of the images were made using ImageJ software.¹⁹⁸ *Y. enterocolitica* WC-A was growth in 10 mL of TSB until a OD₆₀₀ = 0.5, then 10 mL of a 1:10 dilution was prepared, and 1 mL of a suspension of MNP@SiO₂@NH@Fa (**4**) in PBS, was added. The bacteria were allowed to interact with the nanoparticles at room temperature for 1 h, and then, the solids (bacteria-nanoparticles) were separated from the suspension with a magnet, and rinse with 1 mL

CHAPTER II: EXPERIMENTAL SECTION

of PBS twice. The captured bacteria were mixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer and allowed to react for 2 h. After that time, the solids were washed twice with 0.1 M phosphate buffer for 30 min. Post fixed samples were mixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer overnight. After that time, the solids were dehydrated using an ascending acetone series 20-40-60-80-100% for 30 min, each change. Then, the samples were dried with a Polaron E3000 critical point drying apparatus using liquid carbon dioxide as the transition fluid, to afford a solid which was mounted on 13 mm diameter pin stubs using double sided adhesive tape. Finally, these samples were coated with platinum to a thickness of 5 nanometers using a Cressington 208HR high resolution sputter coating unit.

Transmission electron microscopy (TEM) and EDX maps. For TEM analysis, the bacteria-nanoparticle interaction was performed as described in the SEM analysis. The solids were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 2 h and washed twice (30 min each) with a 0.1 M phosphate buffer. Then, 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer was added to the post fixed sample and left overnight. After that time, they were dehydrated using an ascending acetone series 20-40-60-80-100%, for 30 min each change. Then, the sample was treated twice with propylene oxide for 20 min each time. A propylene oxide-Araldite solution at different concentrations was added to the former sample: first, a 50%-50% solution overnight, second, a 25%-75% for several hours and third, 100 % Araldite for 3 to 8 h. The resulting preparation was transferred to embedding moulds with fresh Araldite and polymerase overnight at 60 °C. Ultra-thin sections (silver-gold 80-100 nanometers) were picked up on 3.05 mm grids and stained with saturated uranyl acetate (5 min-120 min).

5.5. Synthesis of an enterobactin analogue

Synthesis of compound **8**¹⁹⁹

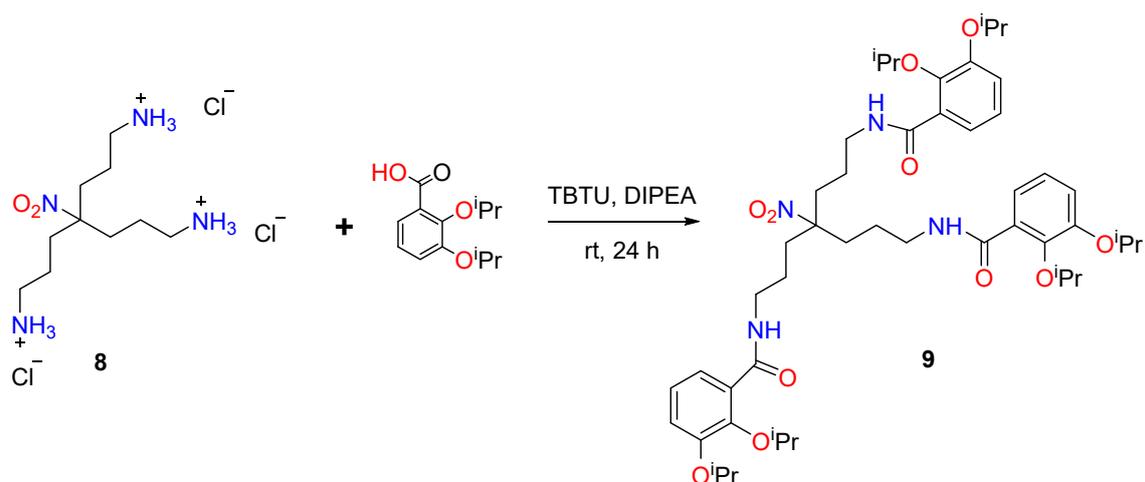
A 100 mL two-necked round-bottom flask was charged with a solution of borane-THF-complex (1 M, 25 mL), while cooling to 0 °C and keeping the solution under an argon atmosphere. To this mixture a solution containing tris-(2-cyanoethyl)nitromethane (400 mg, 1.85 mmol) in dry THF (12.5 mL) was slowly added dropwise. The mixture was stirred for 30 minutes at 0 °C, refluxed during 1 hour and then was stirred overnight at room temperature. After that time, the mixture was cooled to 0 °C and 30 mL methanol followed by 3.5 mL of hydrochloric acid (37%) was slowly added dropwise. The reaction mixture was stirred for 1 hour and subsequently evaporated to dryness *in vacuo*. An aqueous solution of NaOH (2 M, 50 mL) was added to the resulting mixture and then was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). The organic layers were collected and dried with sodium sulfate, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to obtain a yellowish liquid. The crude product was dissolved in methyl *t*-butylether (15 mL) and HCl (5 N) in 2-propanol (2 mL) was added to this solution. The resulting suspension was filtered and the solid residue was dried to yield compound **8** (98%yield).

NMR-¹H (300 MHz, CD₃OD), δ_H ppm: 3.0 (t, *J* = 7.5 Hz 6H, CH₂); 2.1 (m, 6H, CH₂); 1.7 (m, 6H, CH₂).

NMR -¹³C (75 MHz, D₂O), δ_C ppm: 90.4 (C); 39.0 (CH₂); 31.6 (CH₂); 21.3 (CH₂)

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 233.19 [M+H]⁺.

Synthesis of compound 9



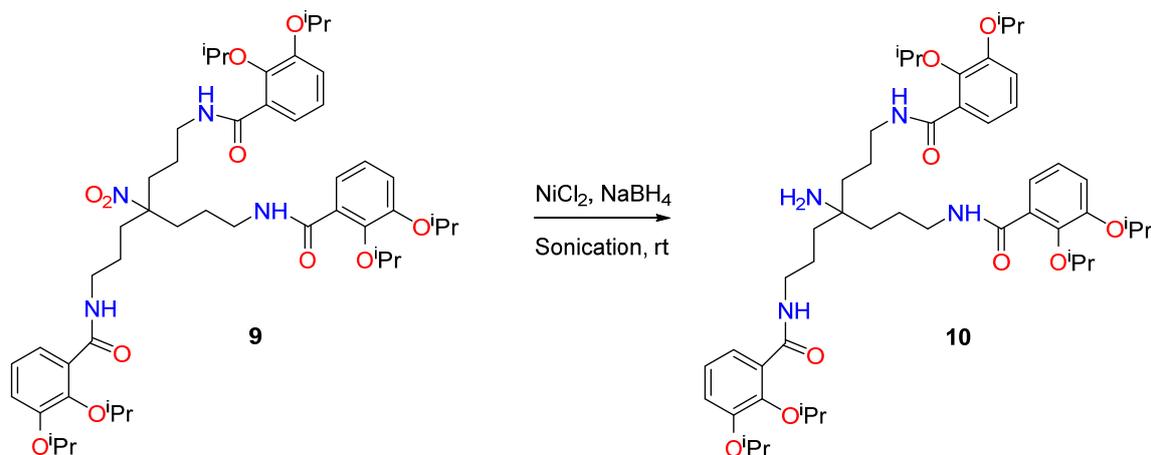
To a solution of 2,3-diisopropoxybenzoic acid (418 mg, 1.76 mmol) in DMF (5 mL), amine compound **8** (200 mg, 0.58 mmol), TBTU (281 mg, 0.88 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine DIPEA (0.71 mL, 4.10 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature during 24 h. Then, the crude was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with an aqueous saturated dissolution of NaHCO₃ (30 mL), brine (30 mL) and H₂O (30 mL). The organic phase was concentrated *in vacuo* to give a residue which was purified by medium pressure liquid chromatography (MPLC) over silica gel using the following elution program: cartridge equilibration step [hexane/EtOAc (3:7)], separation step [from hexane/EtOAc (3:7) to EtOAc], wash step [EtOAc] to obtain 134 mg of compound **9** (yield 25%) as a white solid.

NMR-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ_H ppm: 8.1 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H), 7.6 (dd, *J* = 1.9, 7.6 Hz, 3H), 6.9 (dd, *J* = 1.9, 6.4 Hz, 3H), 4.6 (sep, *J* = 18.6, 12.3, 6.1 Hz, 3H), 4.5 (sep, *J* = 16.2, 10.2, 6.4 Hz, 3H), 3.4 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.9 (m, 6H), 1.5 (m, 6H), 1.3 (d, *J* = 6.0 Hz, 9H), 1.2 (d, *J* = 6.2 Hz, 9H).

NMR-¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ_C ppm: 166.2 (CO), 150.9 (C), 146.1 (C), 128.1 (C), 123.7 (CH), 122.8 (CH), 118.5 (CH), 93.6 (CH), 76.4 (CH), 71.2 (CH), 39.4 (CH₂), 33.2 (CH₂), 24.1 (CH₂), 22.4 (CH₃), 22.1 (CH₃).

(+)-LR-ESIMS *m/z*: 893.53 [M+H]⁺, 915.51 [M+Na]⁺

(+)-HR-ESIMS *m/z*: 893.5266 [M+H]⁺ (calculated for C₄₉H₇₃N₄O₁₁: 893.5270).

Synthesis of compound 10¹⁹⁴

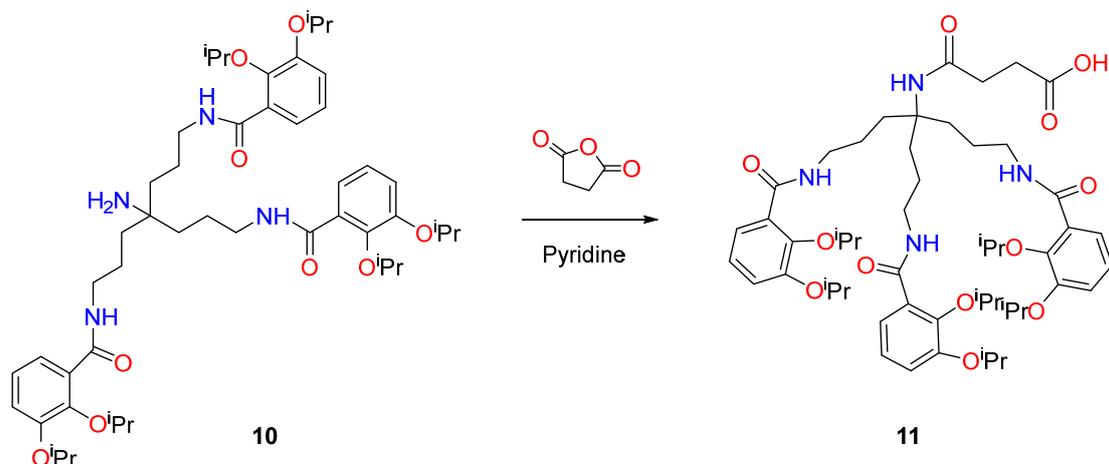
In an ultrasonic bath, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9.8 mg, 0.074 mmol) was dissolved in 3 mL of MeOH. NaBH_4 (10 mg, 0.75 mmol) was added and the resulting black suspension was sonicated for 30 min. Compound **9** (136.0 mg, 0.15 mmol) dissolved in 3 mL of MeOH and NaBH_4 (23.2 mg, 0.26 mmol) were added to the formed suspension. The mixture was sonicated for 30 min, after that time, NaBH_4 (23.2 mg, 0.26 mmol) was added and sonicated by 30 min. The resulting mixture was filtered through a short pad of celite and the solvent was evaporated. The residue was partitioned between 10 mL of water and 20 mL of CH_2Cl_2 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was evaporated under vacuum to give amine **10** (103.3 mg, 79%) as a white foam.

NMR-¹H (400 MHz, CDCl_3), δ_{H} ppm: 8.0 (t, $J = 4.9$ Hz, 3H), 7.6 (dd, $J = 1.9, 6.2$ Hz, 3H), 6.9 (dd, $J = 1.1, 6.6$ Hz, 3H), 4.6 (sep, $J = 19.4, 12.5, 6.1$ Hz, 3H), 4.5 (sep, $J = 17.8, 11.7, 5.7$ Hz, 3H), 3.4 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.6 (m, 6H), 1.4 (m, 6H), 1.3 (d, $J = 6.1$ Hz, 9H), 1.2 (d, $J = 6.2$ Hz, 9H).

NMR-¹³C (100 MHz, CDCl_3), δ_{C} ppm: 165.9 (CO), 150.8 (C), 146.1 (C), 128.7 (C), 123.7 (CH), 122.9 (CH), 118.4 (CH), 53.1 (CH), 76.4 (CH), 71.2 (CH), 40.2 (CH_2), 37.7 (CH_2), 23.9 (CH_2), 22.4 (CH_3), 22.1 (CH_3).

(+)-LR-ESIMS m/z : 863.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(+)-HR-ESIMS m/z : 863.5524 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculated for $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_4\text{O}_9$: 863.5528).

Synthesis of compound **11**¹⁹⁷

95.4 mg (0.95 mmol) of succinic anhydride were added to a solution of 82.3 mg (0.095 mmol) of compound **10** in 5 mL of pyridine. The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. After that time, the excess of pyridine was eliminated under vacuum, and the resulting crude was partitioned between 20 mL of water and 20 mL of CH_2Cl_2 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was evaporated under vacuum to give compound **11** (66.1 mg, yield 75%) as a pale yellow solid.

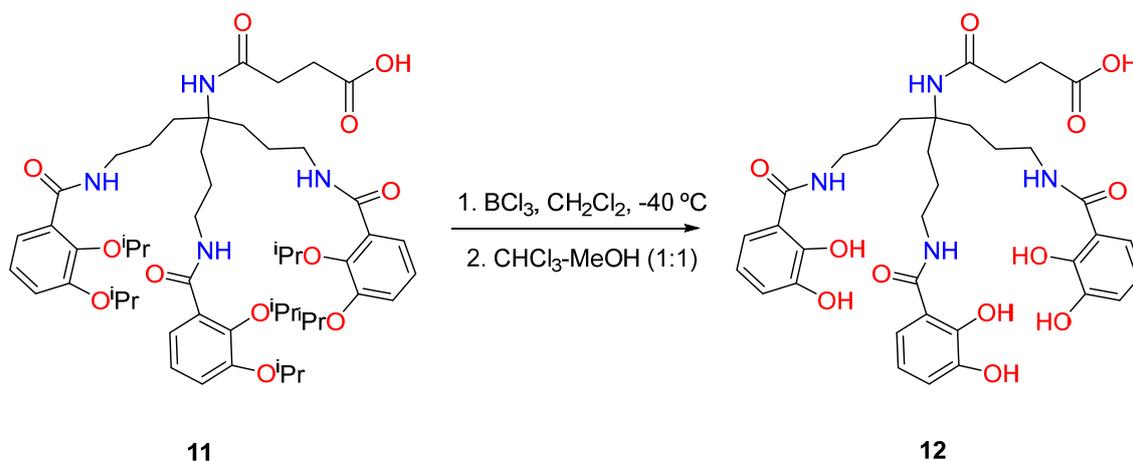
NMR-¹H (400 MHz, CDCl_3), δ_{H} ppm: 8.1 (t, $J = 5.8$ Hz, 3H), 7.6 (dd, $J = 1.6, 6.2$ Hz, 3H), 6.9 (dd, $J = 1.1, 6.6$ Hz, 3H), 4.6 (sep, $J = 18.7, 12.4, 4.7$ Hz, 3H), 4.5 (sep, $J = 18.1, 11.8, 6.2$ Hz, 3H), 3.4 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.7 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 1.7 (m, 6H), 1.5 (m, 6H), 1.3 (d, $J = 6.1$ Hz, 9H), 1.2 (d, $J = 6.2$ Hz, 9H).

NMR-¹³C (100 MHz, CDCl_3), δ_{C} ppm: 174.1 (CO), 172.1 (CO), 166.2 (CO), 150.8 (C), 146.0 (C), 128.3 (C), 123.7 (CH), 122.9 (CH), 118.4 (CH), 58.6 (CH), 76.4 (CH), 71.2 (CH), 40.2 (CH_2), 32.5 (CH_2), 29.8 (CH_2), 28.5 (CH_2), 23.9 (CH_2), 22.4 (CH_3), 22.1 (CH_3).

(+)-LR-ESIMS m/z : 963.57 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 985.55 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

(-)-LR-ESIMS m/z : 961.55 $[\text{M}-\text{H}]^-$

(+)-HR-ESIMS m/z : 961.5543 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{77}\text{N}_4\text{O}_{12}$ 961.5512)

Synthesis of compound **12**

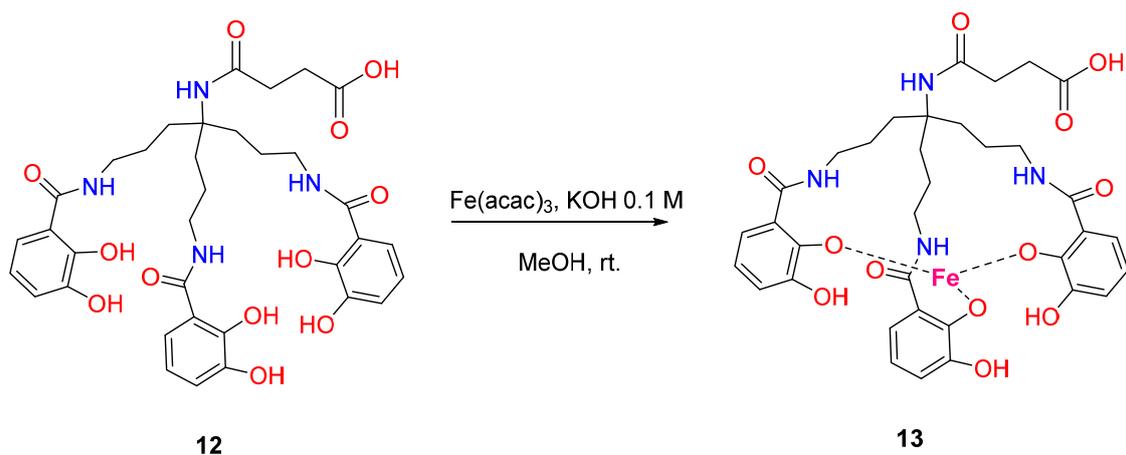
To a solution of compound **11** (66.9 mg, 0.068 mmol), in CH_2Cl_2 (10 mL) cooled to $-78\text{ }^\circ\text{C}$, a 1 M solution of BCl_3 in CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1.0 mmol) was added dropwise. It was allowed to reach slowly to $-40\text{ }^\circ\text{C}$ and was stirred overnight. After this time, H_2O (5 mL) was added at $-40\text{ }^\circ\text{C}$, allowed to reach room temperature and stirred for 20 min. The solvent was evaporated under vacuum, and the residue was purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20) to give compound **12** as a yellow solid (55% yield).

NMR- ^1H (400 MHz, CD_3OD), δ_{H} ppm: 7.2 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 6.9 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 6.7 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 3.4 (m, 2H), 2.5 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 1.7 (m, 6H), 1.6 (m, 6H).

NMR- ^{13}C (100 MHz, CD_3OD), δ_{C} ppm: 175.1 (CO), 172.5 (CO), 170.1 (CO), 148.8 (C), 145.8 (C), 118.2 (CH), 117.3 (CH), 115.5 (C), 58.1 (CH), 39.3 (CH_2), 31.6 (CH_2), 30.7 (CH_2), 28.8 (CH_2), 22.8 (CH_2).

(-)-LR-ESIMS m/z : 709.28 [M-H] $^-$

(-)-HR-ESIMS m/z : 709.2711 [M-H] $^-$ (calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_{12}$ 709.2726)

Synthesis of iron(III) complex **13**¹⁷⁶

Compound **12** (16.0 mg, 0.026 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL), degassed by Ar bubbling and 9.4 mg (0.026 mmol) of Fe(acac)_3 was added. Then, a solution of 0.1 M KOH in MeOH (720 μL) was added. The resulting mixture was stirred for 6 h, the solvent was evaporated under vacuum, and the residue was purified by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20) to give compound **13** as a red solid (19.1 mg, yield 95%).

(-)-LR-ESIMS m/z : 762.20 $[\text{M-H}]^-$, 380.60 $[\text{M-H}]^{2-}$

(-)-HR-ESIMS m/z : 762.1811 $[\text{M-H}]^-$ (calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Fe}$: 762.1841),
 380.5882 $[\text{M-H}]^{2-}$ (calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Fe}$: 380.5884)

6. Conclusiones

Se sintetizaron nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (MNP), se recubrieron con gel de sílice MNP@SiO_2 , se funcionalizaron con APTES para obtener $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$ y se conjugó con feroxamina formado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$.

El conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$ se caracterizó mediante las técnicas TEM, SEM, Magnetización, análisis termogravimétrico, difracción de rayos X, energía de dispersión de rayos X, FT-IR y espectroscopia Raman.

Se estudió la interacción con *Yersinia enterocolitica* WC-A y FoxA WC-A 12-8 mostrando que no hay una diferencia significativa en el número de colonias capturadas con el conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$ en relación con los demás intermedios MNP, MNP@SiO_2 y $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$.

La escasa especificidad se atribuyó a la presencia de interacciones inespecíficas como las fuerzas electrostáticas, debido a cargas positivas presentes en $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$, y a la baja concentración del receptor del sideróforo feroxamina en la membrana de la bacteria.

Los grupos amino en el conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$ fueron bloqueados con grupos Boc y COOH obteniéndose $\text{MNP@SiO}_2\text{@NHBoc@Fa}$ y $\text{MNP@SiO}_2\text{@NHCOOH@Fa}$. Se probaron en el ensayo con *Y. enterocolitica* WC-A sin obtener un resultado substancialmente diferente a lo observado con el conjugado sin bloquear.

Adicionalmente, se sintetizó un análogo de enterobactina utilizando isopropilo como grupo protector de los grupos hidroxilo del ácido 2,3-dihidroxibenzoico, lo que permitirá ampliar el rango de moléculas con capacidad sideróforo en estudios futuros.

CAPÍTULO III

**Productos naturales producidos
por bacterias**

Capítulo III

Introducción

1. Estudio químico de bacterias marinas.

En el hábitat marino las bacterias pueden encontrarse tanto libres como asociadas a otros organismos. Las bacterias libres suelen formar parte tanto del sedimento marino como en la columna de agua; mientras que las bacterias asociadas pueden vivir en relaciones simbióticas, oportunistas con macroorganismos marinos. Varios estudios han demostrado que los microorganismos posiblemente son las verdaderas fuentes de moléculas con actividad biológica, entre otras, antimicrobiana, antifúngica y citotóxica, que fueron previamente aisladas de macroorganismos.²⁰⁰ Como consecuencia es interesante resaltar que, de los siete agentes terapéuticos de origen marino aprobados por la Agencia Americana de Fármacos y Medicamentos (FDA, *Food and Drugs Agency*) cuatro anticancerosos, un antiviral, un analgésico y otro para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, que fueron aislados de moluscos, esponjas y tunicados, realmente seis de ellos son de origen microbiano como se ha demostrado en los estudios biosintéticos. La única notable excepción es la ziconotida ya que parece ser producida *de novo* por el molusco.²⁰¹

Aunque no se conoce con precisión cuál es el papel ecológico específico de los microorganismos asociados a invertebrados. En algunos estudios realizados con bacterias simbiotes de macroalgas se ha logrado demostrar que estas bacterias son capaces de producir sustancias que impiden la colonización de la superficie del alga hospedadora por parte de micro y macroorganismos oportunistas o predadores. Esto nos permite pensar que dichas sustancias pueden estar actuando o bien como agentes antimicrobianos debido a su actividad antibiótica o bien como inhibidores de los sistemas de comunicación bacteriana *quorum sensing* (QS), y que por lo tanto protejan al holobionte de la epibiosis.²⁰²

Entre otras razones con el fin de tener acceso a la diversidad química que éstos poseen, se sabe que los organismos eucariotas multicelulares son más limitados en cuanto a sus capacidades bioquímicas y metabólicas que los microorganismos.²⁰³ Por ello, muchos macroorganismos han establecido relaciones simbióticas con una gran diversidad de microorganismos. Entre los grupos taxonómicos con mayor diversidad metabólica y bioquímica están los microorganismos de los dominios Bacteria y Archaea, además de algunos organismos unicelulares de Eukarya.²⁰³ Como ejemplo

de este tipo de relaciones simbióticas se pueden mencionar que algunos peces y calamares mantienen “cultivos” de bacterias bioluminiscentes,^{204,205} o que algunos bivalvos que viven en cercanías de respiraderos hidrotermales, dependen para su supervivencia de las bacterias quimioautótrofas asociadas a ellos.²⁰⁶ También ha sido muy estudiada la dependencia que presentan la mayoría de los cnidarios de sus simbiontes fotosintéticos.²⁰³

De otro lado, los invertebrados marinos son conocidos por producir compuestos con estructuras sin precedentes en el mundo terrestre. Además estos metabolitos suelen tener actividades biológicas (anticáncerosos, antimicrobianas, antivirales, antituberculosas, etc) aún más potentes que los organismos terrestres.²⁰⁷ Sin embargo, la explotación directa de estos macroorganismos como fuente de compuestos bioactivos presenta múltiples problemas, entre otros: sus ciclos de crecimiento lentos, su difícil recolección en el ambiente natural y el posible daño en los ecosistemas en donde se encuentran, su pequeño tamaño, o el bajo rendimiento en la producción del compuesto activo, etc. Si bien existen métodos alternativos, tales como la acuicultura y la maricultura, es de destacar que han sido empleados con éxito en casos particulares.^{203,208–211}

Finalmente, en la bibliografía especializada actual es cada vez más común encontrar ejemplos en los que se demuestra que los compuestos obtenidos de los extractos de invertebrados marinos, particularmente de los sésiles, son en realidad producidos por microorganismos asociados al invertebrado.²¹² Por tanto, los microorganismos simbióticos cultivables en condiciones *in vitro* pueden ser una alternativa interesante para la producción de compuestos biológicamente activos de manera sostenible sin impactar el ecosistema. Esta aproximación podría contribuir a la resolución del problema del suministro que presentan de manera tan notable los productos naturales marinos. No obstante, en el estudio de las condiciones de cultivo de estos microorganismos asociados, todavía no se conocen con exactitud los procesos de la regulación bioquímica que rigen la producción de los compuestos de interés, así como se puede optimizar su biosíntesis en condiciones *ex symbio* (microorganismos simbióticos cultivados fuera del ambiente del hospedador).²⁰³

1.1. Ejemplos de microorganismos marinos como productores de compuestos

Los microorganismos han sido objeto de múltiples estudios desde el descubrimiento de la penicilina y su producción a gran escala durante la II Guerra

Mundial, y debido a la gran variedad de compuestos y fármacos que son producidos a partir de ellos. Por otro lado, la mayoría de los microorganismos han desarrollado estrategias de defensa química contra otros micro- y macroorganismos. Los compuestos producidos por bacterias y hongos también poseen funciones ecológicas de protección ante condiciones ambientales adversas.²⁰⁰ Gracias a las nuevas tecnologías de análisis y técnicas de cultivo, este tipo de compuestos pueden ser aprovechados por el hombre para el descubrimiento de nuevas entidades químicas y la búsqueda de actividad biológica.

En la última década, se han dedicado muchos esfuerzos en el estudio de microorganismos marinos tales como las cianobacterias, los hongos y una gran diversidad de grupos de eubacterias. El estudio de estos microorganismos ha dado como resultado el nacimiento de una nueva química de productos naturales.²¹³ Un gran número de grupos de investigación alrededor del mundo han cultivado bacterias marinas obtenidas de fuentes diversas tales como sedimentos de gran profundidad, superficies animadas e inanimadas y de los tejidos de los macroorganismos²¹⁴ con miras a investigar su producción metabólica.

El medio ambiente marino es un ecosistema complejo de gran diversidad biológica. Ejemplo de ello son las superficies de los organismos eucariotas bentónicos, las cuales están cubiertas por comunidades complejas de microorganismos capaces de formar biopelículas. El consorcio microbiano que forma la biopelícula difiere significativamente en la cantidad y diversidad de especies que lo constituye si se compara con el que se encuentra en las aguas circundantes que rodean al hospedador. Esto sugiere que el holobionte, compuesto por el macroorganismo hospedero conjuntamente con los microorganismos asociados, selecciona activamente las bacterias que se asientan sobre la superficie del mismo. Como ejemplo se puede citar los trabajos de Rohwer y colaboradores que demostraron que la población bacteriana asociada al hexacoral *Montastraea franksi* y la comunidad bacteriana de las aguas circundantes presenta una similitud de mínima a nula.²¹⁵ Adicionalmente, muchos estudios han demostrado que estas “superficies vivas” son ricas en microorganismos capaces de producir una gran variedad de compuestos bioactivos, lo cual se traduce en un inmenso potencial para el desarrollo biotecnológico y su aplicación en la industria farmacéutica. La capacidad de estas “superficies vivas” de seleccionar las bacterias que se asientan puede ser útil en la búsqueda de anticolonizadores (*antifoulants*) y de compuestos inhibidores del *quorum sensing* (IQS). Es de esperar que estos microorganismos formadores de la biopelícula regulen la llegada de otros micro- y macroorganismos, seguramente mediante

quimiorregulación que pueden estar actuando como disuasores o inductores del asentamiento.²⁰⁹

Por otro lado, los microorganismos epibióticos han desarrollado mecanismos de adaptación especializado, estables y específicos al microambiente creado por el organismo hospedador. Este alto nivel de especificidad de las comunidades microbianas permite inferir que existen relaciones estrechas “de doble vía” entre los microorganismos epibióticos y su hospedador eucariótico, haciendo que ambos vivan en sintropía, participando del ciclo de nutrientes.²⁰⁹ Aunque han sido reportadas comunidades microbianas en las superficies formadas por esponjas, bivalvos y ascidias, entre otros, el tipo de relación entre estos microorganismos y su hospedador no está del todo claro, lo cual ha llevado a que se hayan planteado muchas hipótesis acerca de estas relaciones simbióticas. Además, se ha propuesto que los microorganismos pueden llegar a ayudar a prevenir la depredación del hospedero mediante la producción de moléculas bioactivas.²¹⁶

La salinosporamida A (Figura 40) y los compuestos relacionados producidos por actinomicetos del género *Salinospora* que han sido aislados a partir de sedimento marino, muestran una fuerte actividad citotóxica y antimicrobiana. Se debe resaltar que la salinosporamida A, la cual actualmente se encuentra en fase I de estudios clínicos por su actividad citotóxica como inhibidor de proteasoma en células cancerosas.²⁰¹ En general, las bacterias del género *Salinospora* producen compuestos con estructuras novedosas con una fuerte actividad citotóxica, convirtiéndolas en una fuente importante de compuestos con potencial farmacológico.²¹⁷

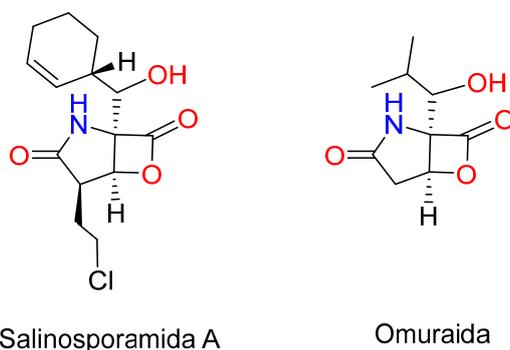


Figura 40. Compuestos aislados de bacterias del género *Salinospora*

La macrolactina V, obtenida a partir de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (Figura 41), es una macrolactona de 24 miembros con una fuerte actividad antibacteriana, que se ha aislado a su vez de la gorgonia *Junceella juncea* en Sanya,

China.²¹⁸ A partir de esta misma bacteria se obtuvieron algunos metabolitos ya conocidos como el 4-butoxifenol, y compuestos fenólicos que se aislaron por primera a partir de una fuente natural como el propoxifenol y el 4-etoxifenol. Estos derivados fenólicos poseen actividad antilarvaria contra *Balanus amphitrite*, lo cual los convierte en potenciales compuestos anticolonizadores.²¹⁸ Otros compuestos obtenidos de bacterias marinas son las surfactinas de *Bacillus pumilus*, que incluyen la C₁₄-surfactina O-metiléster (Figura 41), que mostró actividad contra líneas celulares tumorales humanas.²¹⁹ *B. pumilus* se aisló del hexacoral *Palythoa* sp. recolectado en el Lago Ku-Lao-Re en Vietnam.

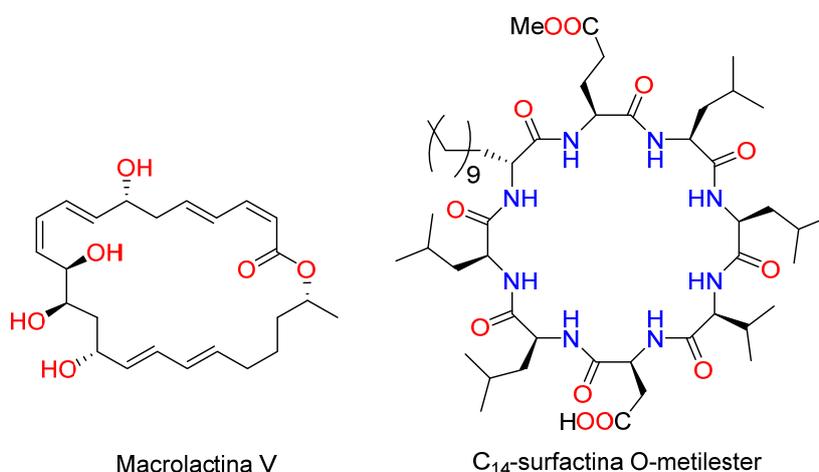


Figura 41. Macrolactina V producida por *B. amuloquefaciens* y C₁₄-surfactina O-metiléster aislada de *B. pumilus*.

Las dicetopiperazinas derivadas de la prolina (Figura 42) fueron aisladas inicialmente de la esponja *Tedania ignis* por Schmitz y colaboradores, y posteriormente, se determinó que estos compuestos eran en realidad producidos por la bacteria *Micrococcus* sp., aislada del tejido de *T. ignis*.²²⁰ Otro ejemplo es la briostatina (Figura 42), un policétido con actividad citotóxica, obtenidos a partir de la bacteria *Candidatus Endobugula serluta*, a su vez aislada de la superficie del briozoo *Bugula neritina*, de donde se aislaron originalmente las briostatinas.²²¹ Actualmente la briostatina-1 se encuentra en estudios clínicos en fase II.²⁰¹

El ejemplo más significativo, por su importancia biomédica y económica, es la producción de la cianosafracina B (Figura 42) por parte de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, simbiote del tunicado *Ecteinascidia turbinata*. Este compuesto se usa en la preparación de la ecteinascidina 743. Es un intermediario avanzado de su síntesis, ya que permite, mediante una serie de reacciones relativamente sencillas, obtener ET-743.²⁰⁸ ET-743 fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 2007

y por la FDA en 2011 como fármaco para el tratamiento del cáncer y actualmente es comercializado por Pharmamar con el nombre comercial de Yondelis®.

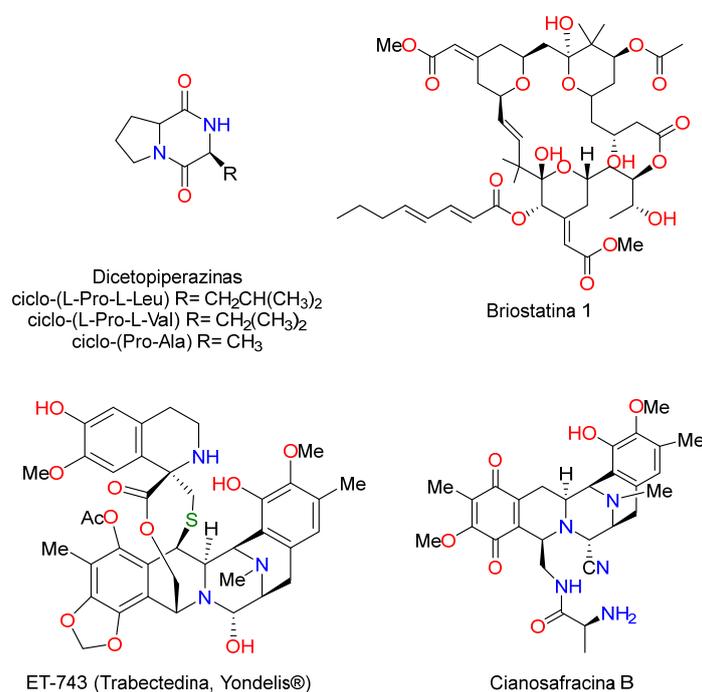


Figura 42. Dicetopiperazinas producidas por *Micrococcus* sp. asociado a la esponja *T. ignis*; briostatina-1; ET-743 y su precursor sintético la cianosafracina B.

Por otro lado, se está incrementando de forma espectacular el número de compuestos aislados de bacterias. Más de 200 compuestos producidos por microorganismos marinos han sido descubiertos por año en la última década.²²² La mayoría de los compuestos publicados en la bibliografía se han obtenido a partir de los siguientes cinco *phyla*: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, y de algunas fuentes sin clasificación taxonómica.²¹⁴

Hasta la fecha ningún compuesto aislado directamente de un microorganismo marino ha sido aprobado como agente quimioterapéutico por la FDA. Por medio de estudios de metabolómica y genómica, se ha establecido que la mayoría (16 de 20) de los compuestos de origen marino que actualmente están en se encuentran fases clínicas son en realidad producidos por microorganismos.²²² Un ejemplo de estos son, la briostatina 1 (Fase II) y la salinosporamida A (Fase I).²⁰¹ En la Figura 43A se muestra la distribución del origen primario de los 20 compuestos que han sido aprobados o en fases clínicas avanzadas, mientras en la Figura 43B se observa la distribución en cuanto a su verdadero origen metabólico.²⁰¹

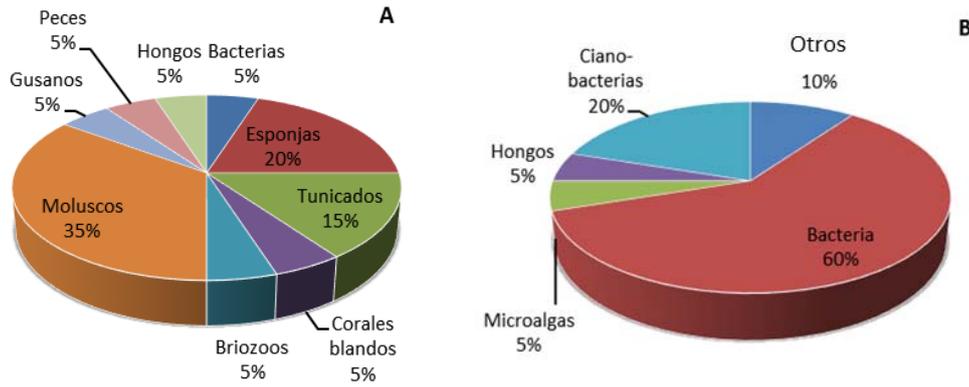


Figura 43. Fuentes de productos naturales marinos que se encuentran actualmente aprobados como fármacos o se encuentran en fases clínicas (20 en total). **A.** Distribución por organismos donde fueron originalmente aislados. **B.** Distribución de acuerdo a los organismos de los que se cree son los verdaderos productores. Las cianobacterias se presentan fuera del dominio bacteria por sus características fisiológicas y metabólicas. Adaptada de la referencia.²⁰¹

Bajo este panorama los microorganismos marinos no sólo presentan una gran biodiversidad biológica sino que también representan una gran variedad en cuanto a sus rutas biosintéticas, lo cual se traduce en un alto potencial para el descubrimiento de nuevas moléculas a partir de una fuente “cultivable”, con posibles aplicaciones en diversos campos, principalmente en el de las ciencias biomédicas.

1.2. Producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo de microorganismos marinos asociados a invertebrados

A diferencia de los macroorganismos que son directamente recolectados a veces en grandes cantidades de su hábitat, los microorganismos pueden ser cultivados para la producción de los productos naturales. Para ello es necesario encontrar las condiciones adecuadas que permitan su cultivo, puesto que se estima que sólo un 1% de los microorganismos pueden ser cultivados en un laboratorio. La obtención de microorganismos sólo demandan de una pequeña muestra como un trozo de esponja, coral, sedimento u otro material, teniendo así un impacto menor sobre el ecosistema y evitando así el deterioro del hábitat como podría ser un arrecife de coral.²²³

Los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos son producidos bajo condiciones ambientales específicas y su biosíntesis está estrictamente regulada por la expresión génica. Sin embargo, bajo condiciones de laboratorio, y empleando cepas puras, no se producen muchos de los metabolitos que potencialmente son capaces de biosintetizar, perdiéndose así la posibilidad de obtener una gran diversidad de compuestos. Por ejemplo, aunque los estudios del genoma de *Streptomyces coelicolor* revelan la existencia de más de 20 *clusters* de genes correspondientes a

rutas biosintéticas, sólo unas pocas rutas permanecen activas en condiciones *in vitro*, por tanto sólo se pueden obtener unos pocos compuestos de la gran diversidad que la cepa está en capacidad de producir.²²⁴ Por ello, es de suma importancia conocer las funciones ecológicas de estos metabolitos, así como las condiciones específicas en las que se da su biosíntesis, para lograr la producción de estos compuestos en condiciones *in vitro*.^{225,226}

Las investigaciones acerca de las interacciones entre microorganismos y sus hospedadores, evidencian que la producción de compuestos por parte de los microorganismos asociados está regulada por una intrincada señalización entre ellos y sus hospedadores. Estos compuestos pueden prevenir el asentamiento, el crecimiento o la supervivencia de los organismos competidores.²²⁷ Así, esta comunicación intra- e interespecies mediada por señalización química, es particularmente importante para la adhesión de microorganismos sobre las superficies del hospedador. Sin embargo, el papel que cumplen los diferentes metabolitos secundarios producidos por ellos aún no es del todo claro.²²⁸ Existe una hipótesis que propone que para aquellos macroorganismos marinos que carecen de defensas químicas, es esencial mantener relaciones simbióticas con microorganismos capaces de producir compuestos que eviten el ataque por parte de otros organismos.^{229,230}

Una vez aisladas las cepas, se pueden preparar cultivos que permitan la identificación de los compuestos producidos. Posteriormente, se lleva a cabo la optimización de las condiciones de producción de dichas sustancias, lo cual incluye desde la selección de la cepa a cultivar hasta las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo óptimas para la producción (pH, medio, temperatura. etc.). En algunos casos ya se cuenta con procesos semi automatizados de cultivo que permiten seleccionar, a partir de un gran número de cepas similares aquella(s) que produzca(n) el(los) compuesto(s) de interés. Con el fin de optimizar la producción de metabolitos una aproximación es la biotecnológica, que puede conllevar la manipulación genética del organismo para aumentar el rendimiento en la producción de la sustancia de interés. Esto requiere un equipo de trabajo multidisciplinario, así como un conjunto completo de bioensayos.²²³ En otras aproximaciones se prefiere el cultivo de un conjunto de microorganismos que garantizan una mejor productividad que el cultivo de cepas puras.²³¹

A pesar de la gran importancia de las relaciones simbióticas y más de 20 años de estudios, no se ha encontrado suficiente evidencia experimental que demuestre si el hospedador es capaz de atraer selectivamente a sus epibiontes.²²³ Sin embargo, se ha

logrado establecer que algunos productos naturales del hospedador, e inclusive antibióticos en cantidades subinhibitorias, pueden actuar como moléculas señalizadoras para promover estos dos efectos: la producción de metabolitos secundarios por parte de los microorganismos y el asentamiento de otros microorganismos sobre esta superficie.²³²

Esta interacción tan compleja antes descrita puede resultar en que el microorganismo aislado del macroorganismo no sea capaz de producir por sí mismo los compuestos que produce cuando forma parte del holobionte, o de la comunidad bacteriana, y de hecho en muchos casos es posible que no sobreviva tampoco.²²³

En el contexto anterior resulta claro que el cultivo de microorganismos en laboratorio, si bien es una fuente sostenible de compuestos complejos y bioactivos, sólo permite revelar un intervalo pequeño del perfil metabólico de la cepa de estudio. Por otro lado, sólo unos pocos microorganismos son cultivables en condiciones de laboratorio. Con el fin de explotar al máximo el potencial de un sólo microorganismo es de suma importancia variar las condiciones de cultivo es decir composición del medio, aireación, recipiente, temperatura, volumen, entre otros y así lograr la expresión de genes silenciados, y por ende, la producción de nuevos compuestos. Por otra parte la utilización de co-cultivos, es decir de mezclas de microorganismos que puedan actuar como competidores o productores de moléculas señalizadoras, o la inclusión de moléculas señalizadoras al medio de cultivo, puede también estimular la producción de los productos naturales en condiciones de laboratorio.²²³

La comunicación bacteriana por QS, es uno de los factores responsables de la producción de metabolitos secundarios por parte de bacterias, ya que la concentración de las moléculas señalizadoras, que a su vez depende de la densidad de población bacteriana, activa los genes de producción de ciertas moléculas. En muchos casos los antibióticos, en cantidades subinhibitorias, pueden actuar como moléculas señalizadoras, y por ello estimular la expresión de genes activadores del metabolismo secundario (producción de compuestos, biopelículas, motilidad, etc), Por ello, el empleo de antibióticos en concentraciones subinhibitorias en los medios de cultivos, se está convirtiendo también en una interesante alternativa para activar la producción de compuestos de las bacterias cultivadas.²³³

Otros métodos para estimular la producción de compuestos implican el uso de medios de cultivo con deficiencia de nutrientes, puesto que los microorganismos se ven obligados a controlar su población por medio de la producción de antibióticos o

CAPÍTULO III: INTRODUCCIÓN

moléculas moduladoras del QS, y así reservar los pocos nutrientes disponibles, asegurando su supervivencia. Esta deficiencia también permite la producción de enzimas capaces de degradar sustratos de difícil asimilación.²³³

2. Objetivos

El objetivo general de este capítulo es el estudio químico de productos naturales producidos por *Bacillus cereus* RKHC-09 y *Vibrio anguillarum* RV22. En el caso de *B. cereus* se propuso determinar la estructura de cereusitin A. Por otra parte para *V. anguillarum* se propuso detectar la presencia de piscibactina en la cepa salvaje RV22 y el mutante $\Delta vabF$, para estudiar su rol y contribución en su virulencia. Para llevar a cabo esta parte del trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la estructura del cereusitin A mediante experimentos de RMN mono y bidimensionales y determinar la estereoquímica absoluta mediante el método de Marfey.
- Detectar el complejo de Ga(III) de piscibactina presente en el medio de cultivo *V. anguillarum* el mutante $\Delta vabF$ mediante fraccionamiento y detección por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

3. Discusión de resultados

3.1. Estudio químico de *Bacillus cereus* RKHC-09

3.1.1. Cultivo de *Bacillus cereus* RKHC-09, aislamiento y purificación de cereusitin A

Bacillus cereus RKHC-09 se aisló del octocoral *Antilloorgia elisabethae* recolectado en el mar caribe colombiano.²³⁴ Esta cepa fue seleccionada por medio de un estudio por dereplicación de sus extractos orgánicos en diferentes medios de cultivo mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS, *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) y su actividad antimicrobiana (frente a *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*). El proceso de cultivo, aislamiento y purificación fue llevado a cabo por Ángela Pinzón como parte de su tesis de maestría en el grupo de “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia.

Con el fin de encontrar un medio de cultivo que estimule la producción de metabolitos secundarios, *B. cereus* RKHC-09 se cultivó en 8 medios diferentes. Los extractos orgánicos de cada cultivo fueron obtenidos mediante extracción en fase sólida poniendo en contacto el medio con una resina no iónica, la cual nos permite separar compuestos orgánicos polares de las sales presentes en los medios de cultivo. Mediante análisis de HPLC, se comparó un extracto de medio de cultivo como blanco y los extractos de los cultivos de *B. cereus* RKHC-09 determinándose que en el medio MOLP (*Media Optimum for Lipopeptide Production*²³⁵) se produce un compuesto mayoritario (Figura 44) y por lo tanto se seleccionó este extracto para continuar el estudio químico de los compuestos producidos por esta cepa.

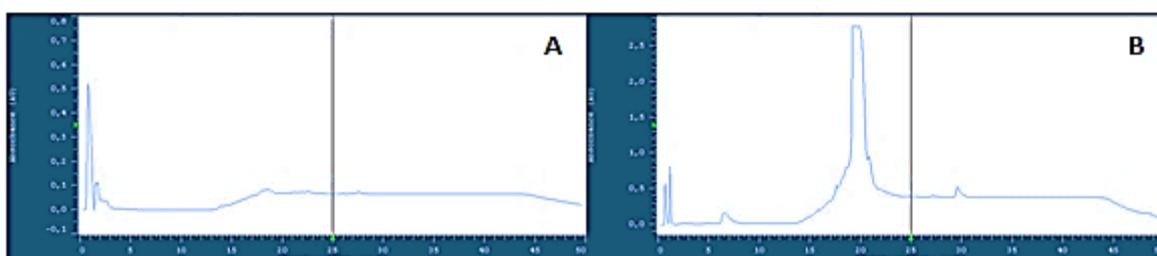


Figura 44. Cromatografía de HPLC (210 nm) **A.** Blanco de medio MOLP **B.** Extracto del cultivo en medio MOLP de *B. cereus* RKHC-09 MOLP.

Para obtener la suficiente cantidad de extracto se prepararon 18 L de cultivo, de los cuales se obtuvieron 10 g de extracto metanólico. Cereusitín A se obtuvo siguiendo el esquema de purificación que se muestra a continuación en la figura 45.

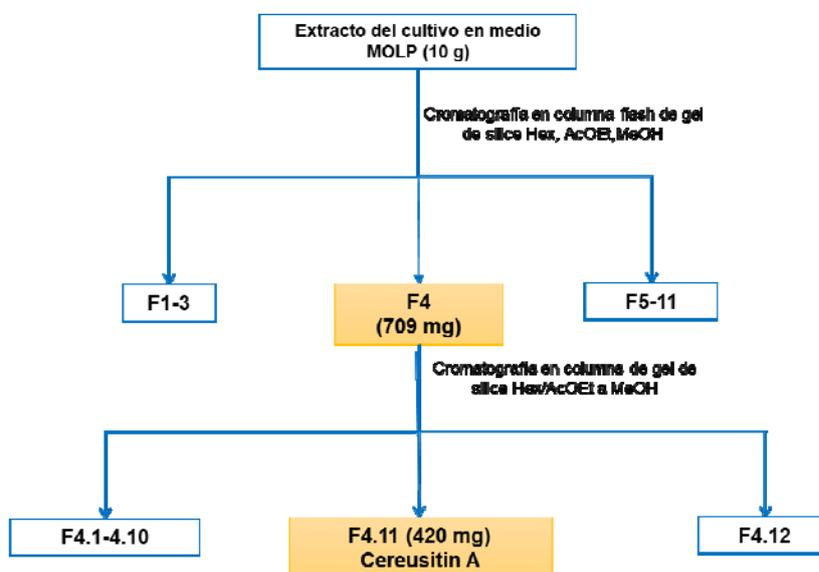


Figura 45. Esquema de aislamiento de cereusitín A a partir del cultivo de *B. cereus* RKHC-09 en medio MOLP.

3.1.2. Elucidación estructural y determinación de la estereoquímica absoluta de cereusitín A

Cereusitín A se obtuvo como un sólido amarillo con una rotación específica $[\alpha]_{25}^D - 33.2^\circ$ (c 0.3, CHCl_3). En el espectro de masas de alta resolución (+)-ESI-HRMS se observó el ión $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 509.2375, correspondiente a una fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$ (calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$ m/z 509.2370, Δ 0.5 ppm), la cual requiere 11 grados de insaturación.

Con la combinación de los experimentos monodimensionales de RMN de ^1H y ^{13}C y el análisis de los espectros bidimensionales ^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC, se dedujo una estructura de tetrapéptido cíclico para cereusitín A (Tabla 9). En el espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , Figura 47) se observan las señales correspondientes a un anillo aromático monosustituido a δ_{H} 7.28–7.16 (5H), características de una unidad bencílica del aminoácido fenilalanina (Phe), dos señales de protones de amida a δ_{H} 6.14 y 5.79 (1H, singuletes anchos), y dos protones metínicos a δ_{H} 4.49, que son característicos de dos unidades de γ -hidroxiprolina (γ Hyp), cuatro protones en posición α de aminoácidos a δ_{H} 4.50, 4.42, 4.38, y 3.99 y dos metilos alifáticos a δ_{H} 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz) y δ_{H} 0.89 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), que

CAPÍTULO III: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

corresponden a una unidad de Leucina (Leu). En el espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , Figura 47) y en el experimento APT (Figura 49) se observa la presencia de cuatro grupos de señales de carbonilo a δ_c 170.5, 169.6, 166.2, y 165.1, señales de carbonos aromáticos entre δ_c 135.6–127.5, cuatro señales correspondientes a los carbonos α a δ_c 57.3, 57.2, 56.0, y 53.3, y dos carbonos de metilos alifáticos a δ_c 23.1 y 21.1.

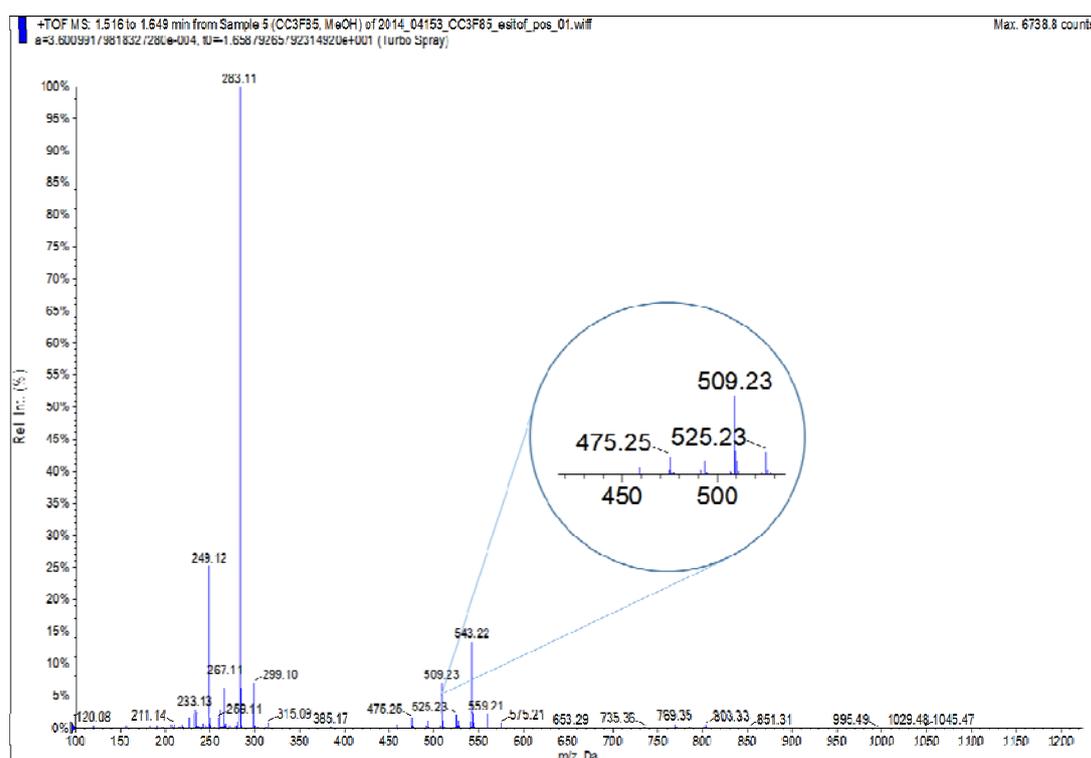


Figura 46. Espectro de masas de baja resolución de cereusitin A

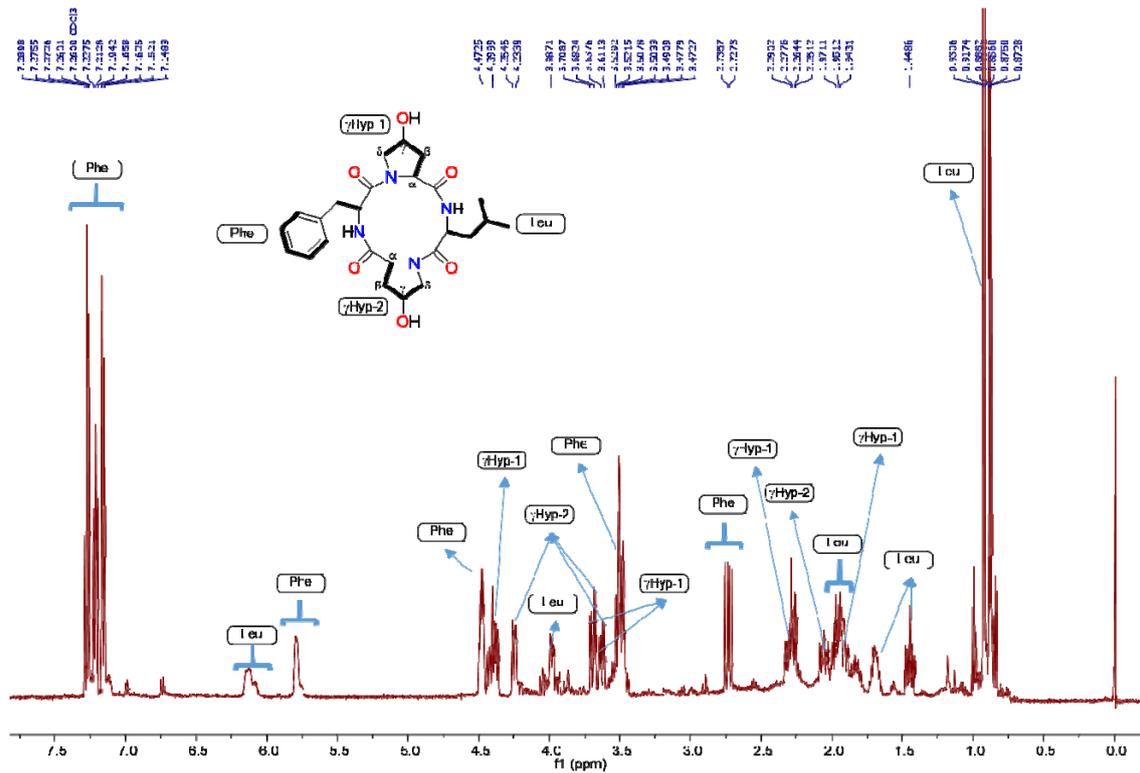


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de cereusitin A

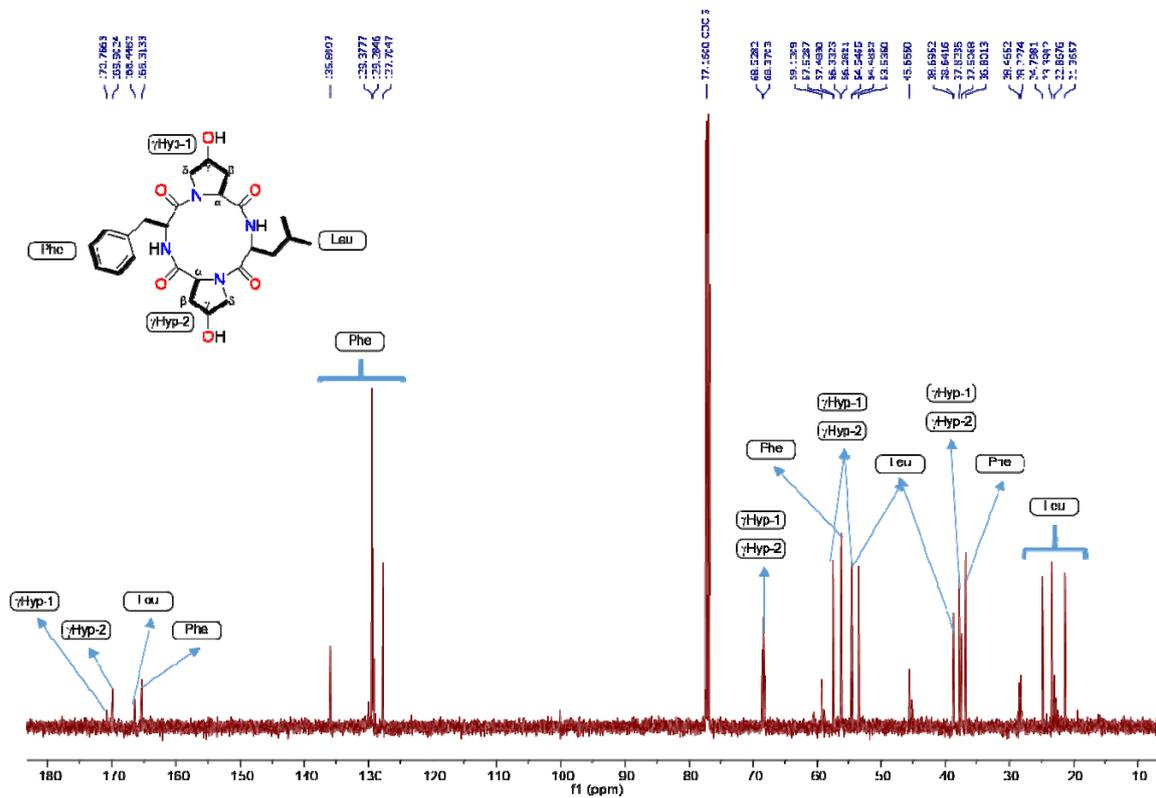


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de cereusitin A

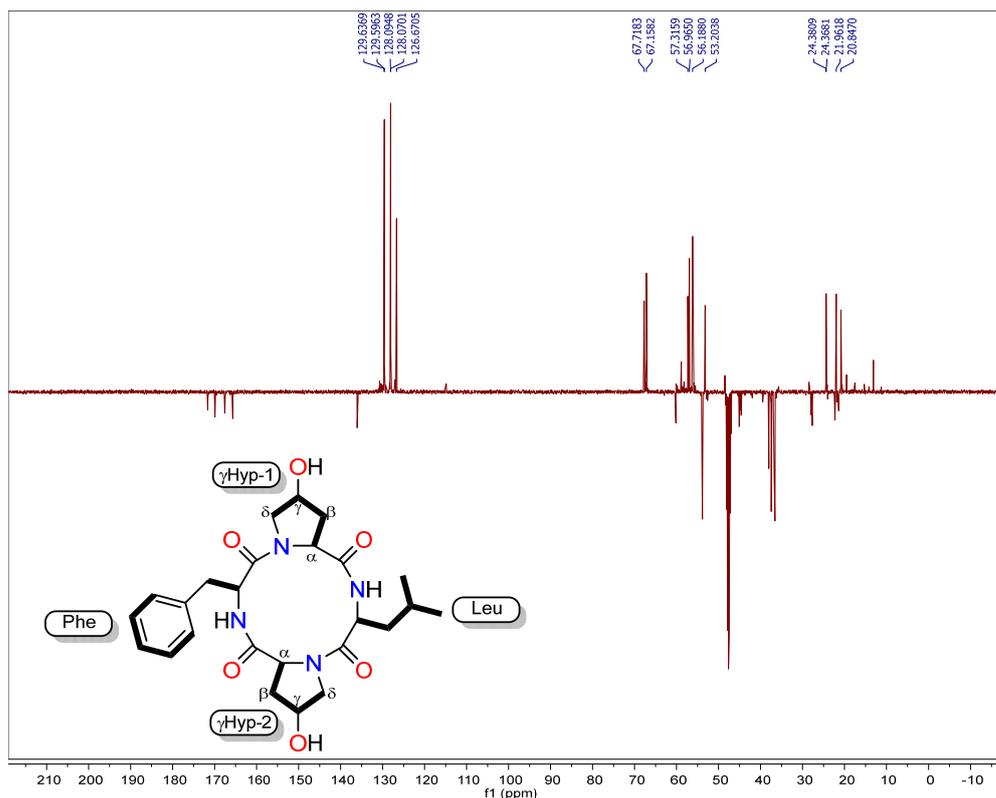


Figura 49. Espectro APT de cereusitin A en CD₃OD (75 MHz)

Tabla 9. Datos de RMN de ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) de cereusitin A en CDCl₃

Aminoácido	Posición	δ_c , mult.	δ_H , mult. (J en Hz)
γ Hyp-1	α	57.3, CH	4.42, dd (6.3, 11.1)
	β	37.3, CH ₂	2.31, dd (6.3, 13.3)
			2.06, m
	γ	68.3, CH	4.49, m
	δ	54.3, CH ₂	3.63, dd (4.3, 13.0)
			3.48, m
	CO	170.5, C	
Phe	NH		5.79, br s
	α	56.0, CH	4.50, dd (3.9, 10.1)
	β	36.5, CH ₂	3.51, m
			2.73, 1H (10.3, 14.5)
	1	135.6, C	
	2/6	129.0 \times 2, CH	7.16, d (7.1)
	3/5	129.1 \times 2, CH	7.28, t, (7.3)
	4	127.5, CH	7.21, t, (7.3)
	CO	165.1, C	

γHyp-2	α	57.2, CH	4.38, dd, (6.3, 11.2)
	β	37.6, CH ₂	2.26, dd, (6.8, 13.2)
			2.06, m
	γ	68.1, CH	4.49, m
	δ	54.3, CH ₂	3.69, dd, (4.5, 13.1)
			3.49, m
	CO	169.6, C	
Leu	NH		6.14, br s
	α	53.3, CH	3.99, dd (3.7, 9.6)
	β	38.4, CH ₂	1.94, m
			1.45, m
	γ	24.6, CH	1.70, m
	δ (CH ₃)	23.1, CH ₃	0.93, d, (6.5)
	δ (CH ₃)	21.1, CH ₃	0.89, d, (6.5)
	CO	166.2, C	

El experimento HSQC-editado permitió la asignación de cada protón a su correspondiente carbono unido directamente (Figura 50). El análisis de los experimentos COSY y HMBC permitió establecer la secuencia de aminoácidos de cereusitin A encontrando, una fenilalanina, una leucina y 2 unidades de γ Hyp.

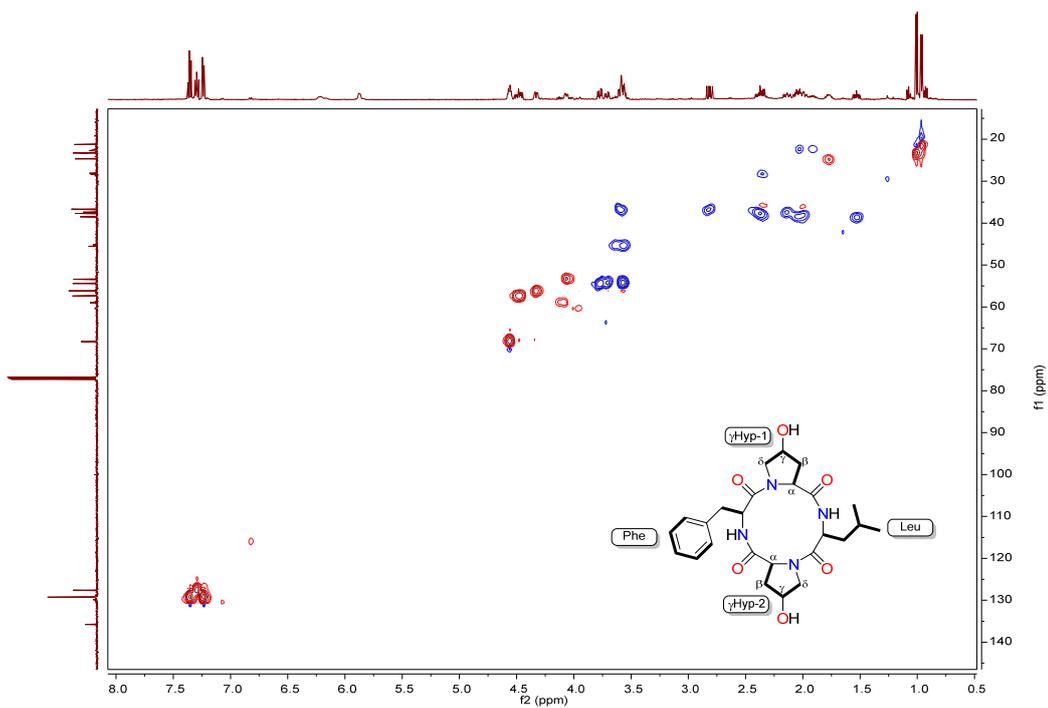


Figura 50. Espectro HSQC-editado (CDCl_3) de cereusitin A (rojo CH, CH_3 , azul CH_2)

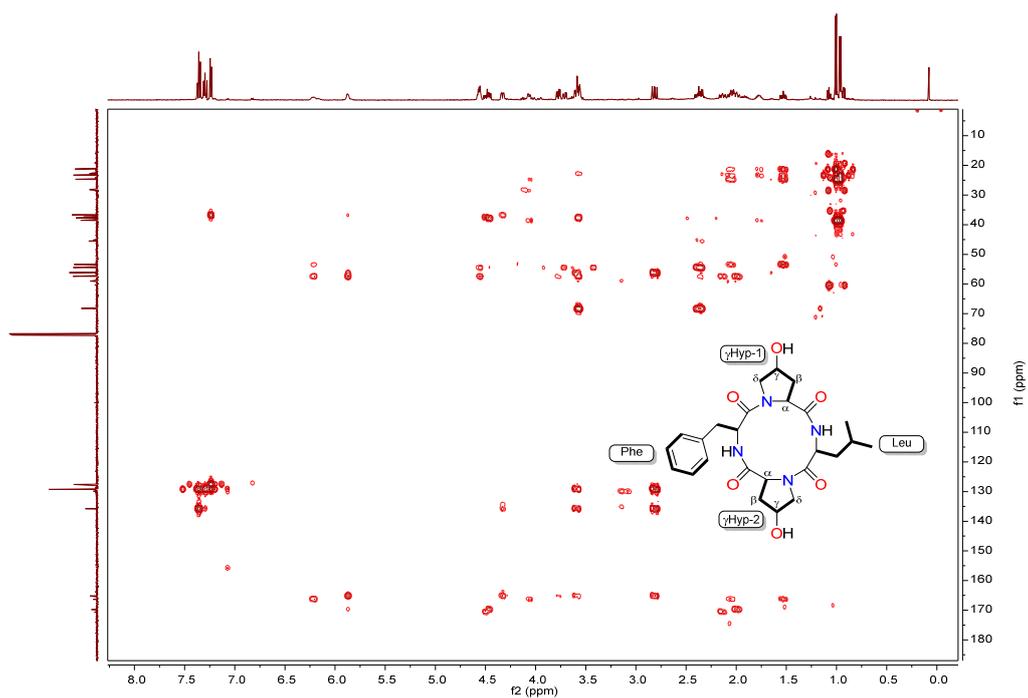


Figura 51. Espectro HMBC (CDCl_3) de cereusitin A

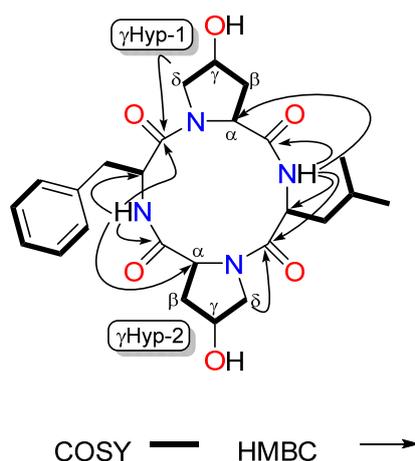
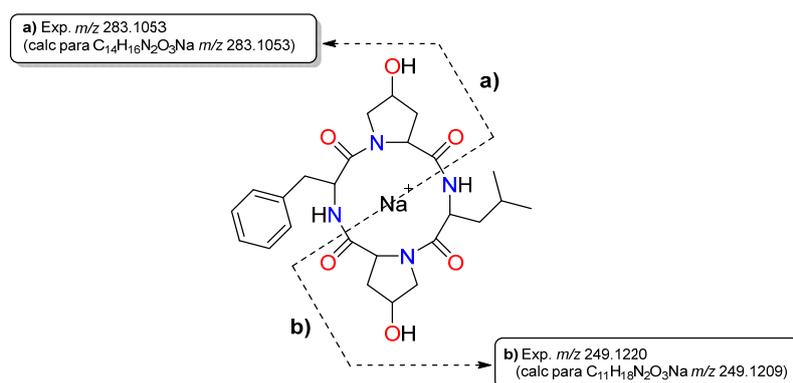


Figura 52. Correlaciones de RMN COSY y HMBC de cereusitin A

Las señales de los carbonos α a δ_C 68.3 y 68.1 se asignaron a cada una de las γ -hidroxiprolinas. La secuencia de aminoácidos se estableció teniendo en cuenta las correlaciones HMBC tal como se muestra en la figura 52. Las correlaciones a larga distancia del protón a δ_H 5.79, asignado como el NH de la Phe, y los carbonilos a δ_C 165.1 de Phe y γ Hyp-2 a δ_C 169.6 y el carbono α de γ Hyp-2 a δ_C 57.2 (Figura 51), y por otra parte, la de los protones- δ de γ Hyp-1 a δ_H 3.63 y 3.48 con el carbonilo de Phe a δ_C 165, permitieron establecer que la Phe se encuentra entre las dos γ Hyp. Adicionalmente, las correlaciones del protón- δ de γ Hyp-2 a δ_H 3.69 y 3.49 con el grupo carbonilo de Leu a δ_C 166.2 y el protón de amida de Leu a δ_H 6.14 con el carbonilo de γ Hyp-1 a δ_C 170.5, indicaron que la Leu se encuentra entre las dos γ Hyp.



Con los resultados anteriores se propuso la secuencia *ciclo*-[Phe- γ Hyp -Leu- γ Hyp], que se confirmó mediante (+)-ESI-HRMS (Figura 53), al mostrar un ión a m/z 283.1053 (calculado para $C_{14}H_{16}N_2O_3Na$ m/z 283.1053, Δ 0.0 ppm) correspondiente a

$[M - \text{Leu-}\gamma\text{Hyp} + \text{Na}]^+$ y el ión m/z 249.1220 (calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ m/z 249.1209, Δ 1.1 ppm) correspondiente a la mitad del fragmento $[M - \text{Phe-}\gamma\text{Hyp} + \text{Na}]^+$.

Una vez establecida la estructura plana se pasó a la determinación de la estereoquímica absoluta mediante el método de Marfey. Este método consiste en hacer reaccionar el reactivo de Marfey con la pareja de aminoácidos enantioméricos, formándose sus respectivos diastereoisómeros, que son fácilmente separables mediante HPLC sin necesidad del uso de columnas quirales. La posterior comparación de los tiempos de retención de estos patrones de aminoácidos hidrolizados y derivatizados del compuesto analizado, permite la resolución de su estereoquímica absoluta.²³⁶

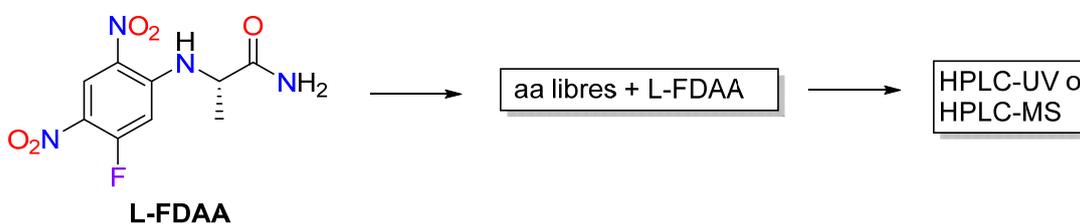


Figura 54. Reactivo de Marfey L-FDAA y proceso general para determinar configuración absoluta de un péptido

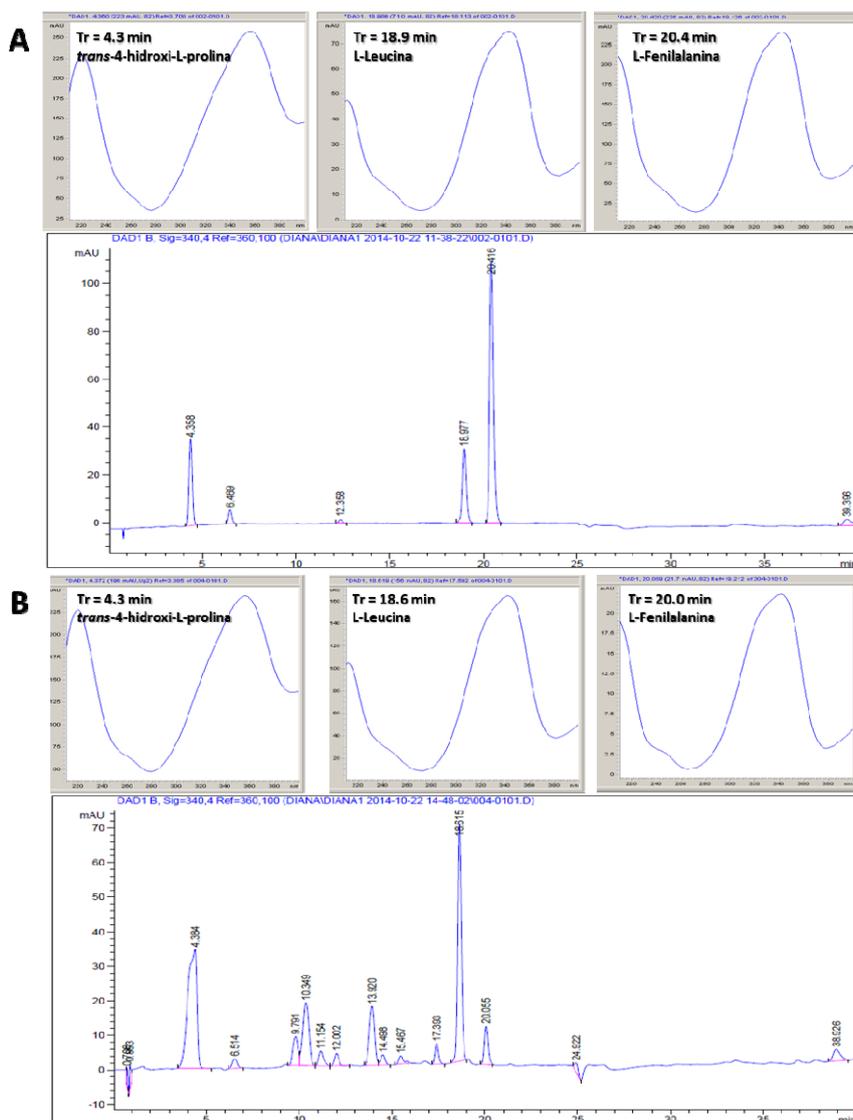


Figura 55. Cromatogramas de HPLC y espectros UV **A.** Derivados de Marfey de los patrones de aminoácidos **B.** Derivados de Marfey del hidrolizado de cereusitina A (detección mediante UV-Vis a 340 nm).

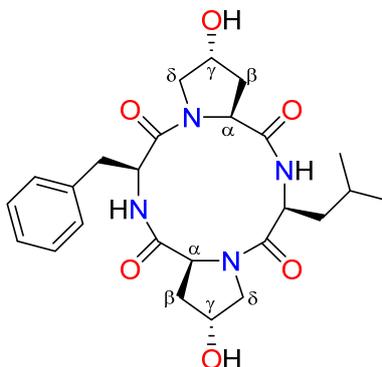


Figura 56. Estructura de cereusitina A (*ciclo*-(L-Phe-*trans*-L- γ Hyp-L-Leu-*trans*-L- γ Hyp)) y su estereoquímica absoluta.

Los aminoácidos libres de cereusitina A se obtuvieron a través de hidrólisis ácida y se hicieron reaccionar con el reactivo de Marfey (Figura 54). Este mismo proceso se

CAPÍTULO III: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

realizó a patrones comerciales de cada aminoácido. Las mezclas de derivados de L-FDAA se analizaron por medio de HPLC y teniendo en cuenta los tiempos de retención (Figura 55) de cada aminoácido derivatizado se determinó que la estereoquímica absoluta para cereusitin A corresponde a *ciclo*-(L-Phe-*trans*-L- γ Hyp-L-Leu-*trans*-L- γ Hyp, Figura 56). Adicionalmente, se realizó un análisis de HPLC-MS para confirmar la masa de cada derivado tanto en la mezcla de patrones como del péptido hidrolizado (Ver anexos).

3.2. Detección de piscibactina en *Vibrio anguillarum* RV22 y el mutante $\Delta vabF$

Como se describió en el capítulo II, los sideróforos son metabolitos secundarios responsables de la captación de hierro (III) en muchos géneros de bacterias. El estudio de este tipo de compuestos constituye un reto, puesto que muchos de ellos son de carácter polar y por su habilidad de quelatar metales hacen que su detección y purificación sea difícil. Además, son determinantes en la virulencia, un fenómeno multifactorial en las bacterias que poseen un amplio rango de mecanismos para colonizar al hospedador y provocar una infección. Los factores de virulencia identificados en *V. anguillarum* incluyen quimiotaxis y motilidad,^{237,238} adhesión,²³⁹ invasión,²⁴⁰ secreción de enzimas,^{241–243} y varios mecanismos de captación de hierro.^{244,245} Sin embargo, aún no se conocen por completo la patogenicidad de esta bacteria.

En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación se aisló por primera vez el sideróforo piscibactina a partir del cultivo de *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, el cual es uno de los principales factores de virulencia en esta bacteria.²⁴⁶ Posteriormente, el análisis del genoma de *V. anguillarum* permitió encontrar en el cromosoma II un grupo de genes similar a los genes *irp* que codifican para la síntesis de piscibactina. Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo fue demostrar la presencia de piscibactina, para ello se estudiaron los cultivos en condiciones de deficiencia de hierro de *V. anguillarum* RV22 y el mutante $\Delta vabF$, al cual se le silenciaron los genes correspondientes a la síntesis de vanrobactina.

3.2.1. Producción simultánea de vanrobactina y piscibactina en *V. anguillarum* RV22

Para demostrar que *V. anguillarum* RV22 produce piscibactina además de vanrobactina, se usó la metodología descrita por Souto y colaboradores,²⁴⁶ que se basa en la extracción en fase sólida con cartuchos HLB y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas HPLC-MS. A los sobrenadantes libres de células de *V. anguillarum* RV22 de cultivos en condiciones de deficiencia de hierro se adicionó GaBr₃ para estabilizar el sideróforo como el correspondiente complejo de galio. El complejo piscibactin-Ga(III) se detectó a un tiempo de retención (t_R) de 9.56 min, y un ión molecular con un valor de m/z 519.9946/521.9933 por análisis de (+)-ESI-HRMS, presentando la característica distribución isotópica de ⁶⁹Ga y ⁷¹Ga en una proporción 3:1. Adicionalmente, vanrobactina se detectó con un t_R de 2.74 min, observando los iones [M+H]⁺ y [M+Na]⁺ a m/z 398.1668 y 420.1486 respectivamente (Figura 57). De esta manera se comprobó que *V. anguillarum* RV22 es capaz de producir ambos

sideróforos de forma simultánea en condiciones de deficiencia de hierro. Posteriormente, se estudiaron los sobrenadantes del cultivo del mutante *V. anguillarum* RV22 Δ vabF, cuyos genes de producción de vancombactina fueron eliminados. El estudio químico de este sobrenadante permitió observar la presencia del complejo piscibactina-Ga(III) a un t_R de 9.71 min y la ausencia de vancombactina (Figura 58).

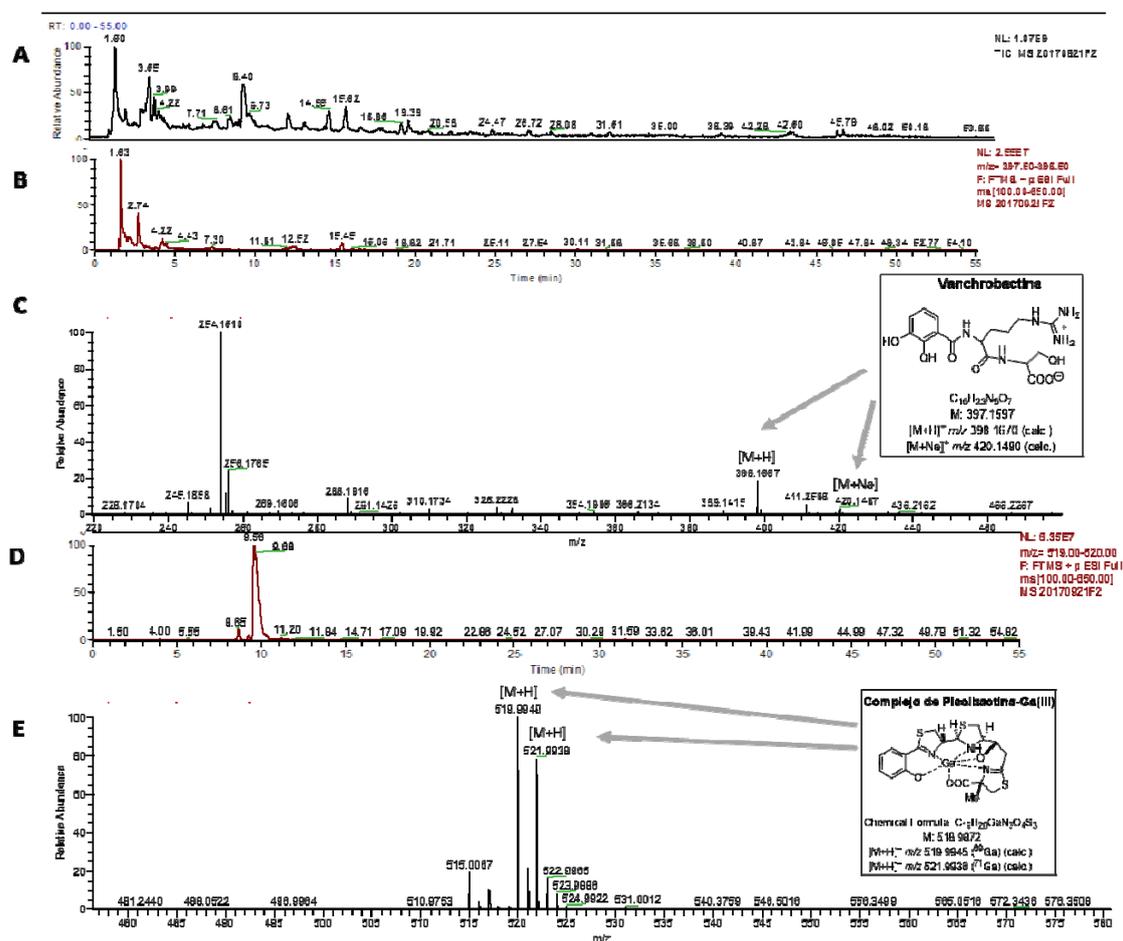


Figura 57. Experimentos de HPLC-MS para la detección de los complejos de vancombactina y piscibactina-Ga(III) de *V. anguillarum* RV22. **A.** Cromatograma de iones totales de la fracción RV22WTF3 eluida con H₂O-CH₃CN (1:1) del cartucho Oasis HLB; **B.** Monitorización selectiva de los iones entre m/z 397.50 a 398.50 mostrando un pico a tiempo de retención 2.74 min; **C.** (+)-HR-ESI-MS del pico a t_R 2.74 min identificado como vancombactina: m/z 398.1666 ([M + H]⁺; calc. para C₁₆H₂₄N₅O₇, 398.1670) y m/z 420.1486 ([M + Na]⁺; calc. para C₁₆H₂₃N₅O₇Na, 420.1490); **D.** Monitorización selectiva de los iones entre m/z 519.97 a 520.15 mostrando un pico a t_R 9.56 min; **E.** (+)-HR-ESI-MS del pico a t_R 9.56 min identificado como el complejo piscibactina-Ga(III): m/z 519.9946/521.9933 ([M + H]⁺, calc. para C₁₉H₂₁N₃O₄S₃⁶⁹Ga 519.9950 y C₁₉H₂₁N₃O₄S₃⁷¹Ga 521.9941).

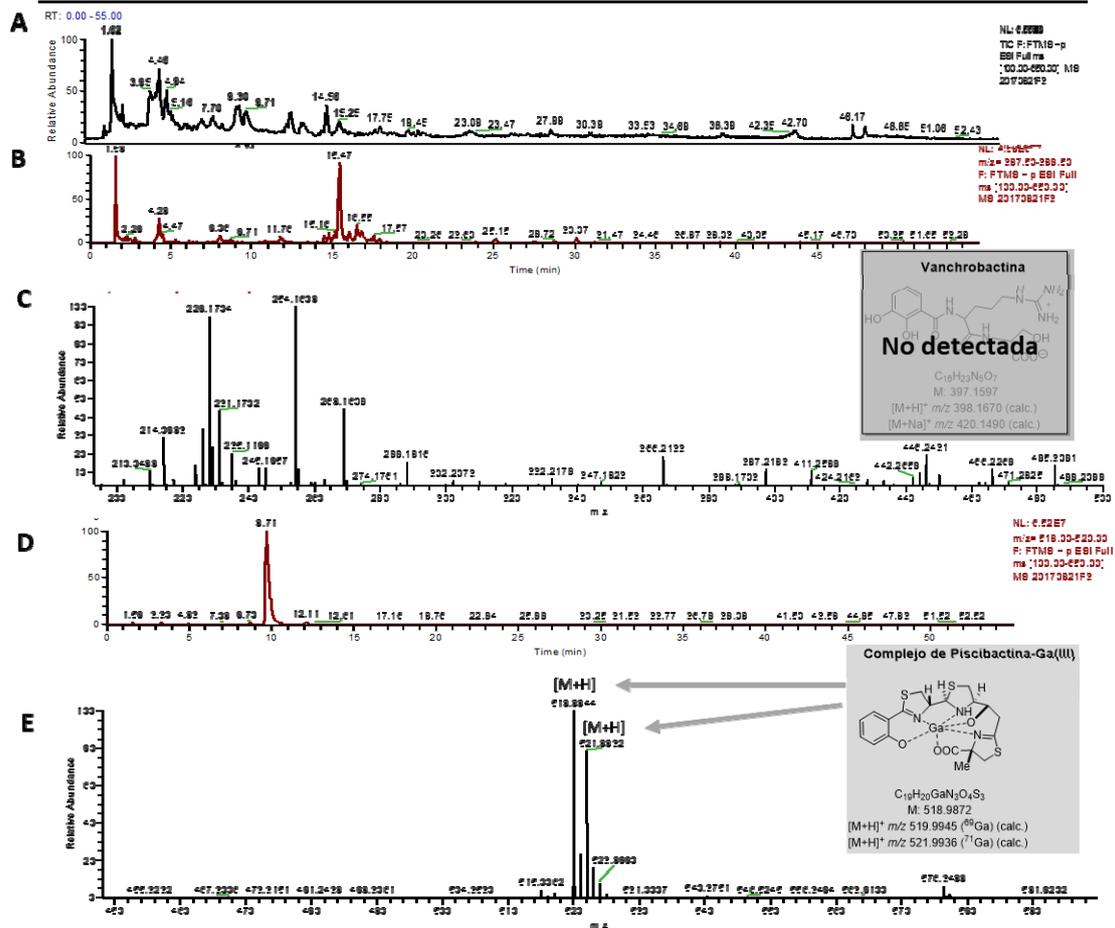


Figura 58. Experimentos de HPLC-MS para la detección de los complejos piscibactina-Ga(III) en el mutante RV22Δ*vabF*. **A.** Cromatograma de iones totales de la fracción RV22Δ*vabF*FF3 eluida con H₂O-CH₃CN (1:1) del cartucho Oasis HLB; **B.** Monitorización selectiva de los iones entre *m/z* 397.50 a 398.50 mostrando dos picos a tiempos de retención de 4.29 y 15.47 min; **C.** (+)-HR-ESI-MS del pico a *t_R* de 2.74 min donde no se observa la presencia de vanchrobactina; **D.** Monitorización selectiva de los iones entre *m/z* 519.97 a 520.15 mostrando un pico a *t_R* 9.71 min; **E.** (+)-HR-ESI-MS del pico a *t_R* 9.71 min identificado como el complejo piscibactina-Ga(III): *m/z* 519.9946/521.9933 ([M + H]⁺, calc. para C₁₉H₂₁N₃O₄S₃⁶⁹Ga 519.9950 y C₁₉H₂₁N₃O₄S₃⁷¹Ga 521.9941).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se pudo comprobar la producción de piscibactina en cepas RV22 y RV22Δ*vabF*. Gracias a esto se realizaron diferentes ensayos para establecer el efecto de la piscibactina en la virulencia y la influencia de la temperatura en la expresión de este sideróforo, estos ensayos fueron realizados en el grupo de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela. Se comparo el comportamiento de ambas cepas en condiciones de deficiencia de hierro. El mutante RV22Δ*vabF* disminuyo considerablemente su crecimiento a 25 °C con respecto a RV22, mientras que a 18 °C ambas cepas crecieron de la misma manera, lo cual permite deducir que a 18 °C la piscibactina esta favoreciendo el crecimiento de RV22Δ*vabF*.²⁴⁷

Por otra parte, para establecer la importancia de la producción de piscibactina en la virulencia, se realizó un ensayo de infección con lenguados. Para este ensayo se usaron dos mutantes adicionales RV22 Δ irp1 que solo produce vancrobactina y RV22 Δ vabF Δ irp1 que no produce ni vancrobactina ni piscibactina y se tuvo en cuenta que la temperatura a la cual se encuentran los peces esta entre 18 ° y 20 °C. Luego de inducir la infección con RV22 y los mutantes RV22 Δ vabF, RV22 Δ irp1, RV22 Δ vabF Δ irp1, se observo que RV22 causo la muerte al 80 %de los peces 5 días después de la infección, la mortalidad de los peces infectados con RV22 Δ irp1 fue de un 56 % pasados 6 días, el mutante RV22 Δ vabF alcanzo un 88 % en la mortalidad a los 5 días y RV22 Δ vabF Δ irp1 tan solo un 12 % en 6 días. De estos resultados se dedujo que, la habilidad de *V. anguillarum* para producir piscibactina es determinante en su virulencia.²⁴⁷

Adicionalmente, al establecer que la temperatura influye en la producción de piscibactina, se estudiaron los niveles de expresión de los genes involucrados encontrando que la expresión de los genes para la producción de vancrobactina disminuyen mientras que aumentan para los de piscibactina cuando *V. anguillarum* crece a 18 °C.²⁴⁷ En consecuencia, la expresión de los receptores de estos sideróforos se ve igualmente afectada y teniendo en cuenta los resultados del ensayo de vacunación descritos en el capítulo I, es posible pensar que al bajar los niveles de expresión de la proteína receptora de vancrobactina FvtA a la temperatura a la cual se realiza el ensayo, no hay suficientes receptores para que haya un reconocimiento por parte de los anticuerpos generados en contra de FvtA, y por lo tanto no se generó protección frente a este patógeno.

4. Parte experimental

4.1. Metodología general

La rotación óptica fue medida en un polarímetro Polartronic E, Schmidt+Haensch. Los experimentos de RMN fueron realizados en los espectrómetros Bruker 300 y 500 Avance. Los disolventes deuterados utilizados fueron: CD₃OD, CDCl₃.

Las separaciones por HPLC se llevaron a cabo en un equipo Agilent HP1200 equipado con detector de fotodiodos (DAD, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) y en un equipo Merck- Hitachi 6000 equipado con detector DAD. Para las separaciones en cromatografía en columna se empleó gel sílice (0.040–0.063 mm, Merck®). Todos los disolventes empleados fueron grado analítico (Merck®). Para centrifugar los cultivos se empleó una centrifuga Beckman J-21 High Speed.

Los análisis de HPLC-HRMS se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas con una fuente de ionización ESI (*Electrospray ionization*) y trampa de iones LTQ-Orbitrap Discovery acoplado a un sistema de HPLC Accela (Thermo Fischer Sci). Las masas obtenidas para los derivados de Marfey fueron obtenidas del módulo FT-MS Orbitrap con una resolución mayor a 30.000 FWHM (*Full width at half maximum*) para obtener las fórmulas moleculares de los iones [M+H]⁺ con una precisión de menos de 5 ppm. Para la separación en el HPLC se empleó una columna Atlantis C18 (4.6 x 100 mm) con una fase móvil que consistió en un gradiente lineal desde 90:10 hasta 60:40 de una mezcla H₂O ácido fórmico al 1% (pH = 3)/MeCN con un flujo de 1 mL/min. Los análisis de los resultados fueron procesados con el software Xcalibur (Thermo Fischer Sci).

4.2. Condiciones de cultivo de *Bacillus cereus* RKHC-09

La cepa *Bacillus cereus* RKHC-09, consignada en nuestra propia colección, se aisló del coral blando *Antollogorgia elisabethae* colectado en el Mar Caribe Colombiano por la Dra. Mónica Puyana, bióloga marina de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá-Colombia.

El medio de cultivo MOLP fue preparado usando los siguientes componentes por litro: peptona (30 g), sacarosa (20 g), KH₂PO₄ (1.9 g), CuSO₄ (0.001 mg), FeCl₃·6H₂O (0.005 mg), Na₂MoO₄ (0.004 mg), KI (0.002 mg), MnSO₄·H₂O (3.6 mg), MgSO₄ (0.45 g), ZnSO₄·7H₂O (0.14 mg), H₃BO₃ (0.01 mg) y ácido cítrico (10 mg).

El cultivo de *B. cereus* RKHC-09 se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agitación de 100 rpm, en 100 mL de medio en erlenmeyers de 500 mL.

4.3. Extracción

Para obtener la suficiente cantidad de extracto se cultivaron 18 L de cultivo. Una vez obtenidos se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min y el sobrenadante obtenido se filtró a través de membrana de 0.45 μ m. Posteriormente se extrajo, dejándolo en contacto con la resina no iónica Diaion HP-20 (relación muestra/resina 10:1 p/v) durante 12 h. La resina se lavó con agua desionizada hasta que no se detectó la presencia de cloruros (determinado mediante ensayo con AgNO_3). Finalmente, el extracto se obtuvo por elución con MeOH y EtOAc. Ambos extractos se mezclaron y el disolvente se evaporó al vacío para obtener 41.5 g.

4.4. Purificación del cereusitin A

El extracto orgánico obtenido (40 g) se fraccionó mediante cromatografía en columna (CC) flash sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente discontinuo usando las siguientes mezclas (v/v): hexano:EtOAc (100:0, 80:20, 50:50, 20:80, 0:100), 11 fracciones (F1 a F11). La fracción F4 (720 mg) se fraccionó por CC con gradiente discontinuo sobre gel sílice con mezclas de hexano/EtOAc/MeOH para obtener 12 fracciones (F4.1-F4.12). Cereusitin A se detectó en la fracción F4.11 (420 mg).

4.5. Determinación de la estereoquímica absoluta por el método de Marfey

Cereusitin A (1.0 mg) se hidrolizó en 5.0 mL de HCl 1.5 M a 110 °C durante 14 h. El derivado de cada aminoácido con el reactivo de Marfey (FDAA) se preparó de acuerdo al método descrito por Bhushan.²³⁶ El análisis HPLC-DAD del derivado de FDAA del ciclopéptido hidrolizado y los estándares (L-leucina, *trans*-4-hidroxi-L-prolina (Aldrich®), L-fenilalanina (Alfa Aesar®) se realizó en una columna Atlantis C18 (4.6 \times 100 mm) con un gradiente lineal de tampón 0.05 M trietilamina fosfato (pH =3)/MeCN 90:10 a 60:40 durante 40 min a un flujo de 2 mL/min, detectándose mediante UV-Vis a $\lambda = 340$ nm.

Derivados FDAA de los patrones

Se toma 50 μ L de la disolución resultante de la de reacción de hidrólisis y se mezclan con 100 μ L de FDAA 1% en acetona, 20 μ L de NaHCO_3 1 M, se calentó a 40 °C durante 1 h, se dejó enfriar y posteriormente se agregaron 10 μ L de HCl 2M. La disolución resultante se llevó a 1 mL con la fase móvil tampón 0.05 M trietilamina fosfato (pH =3)/MeCN 90:10.

Derivados FDAA péptido

A 100 μ L de la disolución resultante de la de-reacción de hidrólisis de cereusitin A y se añadió a 200 μ L de FDAA 1% en acetona y 40 μ L de NaHCO₃ 1 M. La mezcla resultante se calentó a 40 °C durante 24 h, se dejó enfriar y posteriormente se agregaron 20 μ L de HCl 2 M. La disolución resultante se llevó a 1 mL con la fase móvil tampón 0.05 M trietilamina fosfato (pH =3)/MeCN 90:10.

4.6. Detección de piscibactina por LC/HR-MS

Cultivos de V. anguillarum RV22 y RV22 Δ vabF

Para realizar los cultivos de *V. anguillarum* se empleó el medio CM9 cuya composición por litro se describe a continuación: Sales M9 (Na₂PO₄H 6 g; KPO₄H₂ 3 g; NaCl 5 g; NH₄Cl 10 mg); Glucosa 0.25%, Cas-aminoácidos 0.2%, CaCl₂ 0.01 mM, MgSO₄ 0.1 mM.

A 1 L de cultivo se le suplementó con 2,2'-dipiridilo 40 μ M (para tener condiciones de deficiencia de hierro) con agitación a 150 rpm durante 24 h. Cada cultivo se inoculó con 20 mL de un cultivo saturado de *V. anguillarum* RV22 y el mutante RV22 Δ vabF. Cuando se alcanzó una OD₆₀₀=1.0, se añadieron 10 mg de GaBr₃ y se incubó durante 12 h a 4 °C. Las células se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min y los sobrenadantes resultantes se filtraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 μ m.

Fraccionamiento del sobrenadante y análisis por HPLC-HRMS

El sobrenadante libre de células resultante (0.9 L) se concentró al vacío en un rotavapor hasta un volumen de 410 mL. Se tomaron 50 mL y se hicieron pasar a través de un cartucho Oasis hidrofílico lipofílico (6 g, 35 cm³ HLB, Waters), que fue previamente acondicionado con 60 mL de MeCN (disolvente B) y 60 mL de H₂O (disolvente A). Se eluyó con 30 mL con las siguientes mezclas de H₂O y MeCN: 1:0, 7:3, 1:1, 3:7 y 0:1. La fracción eluída con la mezcla 1:1, denominada RV22WTF3 (para la cepa salvaje) y RV22 Δ vabFF3 (para el mutante que no produce vancrobactina), se analizó por HPLC-HRMS empleando una columna Atlantis dC18 (100 X 4.6 mm, 5 μ m) con un gradiente H₂O-MeCN de 35 min desde 10 hasta 100 % MeCN, luego 5 min a 100 % de MeCN, y finalmente 10 min desde 100 a 10 % H₂O-MeCN, a un flujo de 1 mL/min.

5. Conclusiones

La estructura de cereustin A se determinó por espectrometría de masas y experimentos de RMN mono y bidimensionales. La estereoquímica absoluta de cereustin A se determinó como *ciclo*-(L-Phe-*trans*-L- γ Hyp-L-Leu-*trans*-L- γ Hyp) mediante el método de Marfey. Los resultados de este estudio dieron lugar a la publicación: "Cyclic tetrapeptide from a *Bacillus cereus* strain isolated from the soft coral *Antillogorgia elisabethae* (syn. *Pseudopterogorgia elisabethae*)" Pinzón, A., Martínez-Matamoros, D., Castellanos, L., Duque, C., Jiménez, C., Rodríguez, J., and Ramos, F.A.. *Tetrahedron*, 2017, 58, 634-637.

En el sobrenadante del cultivo deficiente de hierro de *Vibrio anguillarum* RV22 tratado con GaBr₃, se detectó e identificó el complejo de piscibactina-Ga(III) y vancrobactina. De la misma manera se estudió el sobrenadante del cultivo de *V. anguillarum* Δ vabF detectando e identificando únicamente piscibactina, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados de este estudio dieron lugar a la publicación: "The siderophore piscibactin is a relevant virulence factor for *Vibrio anguillarum* favoured at low temperatures" Balado, M., Lages, M.A., Fuentes-Monteverde, J.C., Martínez-Matamoros, D., Rodríguez, J., Jiménez, C., Lemos, M.L. *Front. Microbiol.* 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01766

Bibliografía

- (1) Gomez de Berrazueta, J. M.; De Barrezueta, J. R. *Rev. Med* **2007**, *15*, 218–224.
- (2) Melody M. Bomgardiner. *Chem. Eng. News* **2017**, *95*, 1–18.
- (3) Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. “*La Acuicultura en España 2016*”; 2016.
- (4) Kennedy, D. A.; Kurath, G.; Brito, I. L.; Purcell, M. K.; Read, A. F.; Winton, J. R.; Wargo, A. R. *Evol. Appl.* **2016**, *9*, 344–354.
- (5) Toranzo, A. E.; Magariños, B.; Romalde, J. L. *Aquaculture* **2005**, *246*, 37–61.
- (6) Frans, I.; Michiels, C. W.; Bossier, P.; Willems, K. A.; Lievens, B.; Rediers, H. J. *Fish Dis.* **2011**, *34*, 643–661.
- (7) Johansen, L. H.; Jensen, I.; Mikkelsen, H.; Bjørn, P. A.; Jansen, P. A.; Bergh, O. *Aquaculture* **2011**, *315*, 167–186.
- (8) Toranzo, A. E.; Barja, J. L. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **1992**, *12*, 147–149.
- (9) Snieszko, S. F.; Bullock, G. L.; Hollis, E.; Boone, J. G. *J. Bacteriol.* **1964**, *88*, 1814–1815.
- (10) Magarinos, B.; Couso, N.; Noya, M.; Merino, P.; Toranzo, A. E. *Aquaculture* **2001**, 17–21.
- (11) Magariños, B.; Toranzo, A. E.; Romalde, J. L. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1996**, *6*, 41–64.
- (12) Toranzo, A. E.; Barreiro, S.; Casal, J. F.; Figueras, A.; Magariños, B.; Barja, J. L. *Aquaculture* **1991**, *99*, 1–15.
- (13) Liu, P.; Hung, S.; Chen, M.; Cheng, C.; Chang, C.; Lin, S.; Tu, C.; Lin, Y. J. *Microbiol.* **2011**, *5*, 2107–2113.
- (14) Tobback, E.; Decostere, a; Hermans, K.; Haesebrouck, F.; Chiers, K. *J. Fish Dis.* **2007**, *30*, 257–268.
- (15) Zheng, T.; Nolan, E. M. *Metallomics* **2012**, *4*, 866–880.
- (16) Braun, V.; Hantke, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 328–334.
- (17) Kobayashi, T.; Nishizawa, N. K. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2012**, *63*, 131–152.
- (18) Goswami, D.; Machini, M. T.; Silvestre, D. M.; Nomura, C. S.; Esposito, B. P. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 2067–2080.
- (19) Gkouvatzos, K.; Papanikolaou, G.; Pantopoulos, K. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 188–202.
- (20) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3584–3588.
- (21) Wandersman, C.; Delepelaire, P. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 611–647.
- (22) Bullen, J. J.; Griffiths, E.; Edmiston, C. E. *Shock* **1999**, *12*.

- (23) Williams, P. H. *Infect. Immun.* **1979**, *26*, 925–932.
- (24) Crosa, J. H.; Walsh, C. T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.
- (25) Miethke, M.; Marahiel, M. A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 413–451.
- (26) O'Brien, I. G.; Gibson, F. *BBA - Gen. Subj.* **1970**, *215*, 393–402.
- (27) O'Brien, I. G.; Cox, G. B.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1971**, *237*, 537–549.
- (28) Hider, R. C.; Kong, X. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- (29) Górska, A.; Sloderbach, A.; Marszałł, M. P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 1–8.
- (30) Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. *Metallomics* **2014**, *6*, 408–420.
- (31) Peuckert, F.; Ramos-Vega, A. L.; Miethke, M.; Schwörer, C. J.; Albrecht, A. G.; Oberthür, M.; Marahiel, M. A. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 907–919.
- (32) Peuckert, F.; Miethke, M.; Albrecht, A. G.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 7924–7927.
- (33) Miethke, M.; Klotz, O.; Linne, U.; May, J. J.; Beckering, C. L.; Marahiel, M. A. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 1413–1427.
- (34) Ollinger, J.; Song, K.; Antelmann, H.; Hecker, M.; Helmann, J. D. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3664–3673.
- (35) Raines, D. J.; Sanderson, T. J.; Wilde, E. J.; Duhme-Klair, A.-K. *Siderophores*; 2015.
- (36) Sauter, A.; Braun, V. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5303–5310.
- (37) Ferguson, A. D.; Braun, V.; Fiedler, H. P.; Coulton, J. W.; Diederichs, K.; Welte, W. *Protein Sci* **2000**, *9*, 956–963.
- (38) Chimento, D. P.; Mohanty, A. K.; Kadner, R. J.; Wiener, M. C. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 394–401.
- (39) Chu, B. C. H.; Peacock, R. S.; Vogel, H. J. *BioMetals* **2007**, *20*, 467.
- (40) Krewulak, K. D.; Vogel, H. J. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, *1778*, 1781–1804.
- (41) Raines, D. J.; Moroz, O. V.; Wilson, K. S.; Duhme-Klair, A.-K. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 4595–4598.
- (42) Hollenstein, K.; Frei, D. C.; Locher, K. P. *Nature* **2007**, *446*, 213.
- (43) Gerber, S.; Comellas-Bigler, M.; Goetz, B. A.; Locher, K. P. *Science (80-.)*. **2008**, *321*, 246 LP-250.
- (44) Knappskog, D.; Koumans, J.; Kvitvang, I.; Fiskum, A. M.; Wiulsrød, R. In *Fish Vaccination*; 2014; pp 116–127.
- (45) Hassan, A.; Naz, A.; Obaid, A.; Paracha, R. Z.; Naz, K.; Awan, F. M.; Muhammad, S. A.; Janjua, H. A.; Ahmad, J.; Ali, A. *BMC Genomics* **2016**, *17*.
- (46) Kaneshige, T.; Yaguchi, K.; Ohgitani, T. *Avian Dis.* **2009**, *53*, 563–567.

BIBLIOGRAFÍA

- (47) Mike, L. A.; Smith, S. N.; Sumner, C. A.; Eaton, K. A.; Mobley, H. L. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 13468–13473.
- (48) Hu, Y. H.; Dang, W.; Sun, L. *Arch. Microbiol.* **2012**, *194*, 795–802.
- (49) Brumbaugh, A. R.; Smith, S. N.; Subashchandrabose, S.; Himpfl, S. D.; Hazen, T. H.; Rasko, D. A.; Mobley, H. L. T. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 1443–1450.
- (50) Liu, X.; Jiao, C.; Ma, Y.; Wang, Q.; Zhang, Y. *Vaccine* **2018**, *36*, 1460–1466.
- (51) Valderrama Pereira, A. K. Estudio de los sideróforos y de las proteínas receptoras producidas por las bacterias patógenas de peces: *Photobacterium damsela* subsp. piscicida y *Aeromonas salmonicida*. Tesis Doctoral, 2016.
- (52) Lemos, M. L.; Balado, M.; Jiménez, C.; Rodríguez, J.; Vila, A.; Valderrama, A. K. Proteína recombinante del receptor de la ferri-piscibactina y aplicación para la producción de una composición inmungénica frente a la pasteurelosis. Patente WO 2017/009511 A1, 2016.
- (53) Toranzo, A. E.; Santos, Y.; Barja, J. L. *Dev. Biol. Stand.* **1997**, *90*, 93–105.
- (54) Balado, M.; Osorio, C. R.; Lemos, M. L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2775–2783.
- (55) Di Lorenzo, M.; Stork, M.; Tolmasky, M. E.; Actis, L. A.; Farrell, D.; Welch, T. J.; Crosa, L. M.; Wertheimer, A. M.; Chen, Q.; Salinas, P.; Waldbeser, L.; Crosa, J. H. *J Bacteriol* **2003**, *185*, 5822–5830.
- (56) Lemos, M. L. S. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 1920–1925.
- (57) Balado, M.; Souto, A.; Vences, A.; Careaga, V. P.; Valderrama, K.; Segade, Y.; Rodríguez, J.; Osorio, C. R.; Jiménez, C.; Lemos, M. L. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2850–2860.
- (58) Dallaire-Dufresne, S.; Tanaka, K. H.; Trudel, M. V.; Lafaille, A.; Charette, S. J. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 1–7.
- (59) Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal. 2018,.
- (60) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 1–17.
- (61) Brillet, K.; Meksem, A.; Thompson, A.; Cobessi, D. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2009**, *65*, 402–405.
- (62) Merino, S.; Aguilar, A.; Rubires, X.; Simon-Pujol, D.; Congregado, F.; Tomás, J. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *142*, 185–189.
- (63) Norman, C. S. *Irish J Med Sci* **1964**, *457*, 13–18.
- (64) Moeschlin, S.; Schnider, U. *N. Engl. J. Med.* **1963**, *269*, 57–66.
- (65) Daar, S.; Pathare, A. V. *Ann. Hematol.* **2006**, *85*, 315–319.
- (66) Nam, J. H.; Bae, W.; Lee, D. H. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 1109–1113.
- (67) Ghosh, A.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7652–7659.
- (68) Miller, M. J.; Walz, A. J.; Zhu, H.; Wu, C.; Moraski, G.; Möllmann, U.; Tristani, E.

- M.; Crumbliss, A. L.; Ferdig, M. T.; Checkley, L.; Edwards, R. L.; Boshoff, H. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2076–2079.
- (69) Möllmann, U.; Heinisch, L.; Bauernfeind, A.; Köhler, T.; Ankel-Fuchs, D. *BioMetals* **2009**, *22*, 615–624.
- (70) Souto, A.; Montaos, M. a.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 295–302.
- (71) Choi, J. J.; McCarthy, M. W. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 193–197.
- (72) Tripathi, A.; Schofield, M. M.; Chlipala, G. E.; Schultz, P. J.; Yim, I.; Newmister, S. A.; Nusca, T. D.; Scaglione, J. B.; Hanna, P. C.; Tamayo-Castillo, G.; Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1579–1586.
- (73) Wilson, B. R.; Bogdan, A. R.; Miyazawa, M.; Hashimoto, K.; Tsuji, Y. *Trends Mol. Med.* **2016**, *22*, 1077–1090.
- (74) Sassone-Corsi, M.; Chairatana, P.; Zheng, T.; Perez-Lopez, A.; Edwards, R. A.; George, M. D.; Nolan, E. M.; Raffatellu, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 13462–13467.
- (75) Ranmadugala, D.; Ebrahiminezhad, A.; Manley-Harris, M.; Ghasemi, Y.; Berenjian, A. *Biotechnol. Lett.* **2017**, 1–12.
- (76) Bergeron, R. J.; Bharti, N.; Singh, S.; McManis, J. S.; Wiegand, J.; Green, L. G. *J Med Chem* **2009**, *52*, 3801–3813.
- (77) Petrik, M.; Franssen, G. M.; Haas, H.; Laverman, P.; Hörtnagl, C.; Schrettl, M.; Helbok, A.; Lass-Flörl, C.; Decristoforo, C. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 1175–1183.
- (78) Rouffet, M.; Cohen, S. M. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 3445.
- (79) McGill, K. A.; Busse, W. W. *Lancet* **1996**, *348*, 519–524.
- (80) Marks, P. A.; Breslow, R. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 84.
- (81) Emri, T.; Tóth, V.; Nagy, C. T.; Nagy, G.; Pócsi, I.; Gyémánt, G.; Antal, K.; Balla, J.; Balla, G.; Román, G.; Kovács, I.; Pócsi, I. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 2221–2228.
- (82) Pócsi, I.; Jeney, V.; Kertai, P.; Pócsi, I.; Emri, T.; Gyémánt, G.; Fésüs, L.; Balla, J.; Balla, G. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 1434–1447.
- (83) Rout, M. E.; Chrzanowski, T. H.; Westlie, T. K.; DeLuca, T. H.; Callaway, R. M.; Holben, W. E. *Am. J. Bot.* **2013**, *100*, 1726–1737.
- (84) Tani, A.; Akita, M.; Murase, H.; Kimbara, K. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 32–39.
- (85) Konings, A. F.; Martin, L. W.; Sharples, K. J.; Roddam, L. F.; Latham, R.; Reid, D. W.; Lamont, I. L. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 2697–2704.
- (86) Lee, J.; Attila, C.; Cirillo, S. L. G.; Cirillo, J. D.; Wood, T. K. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 75–90.
- (87) Cornelis, P.; Matthijs, S.; Van Oeffelen, L. *BioMetals* **2009**, *22*, 15–22.
- (88) Nagata, T.; Oobo, T.; Aozasa, O. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *115*, 686–690.

BIBLIOGRAFÍA

- (89) de Serrano, L. O. *Biomol. Concepts* **2017**, *8*, 169–178.
- (90) Todokoro, T.; Fukuda, K.; Matsumura, K.; Irie, M.; Hata, Y. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 2998–3006.
- (91) Gao, B.; Lu, J.; Hao, H.; Yin, S.; Yu, X.; Wang, Q.; Sun, K. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–6.
- (92) Bačeva, K.; Stafilov, T.; Matevski, V. *Int. J. Phytoremediation* **2014**, *16*, 347–365.
- (93) Gbadebo, A. M.; Ekwue, Y. A. *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186*, 165–174.
- (94) Farkas, G.; Gazsó, L. G.; Diósi, G. *J. Environ. Radioact.* **2002**, *61*, 233–239.
- (95) Gadd, G. M. *Endeavour* **1996**, *20*, 150–155.
- (96) Lin, S. Y.; Hameed, A.; Liu, Y. C.; Hsu, Y. H.; Lai, W. A.; Chen, W. M.; Shen, F. T.; Young, C. C. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 2410–2417.
- (97) Zhu, J.; Zhang, J.; Li, Q.; Han, T.; Xie, J.; Hu, Y.; Chai, L. *Mar. Pollut. Bull.* **2013**, *70*, 134–139.
- (98) De Souza, M. J.; Loka Bharathi, P. A.; Nair, S.; Chandramohan, D. *BioMetals* **2007**, *20*, 821–828.
- (99) Nair, A.; Juwarkar, A. A.; Singh, S. K. *Water. Air. Soil Pollut.* **2007**, *180*, 199–212.
- (100) Braud, A.; Geoffroy, V.; Hoegy, F.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 419–425.
- (101) Edberg, F.; Kalinowski, B. E.; Holmström, S. J. M.; Holm, K. *Geobiology* **2010**, *8*, 278–292.
- (102) Wolff-Boenisch, D.; Traina, S. J. *Chem. Geol.* **2007**, *242*, 278–287.
- (103) Chuang, C. Y.; Santschi, P. H.; Ho, Y. F.; Conte, M. H.; Guo, L.; Schumann, D.; Ayrarov, M.; Li, Y. H. *Mar. Chem.* **2013**, *157*, 131–143.
- (104) Barbeau, K.; Zhang, G.; Live, D. H.; Butler, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 378–379.
- (105) Bohara, R. A.; Thorat, N. D.; Pawar, S. H. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 43989–44012.
- (106) McNamara, K.; Tofail, S. A. M. *Adv. Phys. X* **2017**, *2*, 54–88.
- (107) Nguyen, D. T.; Kim, K.-S. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, *31*, 1289–1305.
- (108) Bohara, R. A.; Thorat, N. D.; Chaurasia, A. K.; Pawar, S. H. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 47225–47234.
- (109) Parsons, D. F.; Walsh, R. B.; Craig, V. S. J. *J. Chem. Phys.* **2014**, *140*, 164701.
- (110) Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G. *Theory of the stability of lyophobic colloids*; Courier Corporation, 1999.
- (111) Schwertmann, U.; Cornell, R. M. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007.

- (112) Napper, D. H. *J. Colloid Interface Sci.* **1970**, *32*, 106–114.
- (113) Fritz, G.; Schdler, V.; Willenbacher, N.; Wagner, N. J. *Langmuir* **2002**, *18*, 6381–6390.
- (114) Ortega-Vinuesa, J. L.; Martín-Rodríguez, a; Hidalgo-Ávarez, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184*, 259–267.
- (115) Kobayashi, M.; Skarba, M.; Galletto, P.; Cakara, D.; Borkovec, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *292*, 139–147.
- (116) Chandra, S.; Barick, K. C.; Bahadur, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 1267–1281.
- (117) Chen, J.; Guo, Z.; Wang, H. B.; Gong, M.; Kong, X. K.; Xia, P.; Chen, Q. W. *Biomaterials* **2013**, *34*, 571–581.
- (118) Chen, Y.; Yin, Q.; Ji, X.; Zhang, S.; Chen, H.; Zheng, Y.; Sun, Y.; Qu, H.; Wang, Z.; Li, Y.; Wang, X.; Zhang, K.; Zhang, L.; Shi, J. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7126–7137.
- (119) Li, Y. S.; Church, J. S.; Woodhead, A. L.; Moussa, F. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2010**, *76*, 484–489.
- (120) Nikam, D. S.; Jadhav, S. V.; Khot, V. M.; Bohara, R. A.; Hong, C. K.; Mali, S. S.; Pawar, S. H. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 2338–2345.
- (121) Bychkova, A. V.; Sorokina, O. N.; Rosenfeld, M. A.; Kovarski, A. L. *Russ. Chem. Rev.* **2012**, *81*, 1026–1050.
- (122) Na, H. Bin; Lee, I. S.; Seo, H.; Park, Y. Il; Lee, J. H.; Kim, S.-W.; Hyeon, T. *Chem. Commun.* **2007**, No. 48, 5167.
- (123) Cheng, K.; Peng, S.; Xu, C.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10637–10644.
- (124) McNeil, S. E. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2009**, *1*, 264–271.
- (125) Xu, H.; Monson, E. E.; Yan, F.; Kopelman, R. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *66*, 870–879.
- (126) Thanh, N. T. K.; Green, L. A. W. *Nano Today* **2010**, *5*, 213–230.
- (127) Chu, X.; Yu, J.; Hou, Y. L. *Chinese Phys. B* **2015**, *24*.
- (128) Sahoo, Y.; Goodarzi, A.; Swihart, M. T.; Ohulchanskyy, T. Y.; Kaur, N.; Furlani, E. P.; Prasad, P. N. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3879–3885.
- (129) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, a; Robic, C.; Elst, L. V; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (130) Portet, D.; Denizot, B.; Rump, E.; Hindre, F.; Le Jeune, J. J.; Jallet, P. *Drug Dev. Res.* **2001**, *54*, 173–181.
- (131) Czakler, M.; Artner, C.; Schubert, U. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, No. 12, 2038–2045.
- (132) Yee, C.; Kataby, G.; Ulman, A.; Prozorov, T.; White, H.; King, A.; Rafailovich, M.;

BIBLIOGRAFÍA

- Sokolov, J.; Gedanken, A. *Langmuir* **1999**, *15*, 7111–7115.
- (133) Roberts, D.; Zhu, W. L.; Frommen, C. M.; Rosenzweig, Z. *J. Appl. Phys.* **2000**, *87*, 6208–6210.
- (134) Günay, M.; Baykal, A.; Sözeri, H. *J. Supercond. Nov. Magn.* **2012**, *25*, 2415–2420.
- (135) Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 703–717.
- (136) Lai, Y.; Yin, W.; Liu, J.; Xi, R.; Zhan, J. *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 302–307.
- (137) Xie, J.; Chen, K.; Lee, H.; Xu, C.; Hsu, A. R.; Peng, S.; Chen, X.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7542–7543.
- (138) Valois, C. R. A.; Braz, J. M.; Nunes, E. S.; Vinolo, M. A. R.; Lima, E. C. D.; Curi, R.; Kuebler, W. M.; Azevedo, R. B. *Biomaterials* **2010**, *31*, 366–374.
- (139) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 397–415.
- (140) Thorat, N. D.; Patil, R. M.; Khot, V. M.; Salunkhe, A. B.; Prasad, A. I.; Barick, K. C.; Ningthoujam, R. S.; Pawar, S. H. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 2733.
- (141) Erathodiyil, N.; Ying, J. Y. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 925–935.
- (142) Im, S. H.; Herricks, T.; Lee, Y. T.; Xia, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *401*, 19–23.
- (143) Wang, L.; Luo, J.; Fan, Q.; Suzuki, M.; Suzuki, I. S.; Engelhard, M. H.; Lin, Y.; Kim, N.; Wang, J. Q.; Zhong, C. J. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21593–21601.
- (144) Gong, P.; Li, H.; He, X.; Wang, K.; Hu, J.; Tan, W.; Zhang, S.; Yang, X. *Nanotechnology* **2007**, *18*.
- (145) Zhu, X.; Zhou, J.; Chen, M.; Shi, M.; Feng, W.; Li, F. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4618–4627.
- (146) Jun, Y.; Choi, J.; Cheon, J. *Chem. Commun.* **2007**, No. 12, 1203–1214.
- (147) Cheon, J.; Park, J.; Choi, J.; Jun, Y.; Kim, S.; Kim, M. G.; Kim, Y.-M. J.; Kim, Y.-M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 3023–3027.
- (148) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904–2074.
- (149) Liu, Y.; Zhang, B.; Yan, B. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 4395–4413.
- (150) Gunn, J.; Wallen, H.; Veiseh, O.; Sun, C.; Fang, C.; Cao, J.; Yee, C.; Zhang, M. *Small* **2008**, *4*, 712–715.
- (151) Sneed, P. K.; Stauffer, P. R.; McDermott, M. W.; Diederich, C. J.; Lamborn, K. R.; Prados, M. D.; Chang, S.; Weaver, K. A.; Spry, L.; Malec, M. K.; Lamb, S. A.; Voss, B.; Davis, R. L.; Wara, W. M.; Larson, D. A.; Phillips, T. L.; Gutin, P. H. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, *40*, 287–295.
- (152) Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 487–497.
- (153) Brazel, C. S. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 644–656.

- (154) Cai, X.; Jia, X.; Gao, W.; Zhang, K.; Ma, M.; Wang, S.; Zheng, Y.; Shi, J.; Chen, H. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 2520–2529.
- (155) Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167.
- (156) Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6274.
- (157) Arruebo, M.; Fernández-pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
- (158) Chertok, B.; Moffat, B. A.; David, A. E.; Yu, F.; Bergemann, C.; Ross, B. D.; Yang, V. C. *Biomaterials* **2008**, *29*, 487–496.
- (159) Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3080–3091.
- (160) Bohara, R. A.; Pawar, S. H. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *176*, 1044–1058.
- (161) Huang, Y. F.; Wang, Y. F.; Yan, X. P. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7908–7913.
- (162) Gu, H.; Ho, P.-L.; WT Tsang, K.; Yu, C.-W.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2003**, *2*, 1966.
- (163) Frey, N. A.; Peng, S.; Cheng, K.; Sun, S. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2532.
- (164) Kuroiwa, T.; Noguchi, Y.; Nakajima, M.; Sato, S.; Mukataka, S.; Ichikawa, S. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 62–69.
- (165) Liberti, P. A.; Rao, C. G.; Terstappen, L. W. M. . *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 301–307.
- (166) Pour Yazdankhah, S.; Helleman, A. L.; Rønningen, K.; Olsen, E. *Vet. Microbiol.* **1998**, *62*, 17–26.
- (167) Kala, M.; Bajaj, K.; Sinha, S. *Anal. Biochem.* **1997**, *254*, 263–266.
- (168) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 1–10.
- (169) Tuan, M. A.; Hai, N. H. *J. Phys. Conf. Ser.* **2009**, *187*, 1–6.
- (170) Lazcka, O.; Campo, F. J. Del; Muñoz, F. X. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1205–1217.
- (171) Mocan, T.; Matea, C. T.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Buzoianu, A. D.; Puia, C.; Iancu, C.; Mocan, L. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15*, 1–14.
- (172) Pan, Y.; Du, X.; Zhao, F.; Xu, B. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2912–2942.
- (173) Doorneweerd, D. D.; Henne, W. A.; Reifengerger, R. G.; Low, P. S. *Langmuir* **2010**, *26*, 15424–15429.
- (174) Kim, Y.; Lyvers, D. P.; Wei, A.; Reifengerger, R. G.; Low, P. S. *Lab Chip* **2012**, *12*, 971–976.
- (175) Inomata, T.; Eguchi, H.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Masuda, H. *Langmuir* **2012**, *28*, 1611–1617.

BIBLIOGRAFÍA

- (176) Inomata, T.; Tanabashi, H.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Masuda, H. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 16043–16048.
- (177) Wu, S.; Zhang, Z.; Wang, X.; Zhang, M.; Peng, J.; Xie, Z.; Pang, D. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 9169–9174.
- (178) Bugdahn, N.; Peuckert, F.; Albrecht, A. G.; Miethke, M.; Marahiel, M. A.; Oberthür, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 10210–10213.
- (179) Pinna, N.; Grancharov, S.; Beato, P.; Bonville, P.; Antonietti, M.; Niederberger, M. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 3044–3049.
- (180) Yañez-Vilar, J.; Sánchez-Andujar, M.; Castro-García, S.; Mira, J.; Rivas, J.; Señaris-Rodríguez, M. A. *Bol. Soc. Esp. Ceram. V.* **2010**, 49, 81–88.
- (181) Chen, J. P.; Yang, P. C.; Ma, Y. H.; Tu, S. J.; Lu, Y. J. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 7, 5137–5149.
- (182) El-Boubbou, K.; Gruden, C.; Huang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13392–13393.
- (183) Shebanova, O. N.; Lazor, P. *J. Solid State Chem.* **2003**, 174, 424–430.
- (184) González, P.; Serra, J.; Liste, S.; Chiussi, S.; León, B.; Pérez-Amor, M.; Inoue, Y.; Nakashima, S.; Mitsuishi, A.; Tabata, S.; Tsuboi, S.; de Faria, D. L. a.; Silva, S. V.; de Oliveira, M. T. *J. Non. Cryst. Solids* **2003**, 320, 92–99.
- (185) Veres, M.; Koós, M.; Tóth, S.; Füle, M.; Pócsik, I.; Tóth, A.; Mohai, M.; Bertóti, I. *Diam. Relat. Mater.* **2005**, 14, 1051–1056.
- (186) You, Y.; Yu, T.; Kasim, J.; Song, H.; Fan, X.; Ni, Z.; Cao, L.; Jiang, H.; Shen, D.; Kuo, J.; Shen, Z. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 103111–103113.
- (187) Cozar, O.; Leopold, N.; Jelic, C.; Chi, V.; David, L.; Mocanu, A.; Tomoaia-Cotiel, M. *J. Mol. Struct.* **2006**, 788, 1–6.
- (188) Teng, X.; Yang, H. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 774–779.
- (189) Hayashi, H.; Seiki, H.; Tsuneda, S.; Hirata, A.; Sasaki, H. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 264, 565–568.
- (190) Boks, N. P.; Busscher, H. J.; Mei, H. C. Van Der; Norde, W. *Langmuir* **2008**, 24, 12990–12994.
- (191) Liana, A. E.; Marquis, C. P.; Gunawan, C.; Gooding, J. J.; Amal, R. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, 151, 47–57.
- (192) Fang, W.; Han, C.; Zhang, H.; Wei, W.; Liu, R.; Shen, Y. *RSC Adv.* **2016**, 6, 67875–67882.
- (193) Zhan, S.; Yang, Y.; Shen, Z.; Shan, J.; Li, Y.; Yang, S.; Zhu, D. *J. Hazard. Mater.* **2014**, 274, 115–123.
- (194) Ji, C.; Miller, P. A.; Miller, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9898–9901.
- (195) Imbert, D.; Thomas, F.; Baret, P.; Serratrice, G.; Gaude, D.; Pierre, J.-L.; Laulhère, J.-P. *New J. Chem.* **2000**, 24, 281–288.
- (196) Juárez-Hernández, R. E.; Miller, P. a.; Miller, M. J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**,

- 3, 799–803.
- (197) Herscheid, J. D.; Hoekstra, a; Vos, C. M. *Eur. J. Nucl. Med.* **1984**, *9*, 508–510.
- (198) Abràmoff, M. D.; Magalhães, P. J.; Ram, S. J. *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–41.
- (199) Stals, P. J. M.; Smulders, M. M. J.; Martín-Rapún, R.; Palmans, A. R. A.; Meijer, E. W. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 2071–2080.
- (200) Debbab, A.; Aly, A. H.; Lin, W. H.; Proksch, P. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 544–563.
- (201) Gerwick, W. H.; Moore, B. S. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 85–98.
- (202) Dobretsov, S.; Dahms, H.-U.; Qian, P.-Y. *Biofouling* **2006**, *22*, 43–54.
- (203) Haygood, M. G.; Schmidt, E. W.; Davidson, S. K.; Faulkner, D. J. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *1*, 33–43.
- (204) Haygood, M. G. *Crit. Rev. Microbiol.* **1993**, *19*, 191–216.
- (205) McFall-Ngai, M. J. *Am. Zool.* **1994**, *34*, 554–561.
- (206) Cavanaugh, C. M. *Am. Zool.* **1994**, *34*, 79–89.
- (207) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 235–294.
- (208) Cuevas, C.; Pérez, M.; Martín, M. J.; Chicharro, J. L.; Fernández-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de la Calle, F.; García, J.; Polanco, C.; Rodríguez, I.; Manzanares, I. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2545–2548.
- (209) Penesyán, A.; Kjelleberg, S.; Egan, S. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 438–459.
- (210) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.
- (211) Salomon, C. E.; Magarvey, N. A.; Sherman, D. H. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 105.
- (212) Bhatnagar, I.; Kim, S.-K. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2673–2701.
- (213) Piel, J. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 338–362.
- (214) Williams, P. G. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 45–52.
- (215) Rohwer, F.; Breitbart, M.; Jara, J.; Azam, F.; Knowlton, N. *Coral Reefs* **2001**, *20*, 85–91.
- (216) Sharp, K. H.; Eam, B.; John Faulkner, D.; Haygood, M. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 622–629.
- (217) Feling, R. H.; Buchanan, G. O.; Mincer, T. J.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; John, D. **2003**, 355–357.
- (218) Gao, C. H.; Tian, X. P.; Qi, S. H.; Luo, X. M.; Wang, P.; Zhang, S. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2010**, *63*, 191–193.
- (219) Zhuravleva, O. I.; Afiyatullo, S. S.; Ermakova, S. P.; Nedashkovskaya, O. I.; Dmitrenok, P. S.; Denisenko, V. A.; Kuznetsova, T. A. *Russ. Chem. Bull.* **2010**, *59*, 2137–2142.

BIBLIOGRAFÍA

- (220) Stierle, A. C.; Cardellina, J. H.; Singleton, F. L. *Experientia* **1988**, *44*, 1021.
- (221) Davidson, S. K.; Allen, S. W.; Lim, G. E.; Anderson, C. M.; Haygood, M. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4531–4537.
- (222) Romano, G.; Costantini, M.; Sansone, C.; Lauritano, C.; Ruocco, N.; Ianora, A. *Mar. Environ. Res.* **2017**, *128*, 58–69.
- (223) Imhoff, J. F.; Labes, A.; Wiese, J. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 468–482.
- (224) Bentley, S.; Chater, K.; Cerdeño-Tárraga, A.-M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. a; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C.-H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O’Neil, S.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. a. *Nature* **2002**, *417*, 141–147.
- (225) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–477.
- (226) Bull, A. T. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 993–1021.
- (227) Rahman, H.; Austin, B.; Mitchell, W. J.; Morris, P. C.; Jamieson, D. J.; Adams, D. R.; Spragg, A. M.; Schweizer, M. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 498–518.
- (228) Paul, V. J.; Ritson-Williams, R. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 662–695.
- (229) Holmstrom, C.; Kjellberg, S.; Steinberg, P. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*; American Society of Microbiology, 2004; pp 405–412.
- (230) Egan, S.; Thomas, T.; Holmström, C.; Kjelleberg, S. *Environ. Microbiol.* **2000**, *2*, 343–347.
- (231) Dusane, D. H.; Matkar, P.; Venugopalan, V. P.; Kumar, A. R.; Zinjarde, S. S. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 974–980.
- (232) Mitova, M. I.; Lang, G.; Wiese, J.; Imhoff, J. F. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 824–827.
- (233) Romero, D.; Traxler, M. F.; López, D.; Kolter, R. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5492–5505.
- (234) Correa, H.; Haltli, B.; Duque, C.; Kerr, R. *Microb. Ecol.* **2013**, *66*, 972–985.
- (235) Ahimou, F.; Jacques, P.; Deleu, M. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 749–754.
- (236) Bhushan, R.; Brückner, H. *Amino Acids* **2004**, *27*, 231–247.
- (237) Ormonde, P.; Horstedt, P.; O’Toole, R.; Milton, D. L. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 2326–2328.
- (238) O’Toole, R.; Milton, D. L.; Wolf-Watz, H. *Mol Microbiol* **1996**, *19*, 625–637.
- (239) Wang, X. H.; Oon, H. L.; Ho, G. W. P.; Wong, W. S. F.; Lim, T. M.; Leung, K. Y. *Microbiology* **1998**, *144*, 2987–3002.
- (240) Croxatto, A.; Lauritz, J.; Chen, C.; Milton, D. L. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 370–382.

- (241) Rodkhum, C.; Hirono, I.; Crosa, J. H.; Aoki, T. *Microb. Pathog.* **2005**, *39*, 109–119.
- (242) Denkin, S. M.; Nelson, D. R. *Appl Env. Microbiol* **2004**, *70*, 4193–4204.
- (243) Li, N.; Rock, J. L.; Nelson, D. R. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2620–2632.
- (244) Mourino, S.; Osorio, C. R.; Lemos, M. L. *J Bacteriol* **2004**, *186*, 6159–6167.
- (245) Lemos, M. L.; Balado, M.; Osorio, C. R. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 19–26.
- (246) Souto, A.; Montaos, M. A.; Rivas, A. J.; Balado, M.; Osorio, C. R.; Rodríguez, J.; Lemos, M. L.; Jiménez, C. *European J. Org. Chem.* **2012**, *29*, 5693–5700.
- (247) Balado, M.; Lages, M. A.; Fuentes-Monteverde, J. C.; Martínez-Matamoros, D.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Lemos, M. L. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1766.

TRABAJOS Y COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS Y PUBLICADAS EN REVISTAS CIENTÍFICAS.

Congresos

- M. Carmen de la Fuente-Seijo, **Diana Martínez-Matamoros**, Jaime Rodríguez and Carlos Jiménez. Synthesis of an Analogue of Piscibactin, A Bacterial Siderophore, Using a Staudinger/Aza Wittig Cyclization. XXVII Reunión Bienal de Química Orgánica. Santiago de Compostela, España. 20-22 de junio de 2018
- Javier Cisneros-Sureda, **Diana Martínez-Matamoros**, Elena Pazos, Socorro Castro-García, Jaime Rodríguez and Carlos Jiménez. Preparation of ferrioxamine-gold nanoparticles conjugates and their evaluation for the detection of pathogenic bacteria. XXVII Reunión Bienal de Química Orgánica. 20-22 de Junio de 2018, Santiago de Compostela, España.
- **Diana Martínez-Matamoros**, Javier Cisneros-Sureda, Jaime Rodríguez, Socorro Castro-Gracia, Miguel Balado, Adriana Matamoros-Veloza, Miller Alonso Camargo-Valero, Manuel Lemos and Carlos Jiménez. Magnetic nanoparticles conjugated with siderophores for rapid detection of pathogenic bacteria. 2nd Biennial Young Researchers Workshop on Biomaterials and Applications (bioMAPP17) 27-28th April 2017, Santiago de Compostela- Spain
- Javier Cisneros-Sureda, **Diana Martínez-Matamoros**, Socorro Castro-Gracia, Jaime Rodríguez and Carlos Jiménez. Magnetic nanoparticles conjugated with vancomycin analogs for rapid detection of pathogenic bacteria. 2nd Biennial Young Researchers Workshop on Biomaterials and Applications (bioMAPP17) 27-28th April 2017, Santiago de Compostela- Spain
- **D. Martínez-Matamoros**, J. Rodríguez, S. Castro-García, M. Balado, A. Matamoros-Veloza, M. A. Camargo-Valero, M.L. Lemos and C. Jiménez. Magnetic nanoparticles conjugated with siderophores for rapid detection of pathogenic bacteria. Fifth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials. 6-10 March 2017, Lisbon, Portugal.
- **D. Martínez-Matamoros**, J. Rodríguez, S. Castro-García, M. Balado, A. Matamoros-Veloza, M. A. Camargo-Valero, M.L. Lemos and C. Jiménez. Desarrollo de nuevas metodologías de detección bacteriana basadas en la utilización de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) conjugadas a sideróforos. XXVI REUNIÓN BIENAL de Química Orgánica. Punta Umbría, Huelva. 14-17 junio 2016.
- Marta A. Lages, Miguel Balado, Diego Rey, Juan C. Fuentes-Monteverde, **Diana Martínez-Matamoros**, Jaime Rodríguez, Carlos Jiménez, Manuel L. Lemos. Contribution of siderophores vancomycin and piscibactin to the virulence of *Vibrio anguillarum*: piscibactin synthesis is favored at low temperatures. The 11th International BioMetals Symposium 2018. Julio 15-19

- Javier Cisneros Sureda, **Diana Martínez-Matamoros**, Socorro Castro-García, Jaime Rodríguez González, Carlos Jiménez González. Aplicación de productos naturales en la detección de patógenos. preparación de conjugados de nanopartículas magnéticas con análogos del sideróforo vancrobactina. XXXVI REUNIÓN BIENAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA. Sitges-España. 25-29 de junio de 2017.
- Carlos A. Bernal, Leonardo Castellanos, Diana Marcela Aragón, **Diana Martínez-Matamoros**, Carlos Jimenez, Yolima Baena, Freddy Alejandro Ramos. Peruvioses a-f, sucrose esters from the exudate of *Physalis peruviana* fruits as α -amylase inhibitors. XXXVI REUNIÓN BIENAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA. Sitges-España. 25-29 de junio de 2017.
- Angela Pinzón, **Diana Martinez-Matamoros**, Leonardo Castellanos, Carmenza Duque, Carlos Jiménez, Jaime Rodríguez, and Freddy A. Ramos. A new tetrapeptide from bacillus cereus strain isolated from the soft coral *Antillologorgia elisabethae* (syn. *Pseudopterogorgia elisabethae*). XXXV Biennial Meeting of the Spanish Royal Society of Chemistry, A Coruña (Spain), Jul 19-23, 2015

Publicaciones

- Balado, M.; Lages, M. A.; Fuentes-Monteverde, J. C.; **Martínez-Matamoros, D.**; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Lemos, M. L. The Siderophore Piscibactin Is a Relevant Virulence Factor for *Vibrio anguillarum* Favored at Low Temperatures. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 1766.
- Carlos-A. Bernal, Leonardo Castellanos, Diana M. Aragón, **Diana Martínez-Matamoros**, Carlos Jiménez, Yolima Baena, Freddy A. Ramos. Peruvioses A to F, sucrose esters from the exudate of *Physalis peruviana* fruit as α -amylase inhibitors. *Carbohydrate Research*. 461 (2018) 4-10.
- Angela Pinzón, **Diana Martinez-Matamoros**, Leonardo Castellanos, Carmenza Duque, Carlos Jiménez, Jaime Rodríguez, and Freddy A. Ramos. **Cyclic tetrapeptide from a *Bacillus cereus* strain isolated from the soft coral *Antillologorgia elisabethae* (syn. *Pseudopterogorgia elisabethae*)**. *Tetrahedron*, 2017, 58, 634-637.

Anexos

- **Secuencia de aminoácidos de FvtA en *Vibrio anguillarum* RV22 (código de identificación de la proteína = CAL44983.1, NCBI), en rojo se resalta la secuencia señal.**

MKPMDMNNGSGKAVERNINKTQLATLIGILCVSTSANVVAEQLEKKEPQRKQDTVVVVGEKLGTTLAENTS
SLTLFTDEVDDGESRDYDYLDRVNVNLNAPSGIPHIRGVDGRGPGEGLTFMTGATPRVNTTVDGVSES
WSGEAFGKAGLWDTEQVEVYKGPQSTNQGRNSIAGAVVIKTKDPTFHREGKVRAGYENEDSKYHLAGVVS
APLVEDTLAFRLAAEGTKGNTPIDYSLPNGDQYPWDPSELESYNVRGKLLWKPOGNDKLTAKLTVGSRNE
EGQYTNFVTKPGTLELHLSKSGTRRQETKSWNINLVDVNYVINDELTTDILVAHRNYTTKFKAYPDTNWyGD
VDEDNYTAEAKLTYQSLDEKYNAILGLAGFFKDQYETDSLKRKDEVLTNSIYFDSRIRLDNRWQLLLGA
RYERDELKRDFDHATLPLDFKADEDDGILLPKIGLLLDVSDHSTLGLTARKGYNAGGLSYNEYKEEVFVF
EREKVVSYELSSRSSFLDDKLDLTANLFYNDYKNYQTSVSGDSGKRFDYITNIPKPKTYGTEVEASYWF
DSGLDLFAVYGLLTKTDISEGPTGTSTNLSGNEFSYAPKLSAGAGFTQHLDSGLFFGARVNHVSDYYTDLA
NTESKTAGDDTVLNLNAGYTLNDMTIRAYVKNVTDEEYVIRQKSDLYEVGGPRTFGIVADYQF

- **Secuencia de nucleótidos el gen que codifica para FvtA en *Vibrio anguillarum* RV22 (Accession number AM168450, NCBI), en rojo se resalta la secuencia señal.**

ATGAAGCCCATGGATATGAATAACGGTAGTGGTAAAGCAGTCAGAAATATCAATAAGACTCAACTCGCCA
CACTGATTGGCATCCTCTGCGTGAGTACTAGCGCAAATGTTGTGCGCGGAAACAGCTCGAAAAAAGAGCC
GCAGAGAAAGCAGGATACTGTGGTTGTGGTGGGTGAGAAATTGGGAGGAACACTGGCCGAAAACACCAGT
TCGCTCACCCATTACCCGATGAAGTGGATGATGGTGAAGCCGAGATTACTACGATCTGCTCGACCGCG
TACCCAACGTACTCAATGCACCTTCGGGCATTCCACACATTCGTGGGGTCGATGGACGTGGCCCTGGCGA
AGGTTTTCTAACCTTCATGACAGGCGCAACACCTCGTGTCAATACCACGGTAGACGGCGTGTCTGAATCT
TGGTCTGGAGAAGCGTTTTGGTAAAGCTGGACTGTGGGATACAGAACAAGTGAAGTCTATAAAGGGCCGC
AATCCACCAACCAAGGCCGAAATAGTATTGCCGGTGCGGTTGTGATCAAAACTAAGGATCCAACGTTCCA
CCGTGAGGGTAAAGTTCGCGCTGGTTATGAAAATGAAGACAGTAAATATCATCTCGCAGGGGTCGTGTCTG
GCACCTCTGGTTGAAGATACTTTAGCGTTTCGTCTTGCCGCCGAAGGTACCAAAGGCAATACCCCTATCG
ATTACTCTCTGCCTAACGGCGATCAGTACCCTTGGGATCCTTCCGAGCTCGAATCCTATAATGTCCGTGG
TAAATTATTGTGAAACCCCAAGGAAATGACAAGCTAACAGCCAAGCTAACGGTTGGTAGCCGTAATGAA
GAGGGGCAATATACCAACTTCGTTACCAAGCCGGGCACACTTGAACGCATAGCAAAGTGGCAGCGCTC
GCCAAGAAACCAAAAGCTGGAATATCAACCTAGACGTCAATTATGTGATTAATGATGAACGACAACGGA
TATTTTAGTCGCCCATCGTAACTACACCACCAAGTTCAAAGCTTATCCTGATACTAATTGGTATGGTGAT
GTGGATGAAGATAACTACACCGCAGAAAGCAAAGCTTACATATCAATCACTTGATGAAAAGTACAATGCGA
TTCTAGGCCTAGCCGGCTTCTTCAAAGATCAATACACCGAAAACAGATTCA'TAAAACGTAAGATGAAGT
TTTAAACCAACTCAATCTACTTTGACTCAAGAAATTCGTTTGGATAATCGCTGGCAGCTATTATTAGGTGCA
CGTTATGAAAAGAGATGAACTGAAGCGAGATTTGATCAGCTACCCCTACCCTCGATTTTTAAAGCCGATG
AAGATGACGGCATCCTATTGCCTAAGATTGGTCTATTACTTGATGTCTCAGATCACTCCACCCTCGGTCT
TACGGCCCGTAAAGGCTACAATGCCGGTGGATTAAGCTATAACGAGTACAAAGAAGAAGTTTTTTGTTTTT
GAACGAGAAAAAGTCTGGAGCTACGAGCTAAGTTCTCGTTCAAGCTTCCGGATGACAAGCTGGATCTGA
CCGCTAACCTGTTCTACAACGACTACAAAAATTATCAAACCTTCGGTCTCAGGTGACAGCGGAAAACGCTT
CGACACCTATATACCAATATACCGAAAAGGAAAACTTACGGTACGGAAGTTGAAGCCTCTTACTGGTTT
GATTCTGGGCTCGACCTGTTTGCATATGTCGGTCTTCTTAAAACGGACATCAGCGAAGGACCAACAGGTA
CCTCTACCAATCTCTCAGGCAATGAGTTCAAGTTACGCTCCTAAACTGTCTGCAGGTGCGGGCTTTACTCA
ACACTTAGATTCCGGTCTATTTTTTGGTGTCTCGTGTAAACCACGTCTCCGATTACTATACCGATTTAGCC
AACACAGAGAGTAAAACGGCTGGCGATGACACCGTGTGAATCTGAATGCAGGTTATACTCTCAACGATA
TGACTATTTCGCGCTTACGTGAAAAACGTAAGTGAAGAGTACGTGATTGCCAGAAAAGTGATCTCTA
CGAAGTCGGCGGTCCACGCACCTTTGGCATAGTCGCTGATTACCAGTTCTAG

- **Secuencia de aminoácidos de FstC en *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* (código de identificación de la proteína = AAS13461.1, NCBI), en rojo se resalta la secuencia señal.**

MQLQPGVFRINPILLSLGLFALPGLAQAELPKANETMVVTATQTKHTELSAPASVSVVTRADLDMNANN
 IGDALKHVPVNIIGTNPTGRSEIKIRGMGGDYTLILLINGKRVNARETLGSSFGNDFLSSIPMAAIERI
 EVIRGPVSSLYGADALGGVVNVILRQAKEKTEAAFYTHSMPTKGDGGDANQGSFVSGALIDNKLLGSV
 VVEGYQRDRWHSDDQSNLLDADALEKREVVNVLSLKWLVSDNQDIDFDLGYNQNDMSYFNNVPRAPTAP
 ATPHNQVQLDRLSLGLTHNGRWEHFDSRARYYFEQTDLMDDSQLNGGAADVQTNTHTVDGQLSGYLG NHL
 LTSGAEMRKTELEHSRSITNGSVDASQSALYLQDEFSLGDLALTLSGRLDHHETYGNEFSPRAYALYKLT
 DEWVIKGGAGKAFKAPTLAQSSEGFATTACRGACKVVGPNLKPETAVSYELGTAYESERFAGVTFHFN
 DIEDLIQSDQWGPYRPTVMTYLNVKKARVKGLELTGWVDVLDNVKLTGNWSLLDSQDKSTGDDLTKTPD
 HTGNLSLDWQATEIVSTNLAWQYVGSQFIKVPMHNSQALKSKHYQTLDLNTNWKVTPALDFKLGITNLTN
 TQRDQVATDADFILEGRTVYAGVNYKL

- **Secuencia de nucleótidos el gen que codifica para FstC en *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* (Accession number AY505565, NCBI), en rojo se resalta la secuencia señal.**

ACGGCTTTGCAGGGCTTGCCTGGATCAATATTACCTGCAGCCTGCTGGCCTGTGGTGGCGTCTGGCTCCT
 GCTCAAGGGGCTGGCGCAGACAAGGAATAACAATAACCCACGTCTGGTACGGCCAGACAGGGAAGTCAG
 TGAGCCACCGCCCCAGAGCCGACCCATAACCTCTGTTTTATTTCATGGAGTTTTGACTATGCAGTTGC
 AGCCTGGCGTATTTTCGCTTGAACCGATTTTGCCTTCCCTCGGTCTGTTTGCCTGCCGGGCTGGCCCA
 GGCCGAGTTGCCAAAAGCCAACGAGACCATGGTGGTCACCGCCACCCAGACCAAGCACACGGAACGTCC
 GCTCCGGCCAGCGTCTCTGTGGTGACCCGCGCCGATCTGGACAAGATGAACGCCAACAACATAGGCGAGC
 CCTCAAGCATGTGCCGGGTGTCAACATCATAGGCACCAACCCACGGGTGCGCAGCGAGATCAAGATCCGC
 GGTATGGGCGGCGACTACACACTGCTGCTGATCAACGGCAAACGGGTCAACGCCCGCAGACCCCTGGGCA
 GCTCCTTTGGCAATGACTTCGACTTGAGCTCCATCCCCATGGCGGCCATAGAGCGCATCGAAGTGATCCG
 TGGTCCCGTCTCCTCTCTGTACGGTGCCGACGCCCTCGGCGGCGTGGTCAACGTGATCCTGCGCCAGGCC
 AAGGAGAAGACGGAAGCGGCTTCGGCTACACCCACTCCATGCCACCAAGGGCGACGGGGCGGATGCCA
 ACCAGGGCAGCGCTTTGTCTCCGGTGCCTCATCGACAACAAGCTGCTGGGCAGCGTGGTGGTGAAGG
 CTACCAGCGTGACCGCTGGCACAGCGATCAGTCCAACAACCTGGATGCCGATGCGCTGGAAAAACGGGAA
 GTGGTCAATGTGCTCTCCAGCCTGAAGTGGCTGGTCAAGTGAACAACCAGGATATCGATTTTCGATCTGGGCT
 ACAACCAGAACGACATGGACAGCTACTTCAACAACGTGCCCGTGCCCGACCGCACCGGCCACCCCGCA
 CAACGTGCAAAAACTCGATCGTCTGAGCCTGGGGCTGACCCACAACGGCCGTTGGGAGCACTTCGACAGC
 CGCGCCCGCTACTACTTCGAGCAGACGGATCTGATGGATGACTCCCAGCTCAATGGCGGCGCCCGGATG
 TCACCCAGACCAACCACACGGTCGATGGCCAGCTGAGCGGTATCTGGGGAATCACCTGCTGACCTCGGG
 TGCCGAGATGCGCAAGACCGAGCTGGAGCACAGCCGACGATCACCACGGCAGCGTGGATGCCAGCCAG
 AGTGCCCTCTATCTGCAGGACGAATTCAGCCTGGGGGATCTGGCGTTGACCCCTCCCGGCCCTCGACC
 ACCATGAAACCTATGGCAACGAATTCAGCCCGCGCGCCTATGCCCTCTACAAACTGACCGACGAGTGGGT
 GATCAAGGGTGGCGCCGGCAAGGCGTTCAAGGCACCGACCCCTGGCCCAGTCCAGCGAAGGCTTCGCCACC
 ACCGCTTGCCGTGGCGCCTGCAAGGTGGTCCGGCAACCCGAACCTGAAACCGGAAACCGCCGTCAGCTATG
 AGCTGGGCACCGCTACGAGAGTGAGCGTTTCGGCGCCGGTGTGACCGGCTTCCACAACGACATCGAAGA
 TCTGATCCAGAGCGATCAGTGGGGCCCGGGCTACCGTCCGACCGTCATGACCTACCTCAACGTCAAGAAG
 GCACGGGTGAAAGGGCTGGAGCTGACCGGTGGGTCGACGTACTGGACAACGTCAAGCTGACCGGCAACT
 GGAGCCTGCTGGATTCCCAAGACAAGAGCACGGGCGACGATCTGACCAAGACCCCGGACCACACCGGCAA
 CCTCAGCCTGGATTGGCAAGCCACCGAGATCGTCAAGTACCAACCTGGCCTGGCAATACGTGGGCAGCCAG
 TTCATCAAGGTGCCGATGCACAACCTCCAGGCGCTCAAGTCCAAGCACTATCAGACCCCTGGACCTCAACA
 CCAACTGGAAAAGTCACGCCGGCGCTCGACTTCAAACCTCGGCATCACCACCTGACCAACACCCAGCGTGA
 CCAGGTCGCCACCGACGCCGATTTCAATCTGGAAGTTCGCACCGTCTATGCCGGGGTGAATTACAAGCTG
 TAA

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FvtA (rFvtA) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el C-terminal.

pelB- FvtA-C6His

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGG
CCATGGATATGAATAACGGTAGTGGTAAAGCAGTCAGAAATATCAATAAGACTCAACTCGCCAC
ACTGATTGGCATCCTCTGCGTGAGTACTAGCGCAAATGTTGTGCGGAAACAGCTCGAAAAAAA
GAGCCGCAGAGAAAGCAGGATACTGTGGTTGTGGTGGGTGAGAAATTGGGAGGAACACTGGCCG
AAAACACCAGTTCGCTCACCCCTATTCACCCGATGAAGTGGATGATGGTCAAAGCCGAGATTACTA
CGATCTGCTCGACCGCGTACCCAACGTACTCAATGCACCTTCGGGCATTCCACACATTCGTGGG
GTGATGACGCTGGCCCTGGCGAAGGTTTTCTAACCTTCATGACAGGCGCAACACCTCGTGTCA
ATACCACGGTAGACGGCGTGTCTGAATCTTGGTCTGGAGAAGCGTTTGGTAAAGCTGGACTGTG
GGATACAGAACAAGTGAAGTCTATAAAGGGCCGCAATCCACCAACCAAGCCGAAATAGTATT
GCCGGTGGGTTGTGATCAAACTAAGGATCCAACGTTCCACCGTGAGGGTAAAGTTCGCGCTG
GTTATGAAAATGAAGACAGTAAATATCATCTCGCAGGGTTCGTGTGCGCACCTCTGGTTGAAGA
TACTTTAGCGTTTCGTCTTGCCGCCGAAGGTACCAAAGGCAATACCCCTATCGATTACTCTCTG
CCTAACGGCGATCAGTACCCCTGGGATCCTTCCGAGCTCGAATCCTATAATGTCCGTGGTAAAT
TATTGTGAAAACCCCAAGGAAATGACAAGCTAACAGCCAAGCTAACGGTTGGTAGCCGTAATGA
AGAGGGGCAATATACCAACTTCGTTACCAAGCCGGGCACACTTGAAGTGCATAGCAAAAAGTGGC
ACGCGTCGCCAAGAAACAAAAGCTGGAATATCAACCTAGACGTCAATTATGTGATTAATGATG
AACTGACAACGGATATTTTAGTCGCCCATCGTAACTACACCACCAAGTTCAAAGCTTATCCTGA
TACTAATTGGTATGGTATGATGGATGAAGATAACTACACCGCAGAAGCAAAGCTTACATATCAA
TCACTTGATGAAAAGTACAATGCGATTCTAGGCCTAGCCGGCTTCTTCAAAGATCAATACACCG
AAACAGATTCATTAACCGTAAAGATGAAGTTTTAAACCAACTCAATCTACTTTGACTCAAGAAT
TCGTTTGGATAATCGCTGGCAGCTATTATTAGGTGCACGTTATGAAAGAGATGAACTGAAGCGA
GATTCGATCACGCTACCCTACCCTCGATTTTTAAAGCCGATGAAGATGACGGCATCCTATTGC
CTAAGATTGGTCTATTACTTGATGTCTCAGATCACTCCACCCTCGGTCTTACGGCCCGTAAAGG
CTACAATGCCGGTGGATTAGGCTATAACGAGTACAAAGAAGAAGTTTTTGTTTTTTGAACGAGAA
AAAGTCTGGAGCTACGAGCTAAGTTCTCGTTCAAGCTTCCTGGATGACAAGCTGGATCTGACCG
CTAACCTGTTCTACAACGACTACAAAATATCAAACTTCGGTCTCAGGTGACAGCGGAAAACG
CTTCGACACCTATATACCAATATACCGAAAGGGAAAACCTTACGGTACGGAAGTTGAAGCCTCT
TACTGGTTTTGATTCTGGGCTCGACCTGTTTGCCTTGTGCGTCTTCTTAAAACGGACATCAGCG
AAGGACCAACAGGTACCTCTACCAATCTCTCAGGCAATGAGTTCAGTTACGCTCCTAACTGTC
TGCAGGTGCGGGCTTTACTCAACACTTAGATTCGGGTCTATTTTTTGGTGTCTCGTGTAAACCAC
GTTTCCGATTACTATAACCGATTTAGCCAACACAGAGAGTAAAACGGCTGGCGATTACACCGTGT
TGAATCTGAATGCAGGTTATACTCTCAACGATTTGACTATTCGCGCTTACGTGAAAAACGTCAC
TGATGAAGAGTACGTGATTTCGCCAGAAAAGTATCTCTACGAAGTCGGCGGTCCACGCACCTTT
GGCATAGTCGCTGATTACCAGTTCTCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína recombinante FvtA (rFvtA) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el C-terminal.

pelB- FvtA-C6His

MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDMNNGSGKAVRNINKTQLATLIGILCVSTSANVVAEQLEKK
EPQRKQDTVVVVGEKLGGLAENTSSLTFLTFDEVDDGESRDYYDLLDRVNVNLNAPSGIPHIRG
VDGRGPGEGFLTFMTGATPRVNTTVDGVSESWSGEAFGKAGLWDTEQVEVYKGPQSTNQGRNSI
AGAVVIKTKDPTFHREGKVRAGYENEDSKYHLAGVVSAPLVEDTLAFRLAAEGTKGNTPIDYSL
PNGDQYPWDPSELESYNVRGKLLWKPQGNKLTAKLTVGSRNEEGQYTNFVTKPGTLELHSSKSG
TRRQETKSWNINLDVNYVINDELTTDILVAHRNYTTKFKAYPDTNWDVDEDNYTAEAKLTYQ

SLDEKYNAILGLAGFFKDQYETDLSLKRKDEVLTNSIYFDSRIRLDNRWQLLLGARYERDELKR
DFDHATLPLDFKADEDDGILLPKIGLLLDVSDHSTLGLTARKGYNAGGLGYNEYKEEVFVFERE
KVWSYELSSRSSFLDDKLDLTANLFYNDYKNYQTSVSGDSGKRFDYITNIPKGKTYGTEVEAS
YWFDSGLDLFAFVGLLKTDISEGPTGTSTNLSGNEFSYAPKLSAGAGFTQHLD SGLFFGARVNH
VSDYYTDLANTESKTAGDYTVLNLNAGYTLNLDLIRAYVKNVTDEEYVIRQKSDLYEVGGPRTF
GIVADYQFLEHHHHHStop

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FvtA (rFvtA) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el N-terminal.

pelB-N6His-FvtA

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGG
TACACCACCACCACCACCACCAGCTCGAAAAAAAAAGAGCCGCAGAGAAAGCAGGATACTGTGGT
TGTTGGTGGGTGAGAAATTGGGAGGAACACTGGCCGAAAACACCAGTTCGCTCACCCATTTCACC
GATGAAGTGGATGATGGTGAAGCCGAGATTACTACGATCTGCTCGACCCGCTACCCAACGTAC
TCAATGCACCTTCGGGCATTCCACACATTCGTGGGGTCGATGGACGTGGCCCTGGCGAAGGTTT
TCTAACCTTCATGACAGGCGCAACACCTCGTGTCAATACCACGGTAGACGGCGTGTCTGAATCT
TGGTCTGGAGAAGCGTTTGGTAAAGCTGGACTGTGGGATACAGAACAAGTGAAGTCTATAAAG
GGCCGCAATCCACCAACCAAGGCCGAAATAGTATTGCCGGTTCGGTGTGATCAAACTAAGGA
TCCAACGTTCCACCGTGAGGGTAAAGTTCGCGCTGGTTATGAAAATGAAGACAGTAAATATCAT
CTCGCAGGGGTCGTGTCCGCACCTCTGGTTGAAGATACTTTAGCGTTTCGTCTTGCCGCCGAAG
GTACCAAAGGCAATACCCCTATCGATTACTCTCTGCCTAACGGCGATCAGTACCCTTGGGATCC
TTCCGAGCTCGAATCCTATAATGTCCGTGGTAAATTATTGTGGAAACCCCAAGGAAATGACAAG
CTAACAGCCAAGCTAACGGTTGGTAGCCGTAATGAAGAGGGGCAATATACCAACTTCGTTACCA
AGCCGGGCACACTTGAAGTGCATAGCAAAAGTGGCACGCGTCGCCAAGAAACCAAAAGCTGGAA
TATCAACCTAGACGTCAATTATGTGATTAATGATGAACTGACAACGGATATTTTAGTCGCCCAT
CGTAACTACACCACCAAGTTCAAAGCTTATCCTGATACTAATTGGTATGGTGTGATGTGGATGAAG
ATAACTACACCGCAGAAGCAAAGCTTACATATCAATCACTTGATGAAAAGTACAATGCGATTCT
AGGCCTAGCCGGCTTCTTCAAAGATCAATACCCGAAAACAGATTCATTAACCGTAAAGATGAA
GTTTTAAACCAACTCAATCTACTTTGACTCAAGAATTCGTTTGGATAATCGCTGGCAGCTATTAT
TAGGTGCACGTTATGAAAGAGATGAACTGAAGCGAGATTCGATCACGCTACCCTACCACTCGA
TTTTAAAGCCGATGAAGATGACGGCATCCTATTGCCTAAGATTGGTCTATTACTTGATGTCTCA
GATCACTCCACCCTCGGTCTTACGGCCCGTAAAGGCTACAATGCCGGTGGATTAGGCTATAACG
AGTACAAAGAAGAAGTTTTTTGTTTTTGAACGAGAAAAAGTCTGGAGCTACGAGCTAAGTTCTCG
TTCAAGCTTCTGGATGACAAGCTGGATCTGACCGCTAACCTGTTCTACAACGACTACAAAAT
TATCAAACCTTCGGTCTCAGGTGACAGCGGAAAACGCTTCGACACCTATATACCAATATACCGA
AAGGGAACCACTTACGGTACGGAAGTTGAAGCCTCTTACTGGTTTTGATTCTGGGCTCGACCTGTT
TGCGTTTTGTCGGTCTTCTTAAACGGACATCAGCGAAGGACCAACAGGTACCTCTACCAATCTC
TCAGGCAATGAGTTCAGTTACGCTCCTAAACTGTCTGCAGGTGCGGGCTTTACTCAACACTTAG
ATTCGGTCTATTTTTTTGTTGCTCGTGTAAACCACGTTTCCGATTACTATACCGATTTAGCCAA
CACAGAGAGTAAAACGGCTGGCGATTACACCGTGTGAACTCTGAATGCAGGTTATACTCTCAAC
GATTTGACTATTCGCGCTTACGTGAAAAACGTCACTGATGAAGAGTACGTGATTCGCCAGAAAA
GTGATCTCTACGAAGTCGGCGGTCCACGCACCTTTGGCATAGTCGCTGATTACCAGTTCTAG

Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína recombinante FvtA (rFvtA) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el N-terminal.

pelB-N6His-FvtA

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMVHHHHHHQLEKKEPQRKQDTVVVVVGEKLGGTLAENTSSLTFLT
DEVDDGESRDYDLLDRVNVNLNAPSGIPHIRGVDGRGPGEGLTFMTGATPRVNTTVDGVSES
WSGEAFGKAGLWDTEQVEVYKGPQSTNQGRNSIAGAVVIKTKDPTFHREGKVRAGYENEDSKYH
LAGVVSAPLVEDTLAFRLAAEGTKGNTPIDYSLPNGDQYPWDPSELESYNVRGKLLWKPQGNK
LTAKLTVGSRNEEGQYTNFVTKPGTLELHKSQSTRRQETKSWNINLDVNYVINDELTTDILVAH
RNYTTKFKAYPD TNWYGDVDEDNYTAEAKLTYQSLDEKYNAILGLAGFFKDQYTETDSLKRKDE
VLNSIYFDSRIRLDNRWQLLL GARYERDELKRDFDHATLPLDFKADEDDGILLPKIGLLLDVS
DHSTLGLTARKGYNAGGLGYNEYKEEVVFEREKVSYSYELSSRSSFLDDKLDLTANLFYNDYKN
YQTSVSGDSGKRFDTYITNIPKPKTYGTEVEASYWFDSGLDLFAFVGLLKTDI SEGPTGTSTNL
SGNEFSYAPKLSAGAGFTQHLD SGLFFVARVNHVSDYYTDLANTESKTAGDYTVLNLNAGYTLN
DLTIRAYVKNVTDEEYVIRQKSDLYEVGGPRTFGIVADYQF**Stop**

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FstC (rFstC) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el C-terminal.

pelB- FstC-C6His

ATG**AAATACTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGG**
CCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCAATTCATGGAGTTTTGACTATGCAGTTGCAGCCTGG
CGTATTTGCTTGAACCCGATTTTGCTTTCCCTCGGTCTGTTTGCCCTGCCGGGCTGGCCAG
GCCGAGTTGCCCAAAGCCAACGAGACCATGGTGGTCACCGCCACCCAGACCAAGCACACGGAAC
TGTCGGCTCCGGCCAGCGTCTCTGTGGTGACCCGCGCCGATCTGGACAAGATGAACGCCAACAA
CATAGGCATGCCCTCAAGCATGTGCCGGGTGTCAACATCATAGGCACCAACCCACGGGTGCG
AGCGAGATCAAGATCCGCGGTATGGGCGGCGACTACACACTGCTGCTGATCAACGGCAAACGGG
TCAACGCCCCGAGACCCTGGGCAGCTCCTTTGGCAATGACTTCGACTTGAGCTCCATCCCCAT
GGCGGCCATAGAGCGCATCGAAGTGATCCGTGGTCCCGTCTCCTCTCTGTACGGTGCCGACGCC
CTCGGCGGGCTGGTCAACGTGATCCTGCGCCAGGCCAAGGAGAAGACGGAAGCGGCCCTTCGGCT
ACACCCACTCCATGCCACCAAGGGCGACGGGGCGATGCCAACAGGGCAGCGCCTTTGTCTC
CGGTGCCCTCATCGACAACAAGCTGCTGGGCAGCGTGGTGGTGAAGGCTACCAGCGTGACCGC
TGGCACAGCGATCAGTCCAACAACCTGGATGCCGATGCGCTGGAAAAACGGGAAGTGGTCAATG
TGCTCTCCAGCCTGAAGTGGCTGGTCAAGTGAACAACAGGATATCGATTTGATCTGGGCTACAA
CCAGAACGACATGGACAGCTACTTCAACAACGTGCCCGTGCCCCGACCGCACCCGGCCACCCCG
CACAACGTGCAAAAACCTCGATCGTCTGAGCCTGGGGCTGACCCACAACGGCCGTTGGGAGCACT
TCGACAGCCGCGCCGCTACTACTTCGAGCAGACGGATCTGATGGATGACTCCCAGCTCAATGG
CGGCGCCCGGATGTCACCCAGACCAACCACACGGTTCGATGGCCAGCTGAGCGGCTATCTGGGG
AATCACCTGCTGACCTCGGGTGCCGAGATGCGCAAGACCGAGCTGGAGCACAGCCGACGATCA
CCAACGGCAGCGTGGATGCCAGCCAGAGTGCCTCTATCTGCAGGACGAATTCAGCCTGGGGGA
TCTGGCGTTGACCCTCTCCGGCCGCCTCGACCACCATGAAACCTATGGCAACGAATTCAGCCCG
CGCGCCTATGCCCTTACAAACTGACCGACGAGTGGGTGATCAAGGGTGGCGCCGGCAAGGCGT
TCAAGGCACCGACCCTGGCCAGTCCAGCGAAGGCTTCGCCACCACCGCCTGCCGTGGCGCCTG
CAAGGTGGTTCGGCAACCCGAACCTGAAACCGGAAACCGCCGTCAGCTATGAGCTGGGCACCGCC
TACGAGAGTGAGCGTTTCGGCGCCGGTGTGACCGGCTTCCACAACGACATCGAAGATCTGATCC
AGAGCGATCAGTGGGGCCCGGCTACCGTCCGACCGTCATGACCTACCTCAACGTCAAGAAGGC
ACGGGTGAAAGGGCTGGAGCTGACCGGCTGGGTTCGACGTAAGTCAAGCTGACCGGC

AACTGGAGCCTGCTGGATTCCCAAGACAAGAGCACGGGCGACGATCTGACCAAGACCCCGGACC
ACACCGGCAACCTCAGCCTGGATTGGCAAGCCACCGAGATCGTCAGTACCAACCTGGCCTGGCA
ATACGTGGGCAGCCAGTTCATCAAGGTGCCGATGCACAACCTCCAGGCGCTCAAGTCCAAGCAC
TATCAGACCCTGGACCTCAACACCAACTGGAAAGTCACGCCGGCGCTCGACTTCAAACCTCGGCA
TCACCAACCTGACCAACACCCAGCGTGACCAGGTGCCACCGACGCCGATTTTCATTCTGGAAGG
TCGCACCGTCTATGCCGGGGTGAATTACAAGCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína recombinante FstC (rFstC) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el C-terminal.

pelB-FstC-C6His

MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPIHGVLTMQLQPGVFRNLPIILLSLGLFALPGLAQ
AELPKANETMVVTATQTKHELSEAPASVSVVTRADLDKMNANNIGDALKHVPGVNIIGTNPTGR
SEIKIRGMGGDYTLILINGKRVNARETLGSSFGNDFLSSIPMAAIERIEVIRGPVSSLYGADA
LGGVNVILRQAKEKTEAAFYTHSMPTKGDGGDANQGSFAFVSGALIDNKLLGSVVVEGYQRDR
WHSDQSNLADALEKREVVNVLSSLKWLVSNDQDIDFDLGYNQNDMDSYFNNVPRAPTAPATP
HNVQKLDRLSLGLTHNGRWEHFDSRARYYFEQTDLMDDSQLNGGAADVDTQTNHTVDGQLSGYLG
NHLTSGAEMRKTELEHSRSITNGSVDASQSALYLQDEFSLGDLALTLGRLDHHETYGNEFSP
RAYALYKLTDEWVIKGGAGKAFKAPTLAQSSEGFATTACRGACKVVGPNLKPETAVSYELGTA
YESERFGAGVTGFHNDIEDLIQSDQWGPYRPTVMTYLVKARVKGLELTGWVDVLDNVKLTG
NWSLLDSQDKSTGDDLTKTPDHTGNLSLDWQATEIVSTNLAWQYVGSQFIKVPMHNSQALKSKH
YQTLDLNTNWKVTPALDFKLGITNLNTQORDQVATDADFIEGRTVYAGVNYKLEHHHHHHSt
op

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FstC (rFstC) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el N-terminal.

pelB-N6His-FstC

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGG
CCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCACACCACCACCACCACATTCATGGAGTTTTGAC
TATGCAGTTGCAGCCTGGCGTATTTTCGCTTGAACCCGATTTTGCTTTCCCTCGGTCTGTTTGCC
CTGCCGGGCTGCCCAGGCCGAGTTGCCCAAAGCCAACGAGACCATGGTGGTCACCGCCACCC
AGACCAAGCACACGGAAGTGTCCGCTCCGGCCAGCGTCTCTGTGGTGACCCGCGCCGATCTGGA
CAAGATGAACGCCAACAACATAGGCGATGCCCTCAAGCATGTGCCGGGTGTCAACATCATAGGC
ACCAACCCACGGGTGCGAGCGAGATCAAGATCCGCGGTATGGGCGGCGACTACACACTGCTGC
TGATCAACGGCAAACGGGTCAACGCCCGGAGACCCTGGGCAGCTCCTTTGGCAATGACTTCGA
CTTGAGCTCCATCCCATGGCGGCCATAGAGCGCATCGAAGTGATCCGTGGTCCCGTCTCCTCT
CTGTACGGTGCCGACGCCCTCGGCGGCGTGGTCAACGTGATCCTGCGCCAGGCCAAGGAGAAGA
CGGAAGCGGCCTTCGGCTACACCCACTCCATGCCACCAAGGGCGACGGGGGCGATGCCAACCA
GGCAGCGCCTTTGTCTCCGGTGCCCTCATCGACAACAAGCTGCTGGGCAGCGTGGTGGTTCGAA
GGCTACCAGCGTGACCGCTGGCACAGCGATCAGTCCAACAACCTGGATGCCGATGCGCTGGAAA
AACGGGAAGTGGTCAATGTGCTCTCCAGCCTGAAGTGGCTGGTCAAGTGGTCAACAGGATATCGA
TTTCGATCTGGGCTACAACCAGAACGACATGGACAGCTACTTCAACAACGTGCCCGTGCCCGG
ACCGCACCGGCCACCCCGCACAACTGCAAAAACCTCGATCGTCTGAGCCTGGGGCTGACCCACA
ACGGCCGTTGGGAGCACTTCGACAGCCCGGCCGCTACTACTTCGAGCAGACGGATCTGATGGA

TGACTCCCAGCTCAATGGCGGCGCCGCGGATGTCACCCAGACCAACCACACGGTTCGATGGCCAG
CTGAGCGGCTATCTGGGGAATCACCTGCTGACCTCGGGTGCCGAGATGCGCAAGACCGAGCTGG
AGCACAGCCGCAGCATCACCAACGGCAGCGTGGATGCCAGCCAGAGTGCCTCTATCTGCAGGA
CGAATTCAGCCTGGGGGATCTGGCGTTGACCCTCTCCGGCCGCCTCGACCACCATGAAACCTAT
GGCAACGAATTCAGCCCGCGGCCTATGCCCTCTACAAACTGACCGACGAGTGGGTGATCAAGG
GTGGCGCCGGCAAGGCCTTCAAGGCACCGACCCTGGCCAGTCCAGCGAAGGCTTCGCCACCAC
CGCCTGCCGTGGCGCCTGCAAGGTGGTCCGCAACCCGAACCTGAAACCGGAAACCGCCGTCAGC
TATGAGCTGGGCACCGCCTACGAGAGTGAGCGTTTTCGGCGCCGGTGTGACCGGCTTCCACAACG
ACATCGAAGATCTGATCCAGAGCGATCAGTGGGGCCCGGGCTACCGTCCGACCGTCATGACCTA
CCTCAACGTCAAGAAGGCACGGGTGAAAGGGCTGGAGCTGACCGGCTGGGTGACGACTGAGC
AACGTCAAGCTGACCGGCAACTGGAGCCTGCTGGATTCCCAAGACAAGAGCACGGGCGACGATC
TGACCAAGACCCCGGACCACACCGGCAACCTCAGCCTGGATTGGCAAGCCACCGAGATCGTCAG
TACCAACCTGGCCTGGCAATACGTGGGCAGCCAGTTCATCAAGGTGCCGATGCACAACTCCAG
GCGCTCAAGTCCAAGCACTATCAGACCCTGGACCTCAACACCAACTGGAAAGTCACGCCGGCGC
TCGACTTCAAACCTCGGCATCACCAACCTGACCAACACCCAGCGTGACCAGGTCGCCACCGACGC
CGATTTCAATCTGGAAGGTCGCACCGTCTATGCCGGGGTGAATTACAAGCTGTAA

Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína recombinante FstC (rFstC) en el plásmido pET20b(+) histidinas en el N-terminal.

pelB-N6His-FstC

MKYLLPTAAAGLLLLAAQP**A**MAMDIGINSDPHHHHHHIHGVL**T**MQLQPGVFRNLNPILLSLGLFAL
LPGLAQAE**L**PKANET**M**VVTATQTKHEL**S**APASVSVVTRADL**D**K**M**NANNIGDALKHVPGVNIIG
TNPTGRSEIKIR**G**MGGDYTL**L**LINGKRVNARETLGSSFGNDFLSSIP**M**AAIERIEVIRGPVSS
LYGADALGGVVN**V**ILRQAKEKTEAAFGYTH**S**MPTKGDGGDANQGS**A**FSVSGALIDNKLLGSVVVE
GYQRDRWHS**D**QSN**N**LDADALEKREVV**N**VLSS**L**KWL**V**SD**N**Q**D**IDFDLGY**N**Q**N**D**M**SYF**N**NP**R**AP
TAPATPHNVQ**K**LDRLSLGL**T**HNGRWEHFDSR**R**Y**F**EQ**T**D**L**M**D**DSQLNGGAADVTQ**T**NHTVDGQ
LSGYLGNHLL**T**SGA**E**MRKTELEHSR**S**ITNGSV**D**ASQ**S**ALY**L**QDEFSLGDLAL**T**LSGRLDHHETY
GNEFS**P**RAYALY**K**L**T**DEW**V**IKGGAG**K**AFK**A**PTLAQ**S**SEGFATTACRGACK**V**VGNPN**L**K**P**ETA**V**S
YELGTAYE**S**ERFGAGVTGFH**N**DI**E**DL**I**QSDQWGPYR**P**TV**M**TYLN**V**KKAR**V**KGLE**L**TGWVD**V**LD
NVK**L**TGNWSL**L**DSQDK**S**TGDD**L**T**K**TPDHTGNLSL**D**WQ**A**TE**I**VST**N**LAWQY**V**GS**Q**FI**K**VP**M**H**N**S**Q**
AL**K**SKHY**Q**T**L**DL**N**T**N**W**K**VPAL**D**FK**L**G**I**T**N**L**T**NT**Q**R**D**Q**V**AT**D**AD**F**ILE**G**RT**V**YAG**V**NY**K**L**S**top

Espectrometría de masas para la identificación de las proteínas recombinantes, mediante Huella Peptídica (MALDI-TOF-TOF)

rFvtA 6His en el N-terminal. En verde se resaltan los fragmentos identificados

MVHHHHHHQLEKKEPQRKQDTVVVVGEKLGGLAENTSSLT**L**FTDEVD**D**GESRDYD**L**LD**R**VP**N**VL**N**AP**S**
G**I**PHIR**G****V****D****G****R****G****P****G****E****G****F****L****T****F****M****T****G****A****T****P****R**V**N**T**T**VD**G**VS**E**SW**S**GE**A**F**G**K**A**GL**W****D****T****E****Q****V****E****V****K****G****P****S****T****N****Q****R****N****S**
IAGAV**V**IKTKDPTFHREGK**V**R**A**Y**E****N****E****D****S****K****Y****H****L****A****G****V****S****A****P****L****V****E****D****T****L****A****F****R**L**A**A**E****G****T****K****G****N****T****P****I****D****Y****S****L****P****N****G****D****Q**
Y**P**W**D****P****S****E****L****S****Y****N****V****R****G****K****L****L****W****K****P****Q****G****N****D****K****L****T****A****K****L****T****V****G****S****R****N****E****E****G****Q****Y****T****N****F****V****T****K****P****G****T****L****E****L****H****S****K****S****G****T****R****R****Q****E****T****K****S****W****N****I**
N**L****D****V****N****Y****V****I****N****D****E****L****T****T****D****I****L****V****A****H****R****N****Y****T****T****K****F****K****A****P****D****T****N****W****Y****G****D****V****E****D****N****Y****T****A****E****A****K****L****T****Y****Q****S****L****D****E****K****Y****N****A****I****L****G****L****A****G****F****F****K**
D**Q****Y****T****E****T****D****S****L****K****R****K****D****E****V****L****T****N****S****I****Y****F****D****S****R****I****R****L****D****N****R****W****Q****L****L****L****G****A****R****Y****E****R****D****E****L****K****R****D****F****D****H****A****T****L****P****L****D****F****K****A****E****D****D****G****I****L****L****P****K**
I**G****L****L****L****D****V****S****D****H****S****T****L****G****L****T****A****R****K****G****Y****N****A****G****G****L****G****Y****N****E****Y****K****E****E****V****F****V****F****E****R****E****K****V****W****S****Y****E****L****S****S****R****S****S****F****L****D****D****K****L****D****L****T****A****N****L****F****Y****N****D****Y**
K**N****Y****Q****T****S****V****S****G****D****S****G****K****R****F****D****T****Y****I****T****N****I****P****K****G****K****T****Y****G****T****E****V****E****A****S****Y****W****F****D****S****G****L****D****L****F****A****F****V****G****L****L****K****T****D****I****S****E****G****P****T****G****T****S****T****N****L****S****G****N****E**

FSYAPKLSAGAGFTQHLD SGLFFVARVNHVSDYYTDLAN TESKTAGDYTVLNLNAGYTLNDLTIRAYVKN
 VTDEEYVIRQKSDLYEVGGPRTFGIVADYQF

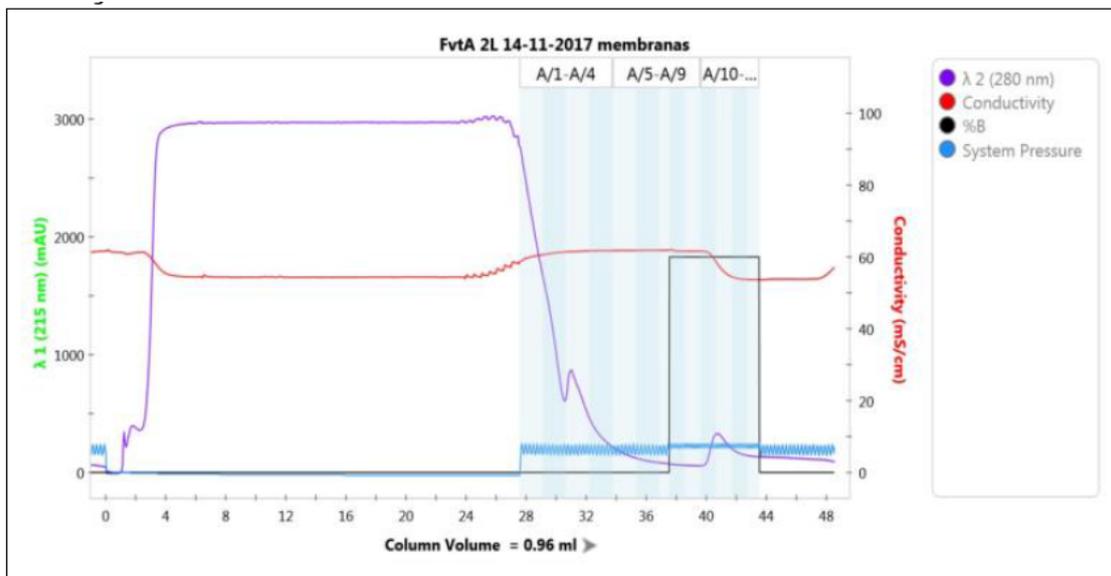
rFstC 6His en el C-terminal. En verde se resaltan los fragmentos identificados

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMDIGINS DPIHGVLTMQLQPGVFR LNPILLSLGLFALPGLAQAELPKA
 NETMVVTATQTKHTELSAPASVSVVTRADLDKMNANNIGDALKHVPGVNIIGTNP TGRSEIKIRMGGDY
 TLLLINGKRVNARETLGSSFGNDFDLSSIPMAA IERIEVIRGPVSSLYGADALGGVNVILRQAKEKTEA
 AFGYTHSMPTKGDGDANQGS AFVSGALIDNKLLGSVVVEGYQRDRWHS DQSNL DADALEKREVVNVL S
 SLKWL VSDNQDIDFDLGYNQNDMDSYFNNVPRAPTAPATPHNVQKLDRLSLGLTHNGRWEHFDSR ARYYF
 EQTDLMDDSQLNGGAADV TQTNHTVDGQLSGYLG NHHLLTSGAEMRKTELEHSR SITNGSVDASQSALYLQ
 DEFSLGDLALTL SGRLDHHE TYGNEFSPRAYALYKLTDEWVIKGGAGKAFKAPTLAQSSEGFATTACRGA
 CKVVGPNLKPETA VSYELGTAYESERFGAGVTGFHNDIEDLIQSDQWGP GYRPTVMTYLN VKKARVKGL
 ELTGWVDVLDNVKLTGNWSLLDSQDKSTGDDLTKTPDHTGNLSLDWQATEIVSTNLAWQYVGSQFIKVP M
 HNSQALKSKHYQTLDLN TNWKVTPALDFKLGITNLNTNTQRDQVATDADFILEGR TVYAGVNYK LLEHHH H
 HH

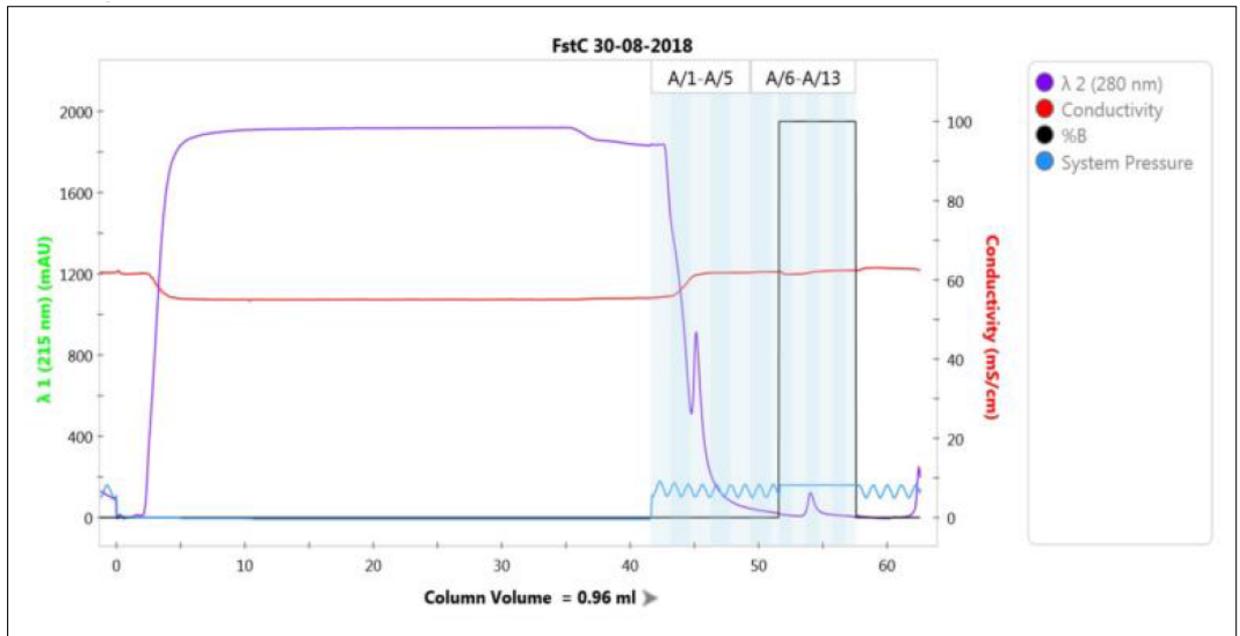
Cromatogramas de la purificación de las proteínas recombinantes FvtA, FstC y FstA

Se usó una columna HisTrap de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences).
 Tampones: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 50 mM y Elugent al 0.25 % y Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 250 mM, y Elugent al 0.25 %.

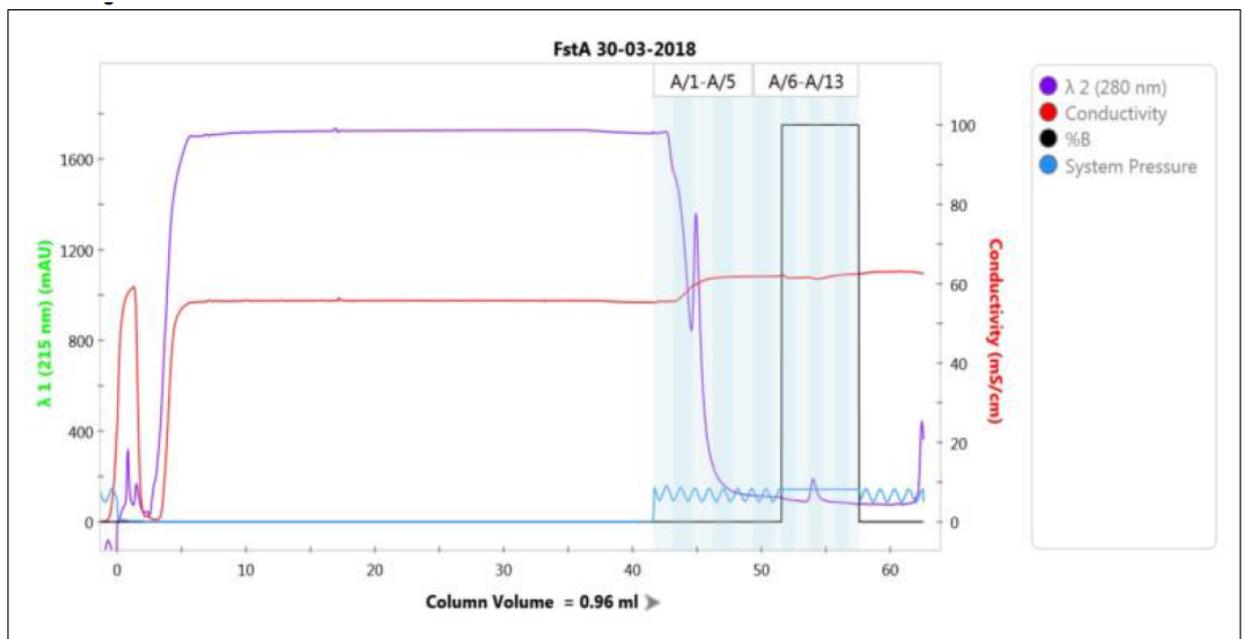
rFvtA



FstC

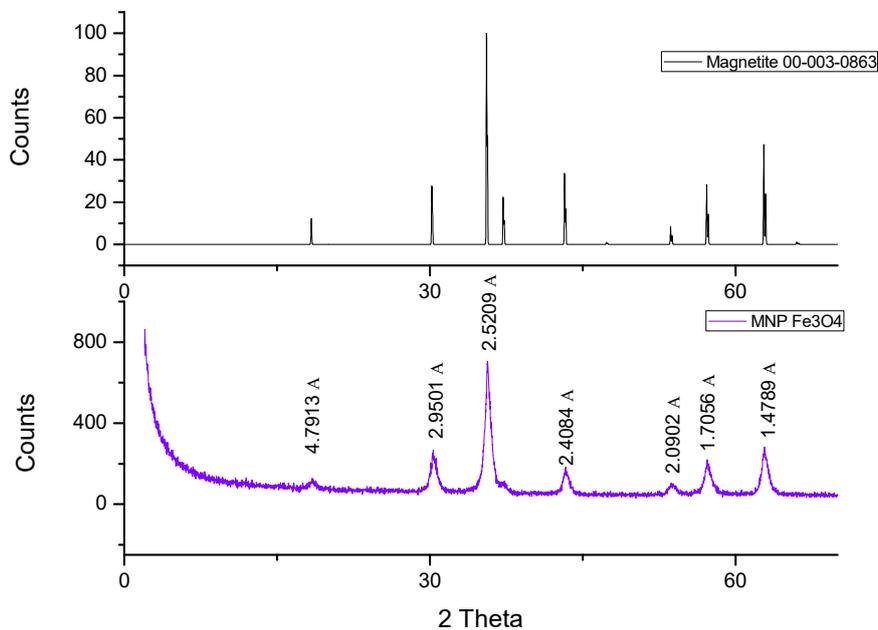


rFstA

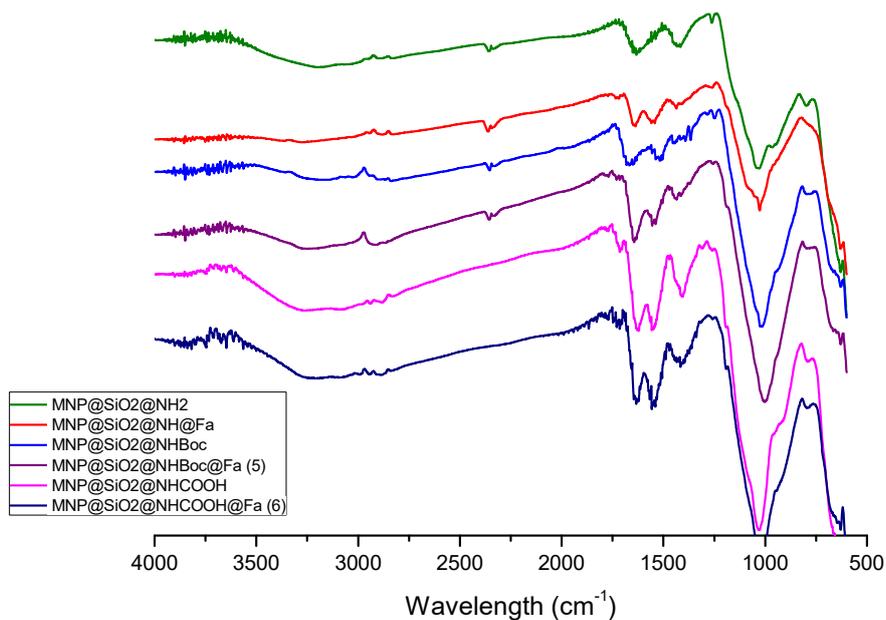


Appendix

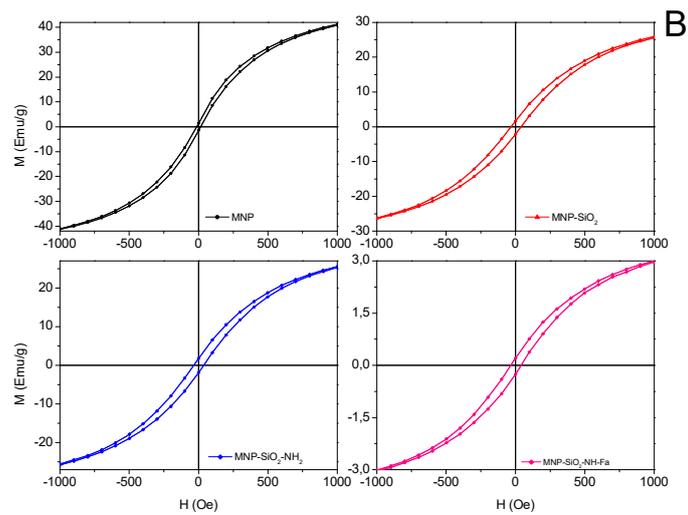
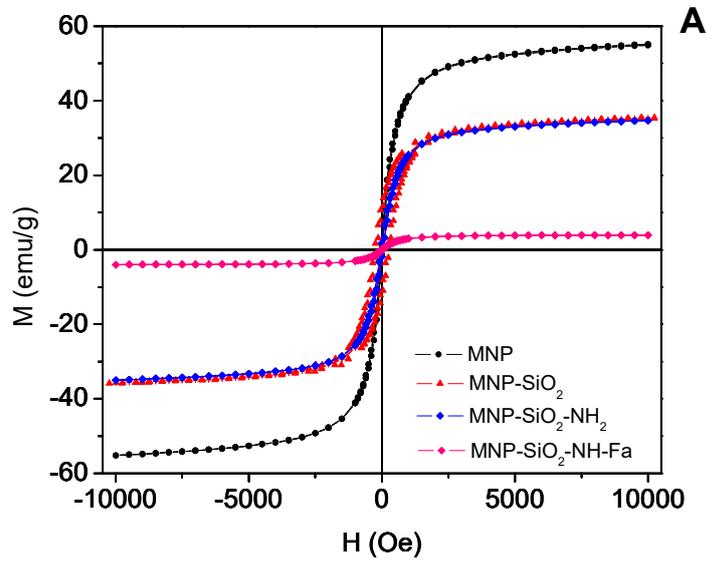
- Comparison of MNP (Fe_3O_4) (blue) and magnetite pattern (black) diffractograms.



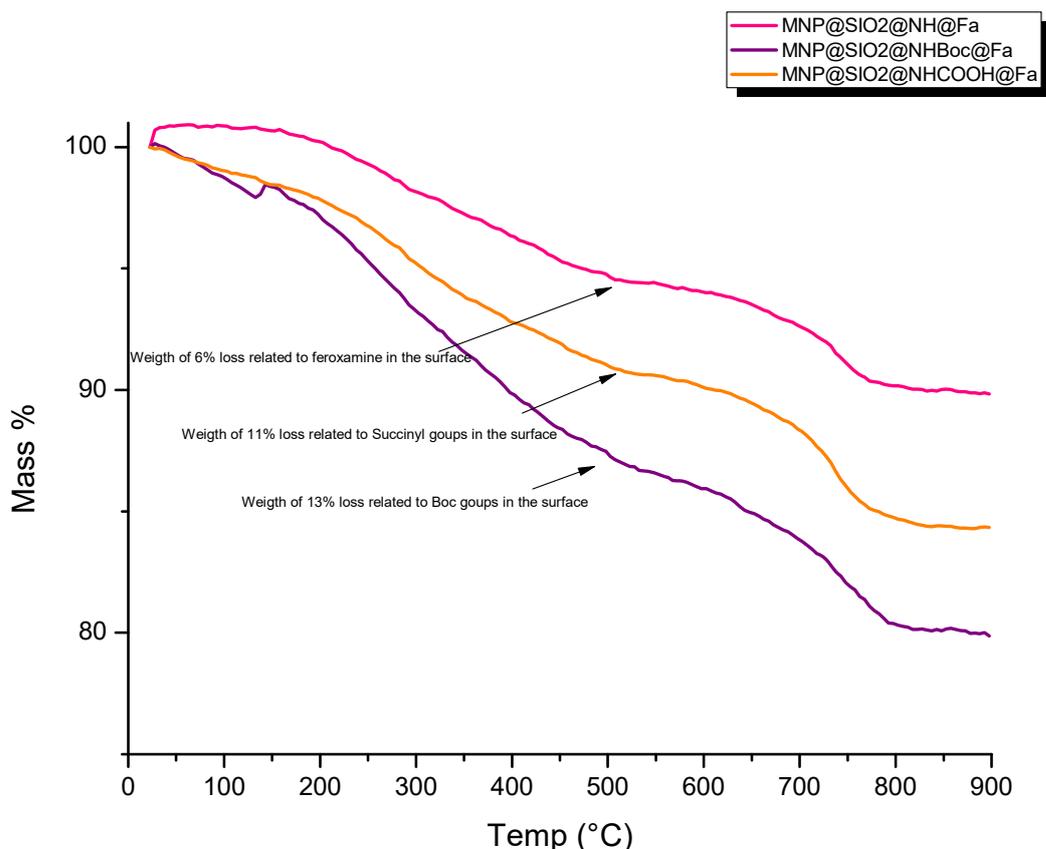
- FT-IR spectra of $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$, $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$ (4), $\text{MNP@SiO}_2\text{@NHBoc}$, $\text{MNP@SiO}_2\text{@NHBoc@Fa}$ (5), $\text{MNP@SiO}_2\text{@NHCOOH}$ and $\text{MNP@SiO}_2\text{@NHCOOH@Fa}$ (6).



- Magnetization A) Hysteresis cycle of the magnetization for the initial MNP (Fe_3O_4), and the subsequent components added in different layers to the MNP, MNP@SiO_2 , $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$, and $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$ (4) and B) their corresponding hysteresis loops.



- Thermogravimetric analysis (TGA) of MNP@SiO₂@NH@Fa (4), MNP@SiO₂@NHBoc@Fa (5) and MNP@SiO₂@NHCOOH@Fa (6).



Estimation of feroxamine bonded to a 1 mg of MNP@SiO₂@NH₂:

Weight loss of MNP@SiO₂@NH₂ = 5.6 %

Weight loss of MNP@SiO₂@NH@Fa = 11.1 %

Expected Weight loss for MNP@SiO₂@NH@Fa:

= (% Wt loss of MNP@SiO₂@NH@Fa) - (% Wt loss of MNP@SiO₂@NH₂)

= (11.1 – 5.6) % = **5.44%**

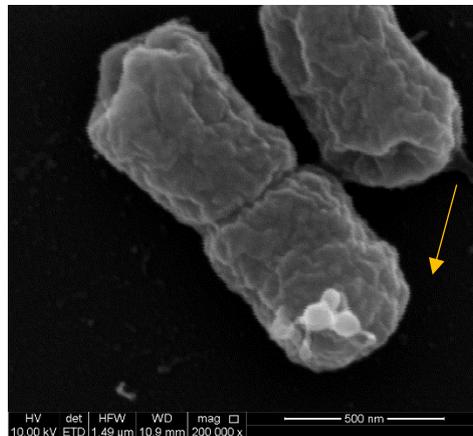
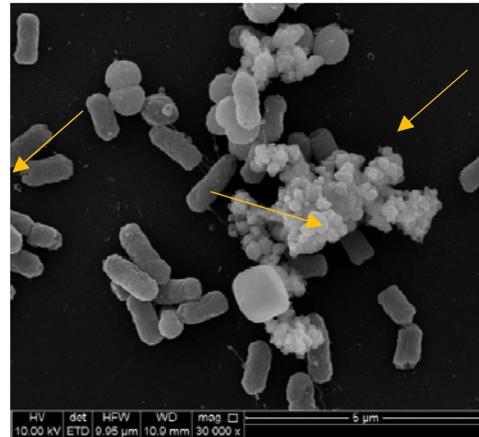
Weight loss of feroxamine from 1 mg of conjugate:

$$1\text{mg} \frac{5.44\% \text{ of feroxamine}}{100} = 0.0544 \text{ mg of feroxamine}$$

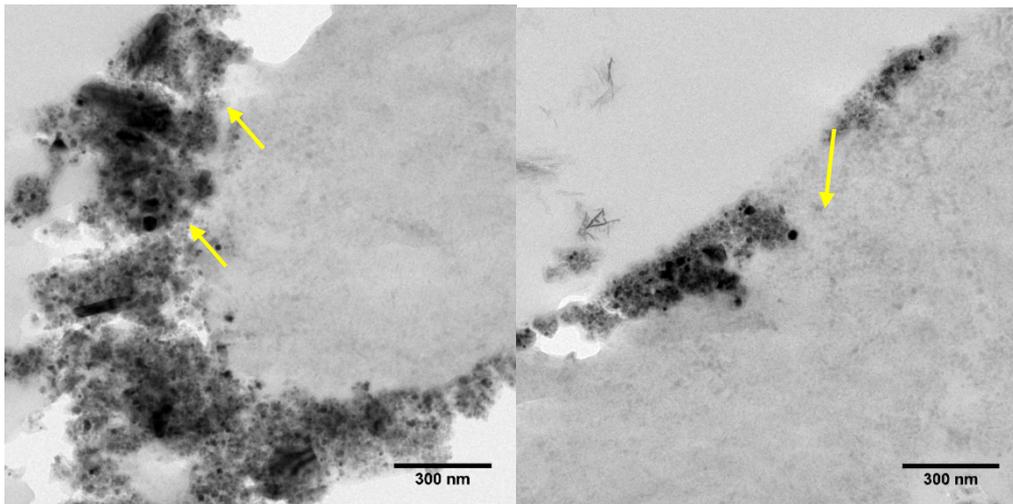
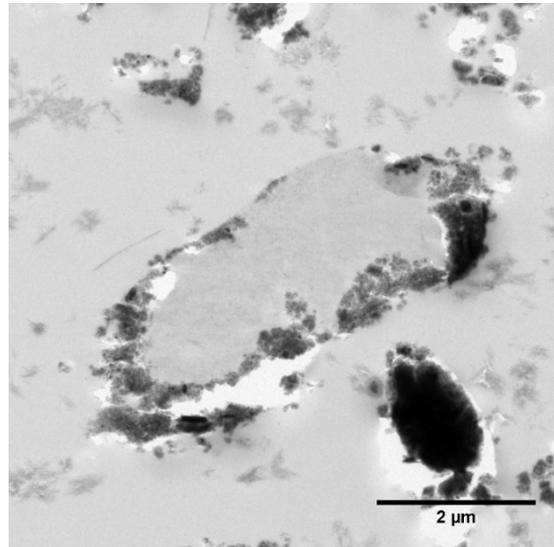
$$\frac{5.44 \times 10^{-3} \text{ g}}{713.98 \text{ mg / mmol}} = 7.62 \times 10^{-5} \text{ mmol of feroxamine}$$

The amount of feroxamine per mg of MNP@SiO₂@NH₂ is 0.0544 mg, approximately. The conjugation was carried out using an excess of feroxamine to ensure that several amine groups were successfully coupled to the siderophore.

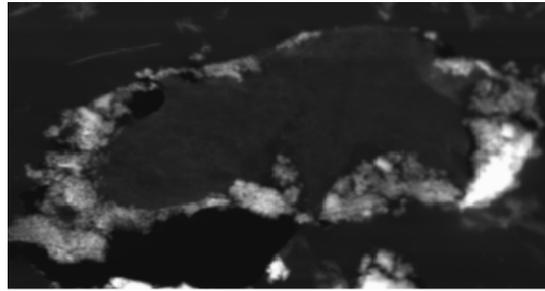
SEM images of *Y. enterocolitica* WC-A interacting with $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH@Fa}$ (4).



TEM images of *Y. enterocolitica* WC-A interacting with MNP@SiO₂@NH@Fa (4).
a) Attachment of nanoparticles to the surface of a single bacterial cell; b) and c) detail of the attachment at two different regions of the bacterial membrane.

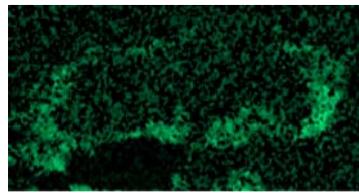
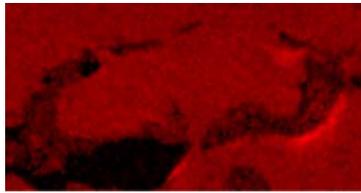


EDX maps of *Y. enterocolitica* WC-A interacting with MNP@SiO₂@NH@Fa (4).

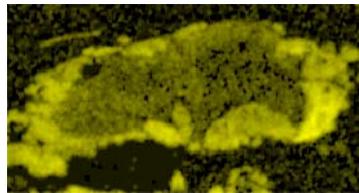


C K series

N K series



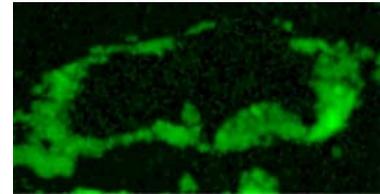
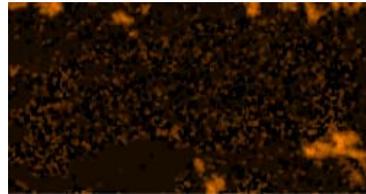
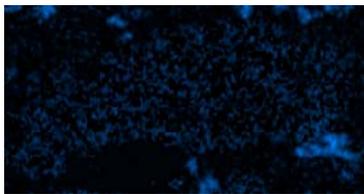
Si K series



P K series

Ca K series

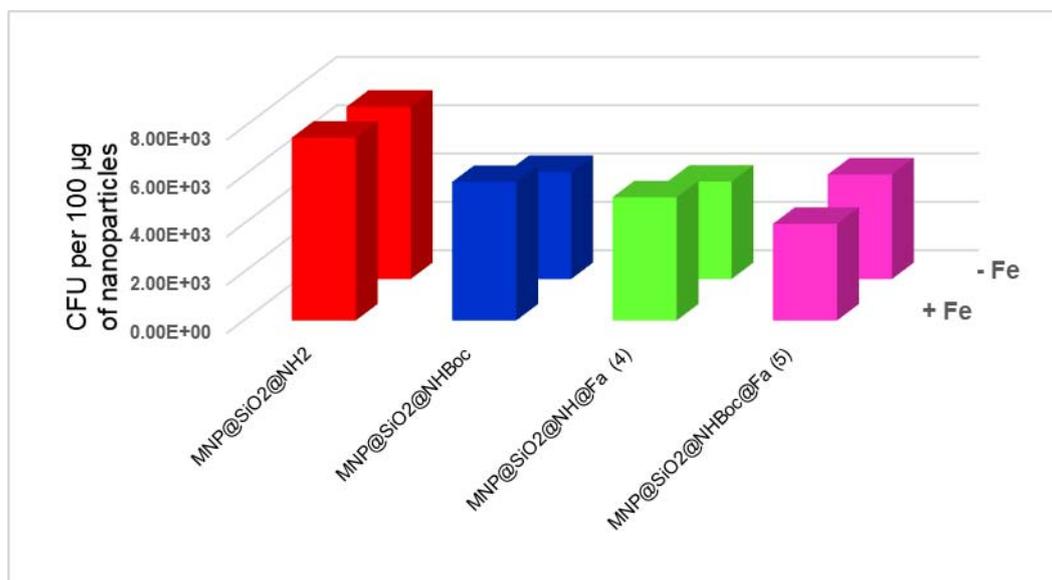
Fe K series



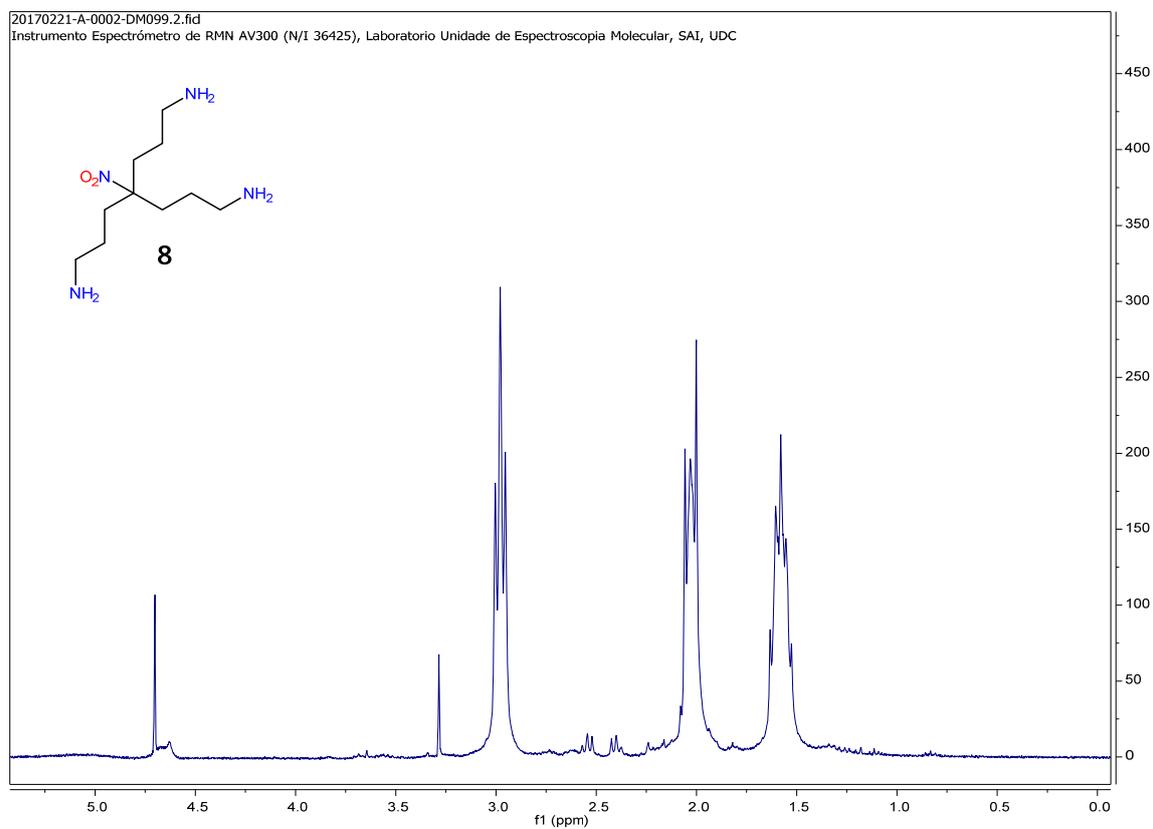
Os L series



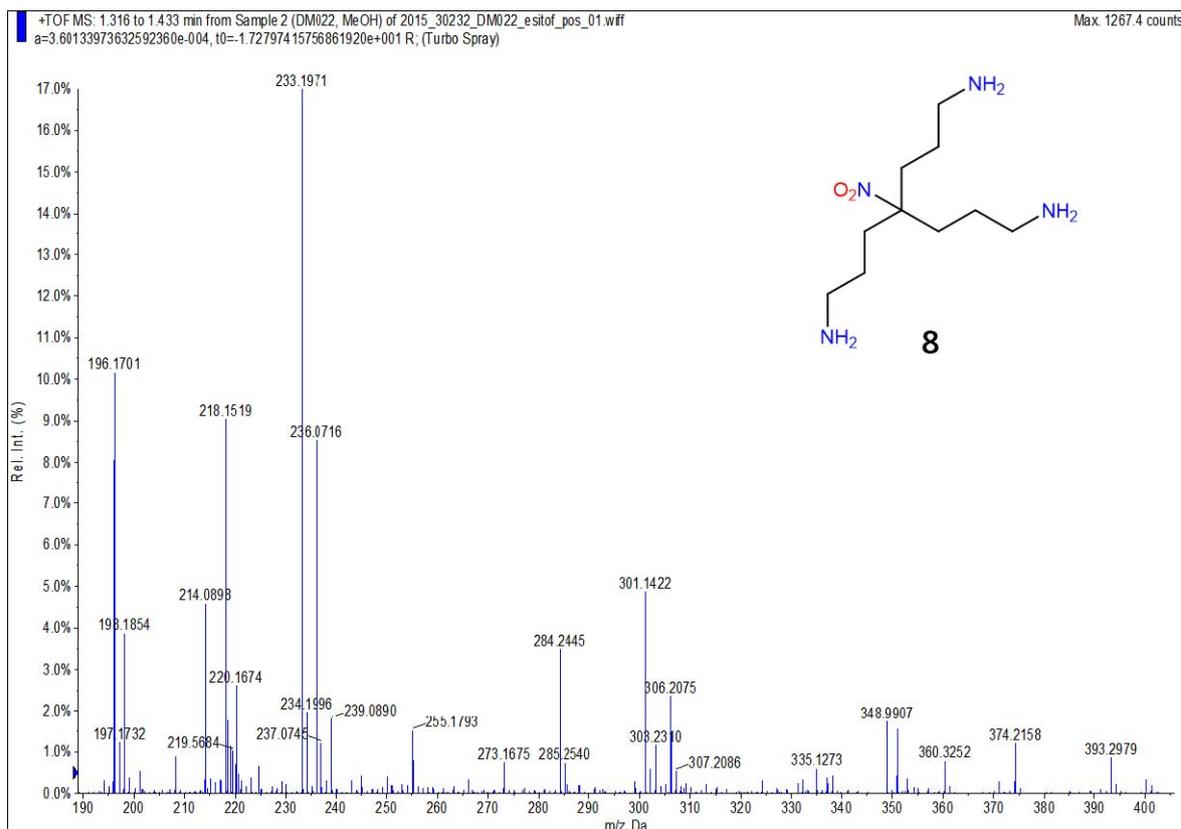
CFU of *Y. enterocolitica* WC-A (wild type) captured per 100 μg of magnetic nanoparticles in iron and iron deficiency growth conditions.



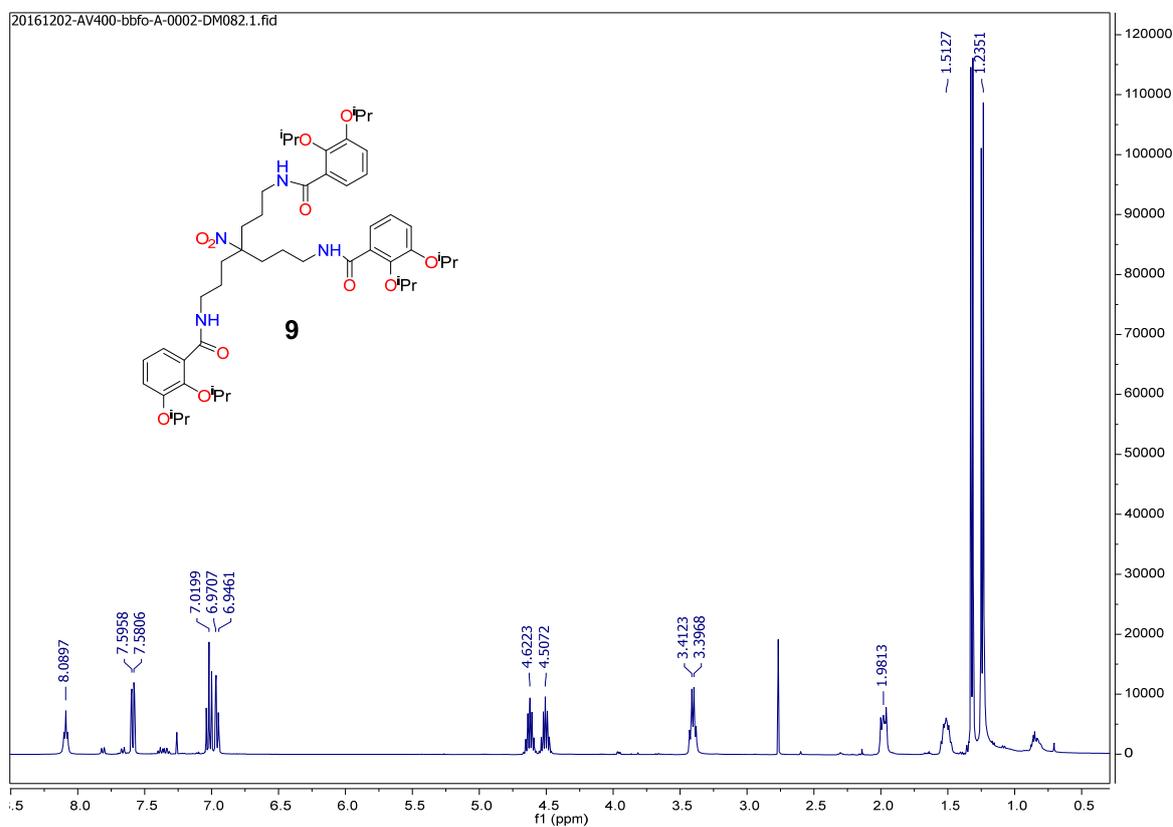
NMR data of compound 8 in CD₃OD at 300MHz (¹H)

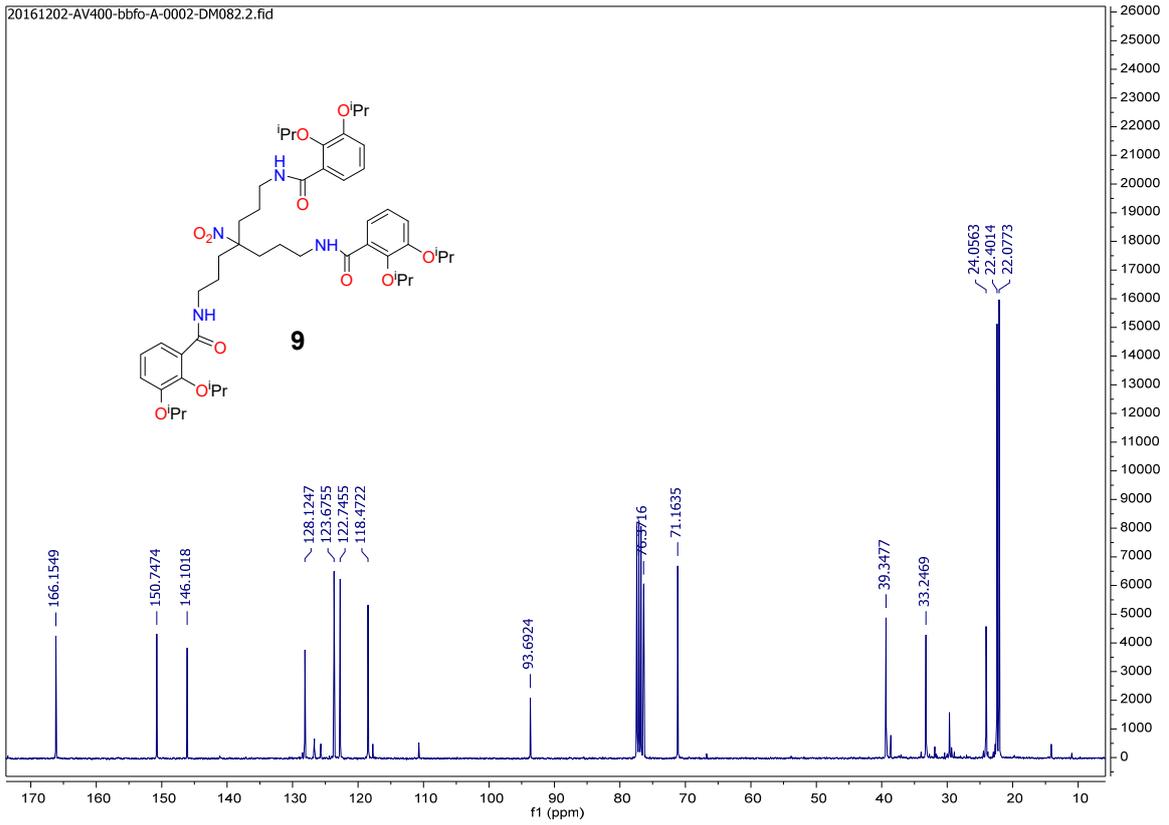


(+)-ESI-LRMS of compound 8

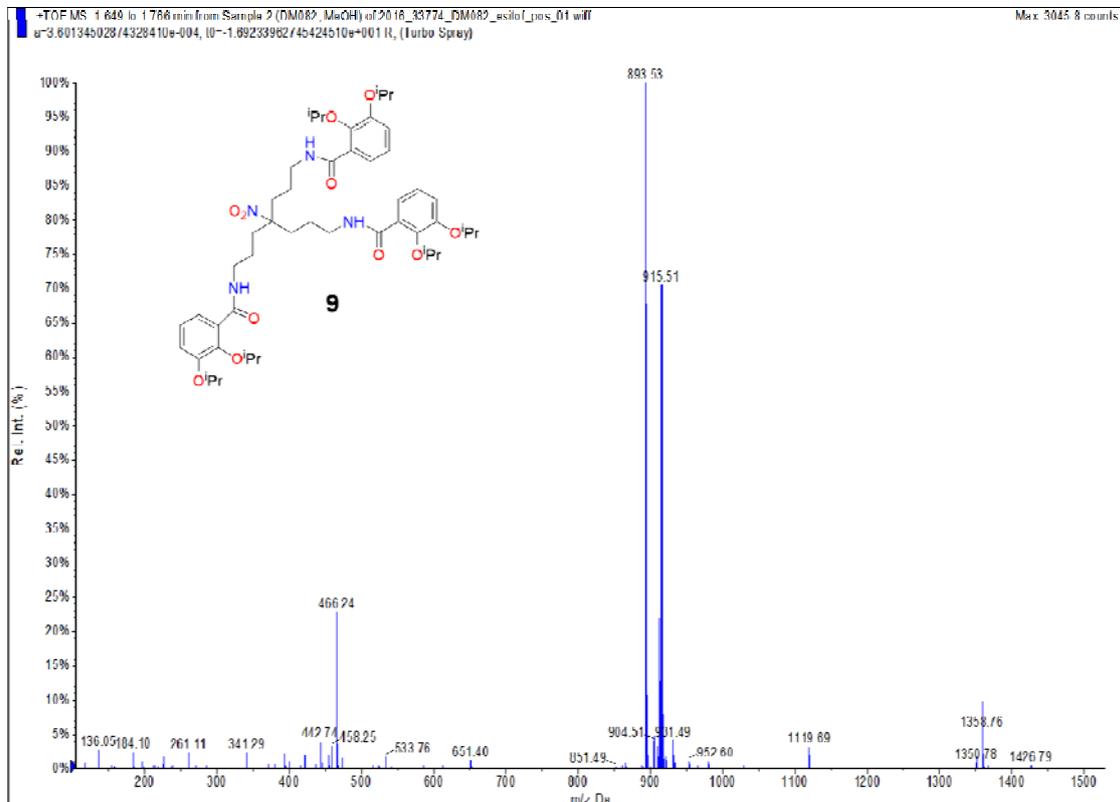


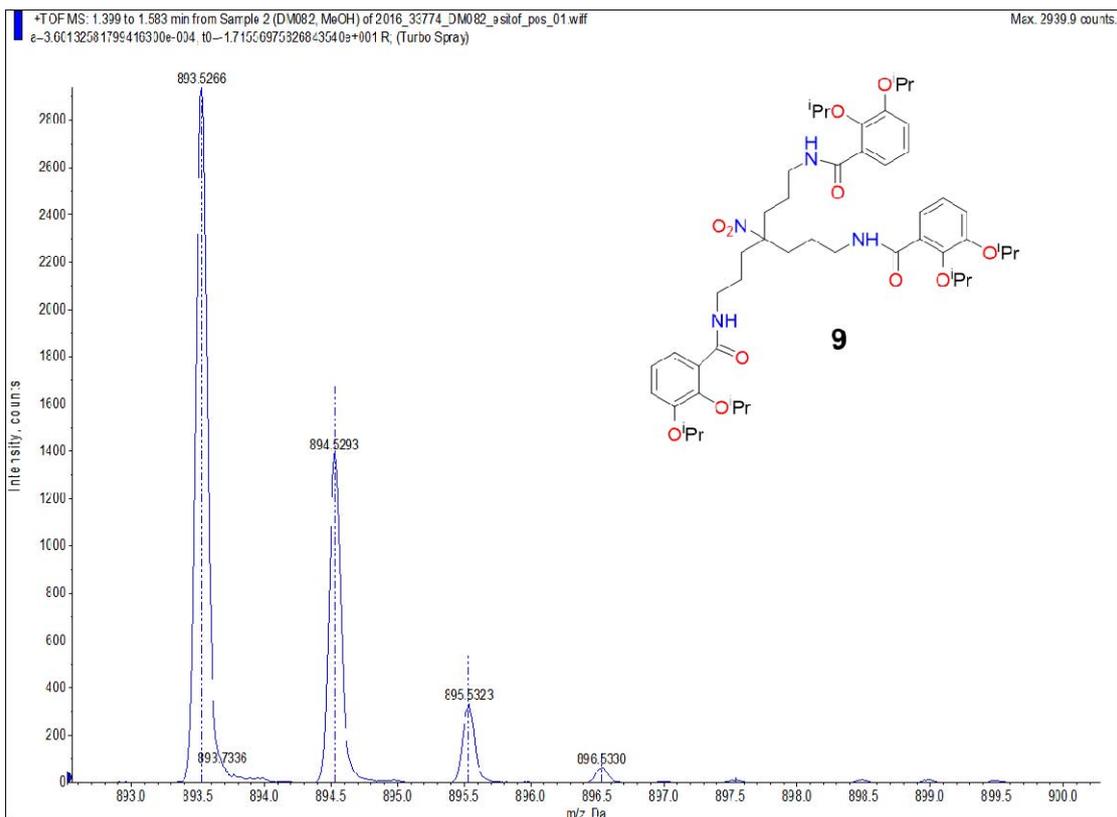
NMR data of compound (9) in CDCl₃ at 400MHz (¹H, ¹³C)



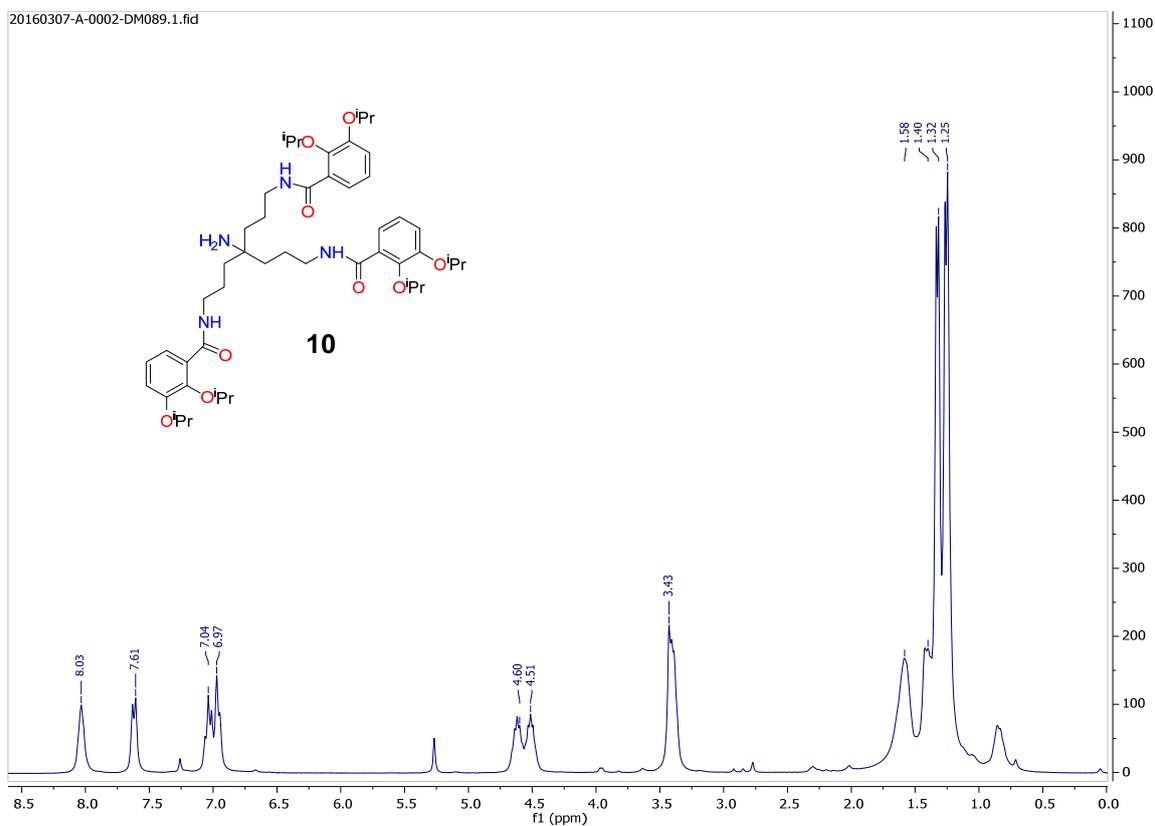


(+)-ESI-LRMS and (+)-ESI-HRMS of compound (9)

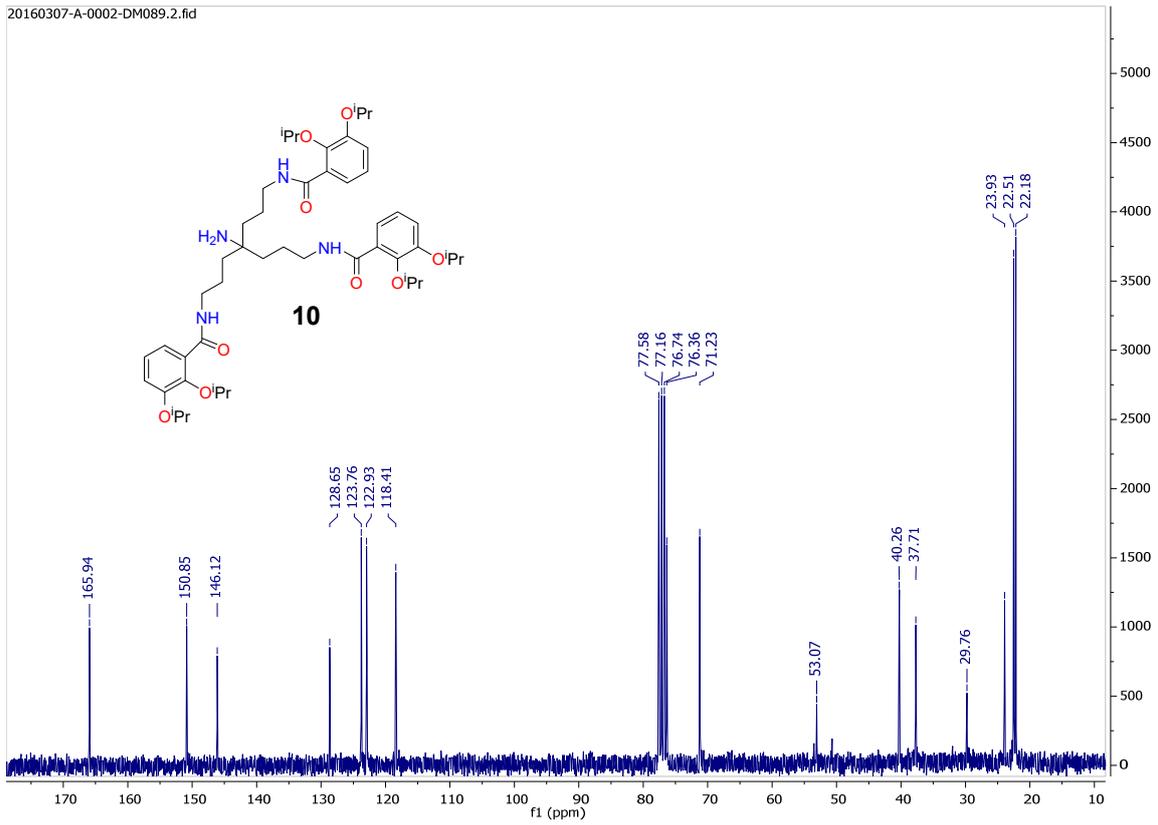




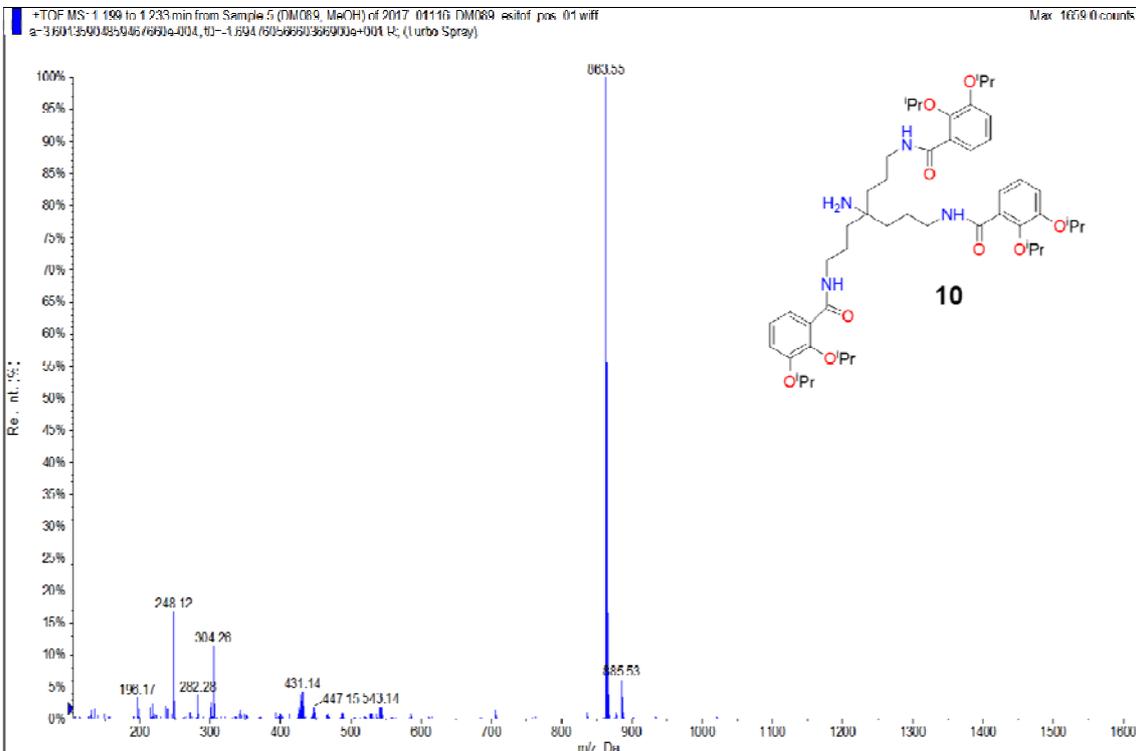
NMR data of compound (10) in CDCl₃ at 300MHz (¹H, ¹³C)

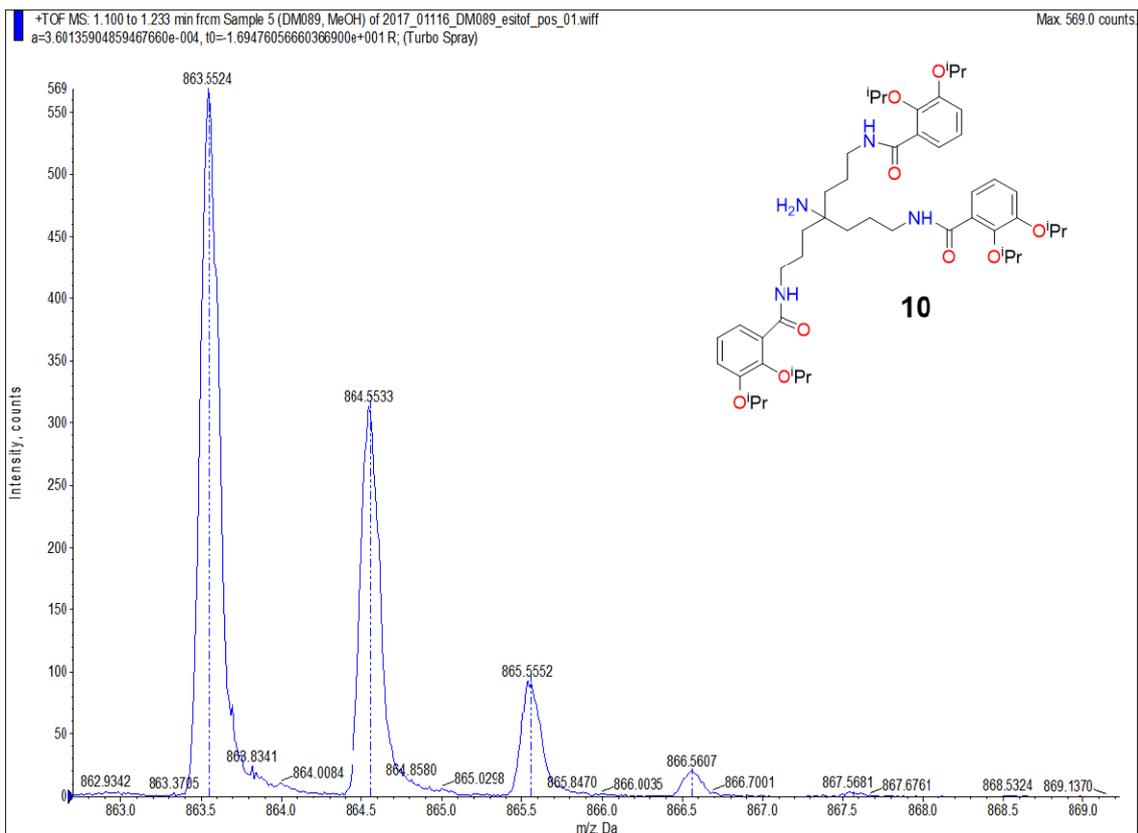


20160307-A-0002-DM089.2.fid

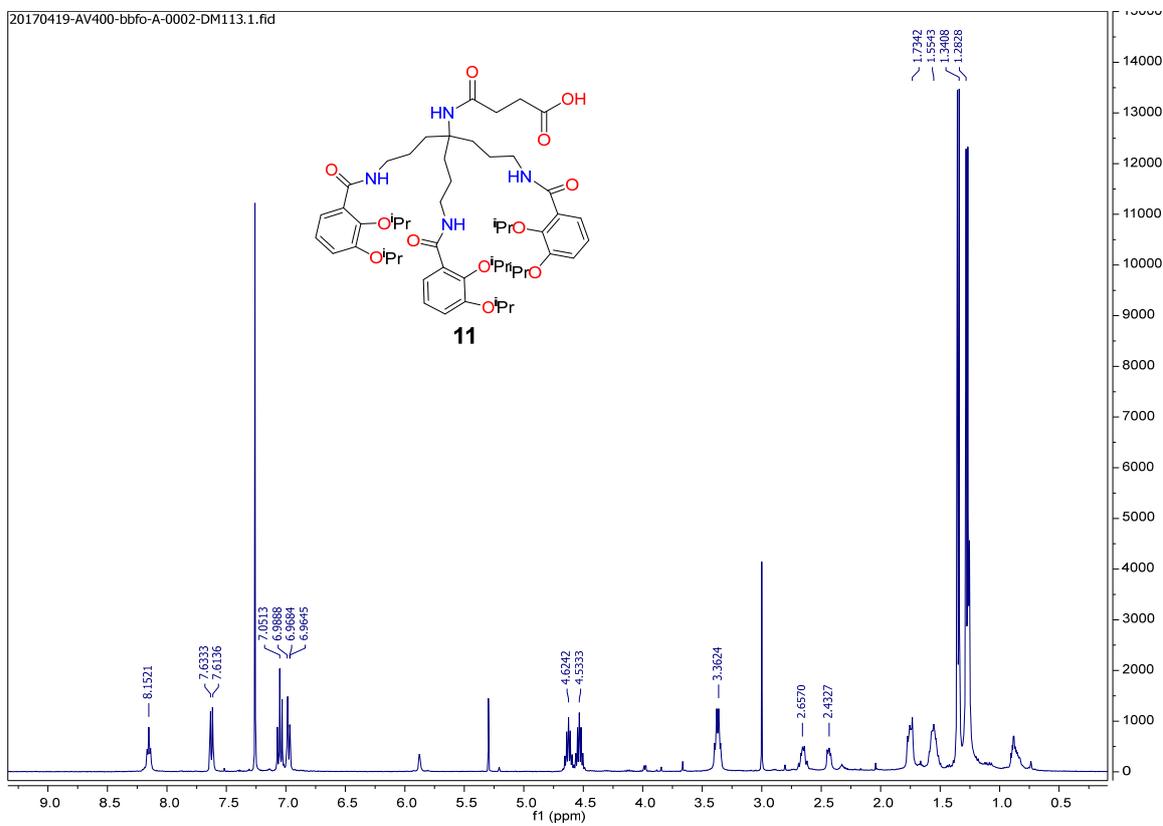


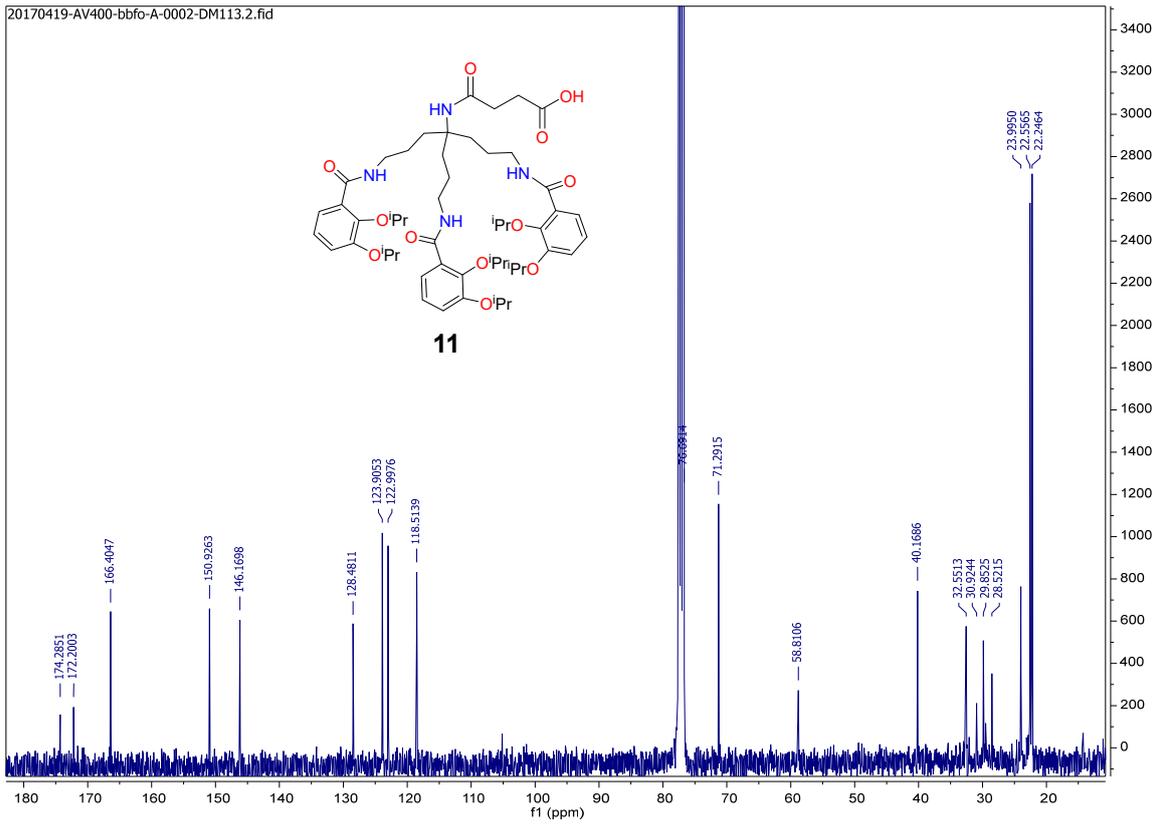
(+)-ESI-LRMS and (+)-ESI-HRMS of compound 10



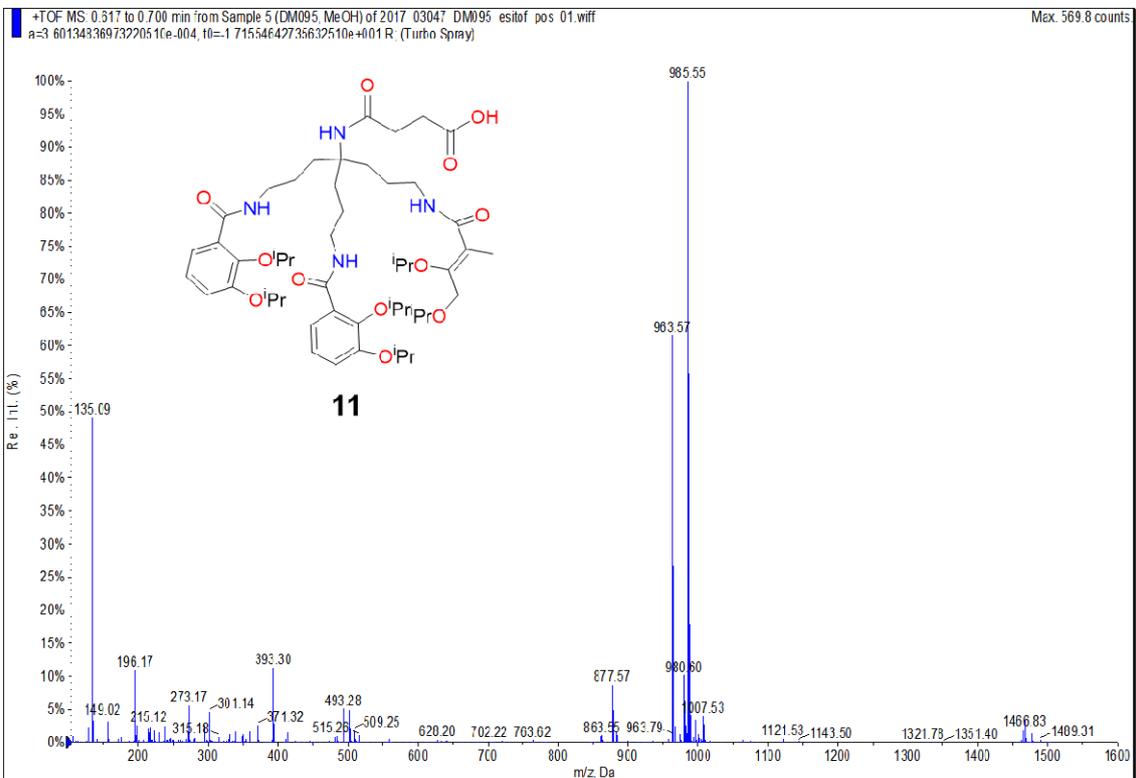


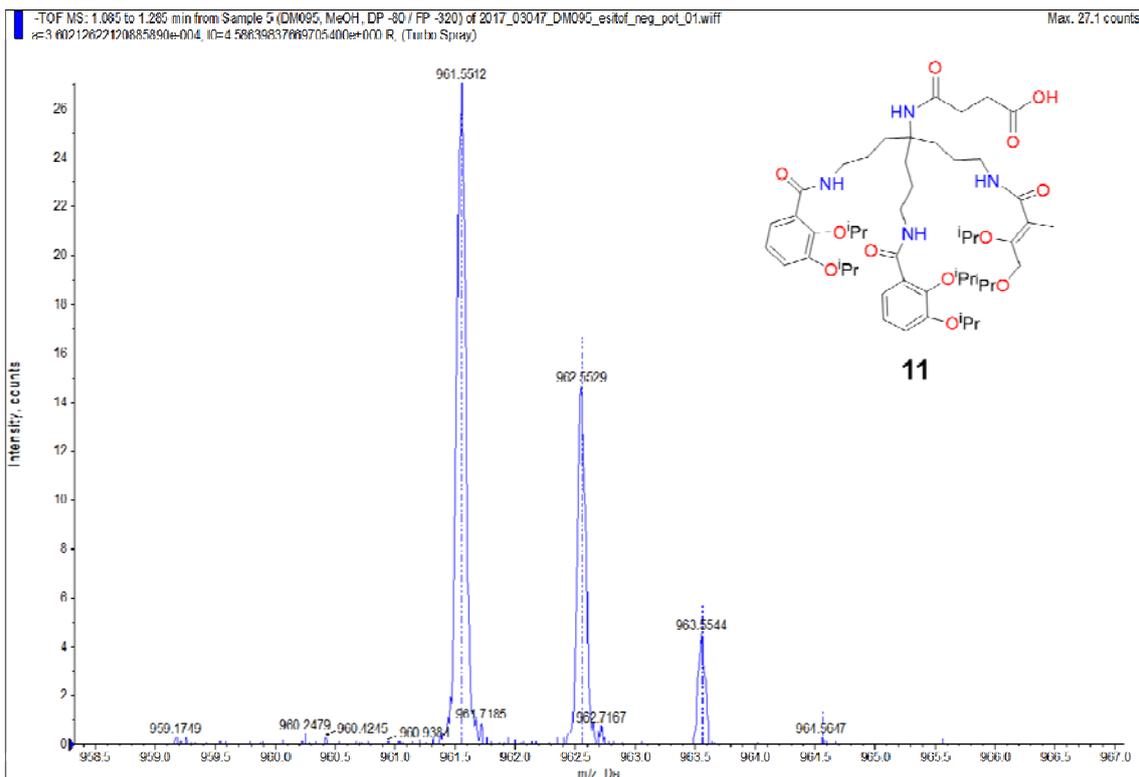
NMR data of compound 11 in CDCl₃ at 400MHz (¹H, ¹³C)



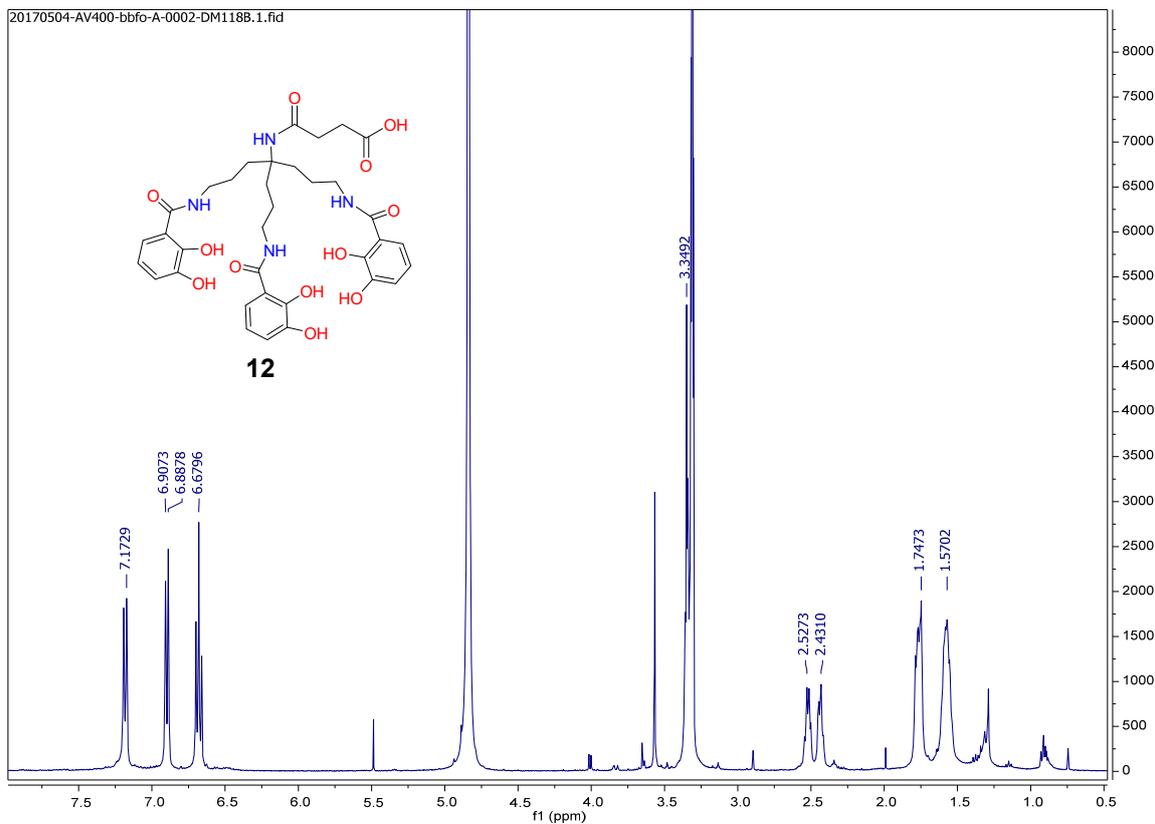


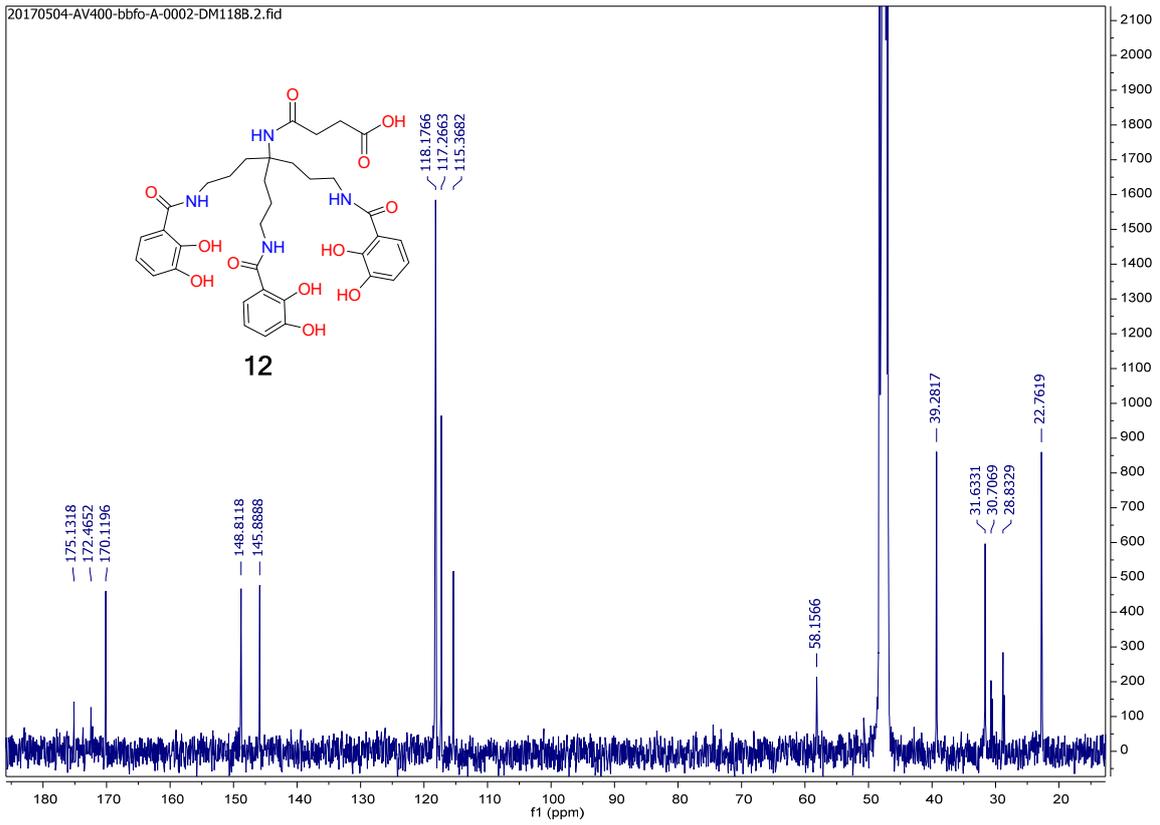
(+)-ESI-LRMS and (+)-ESI-HRMS of compound 11



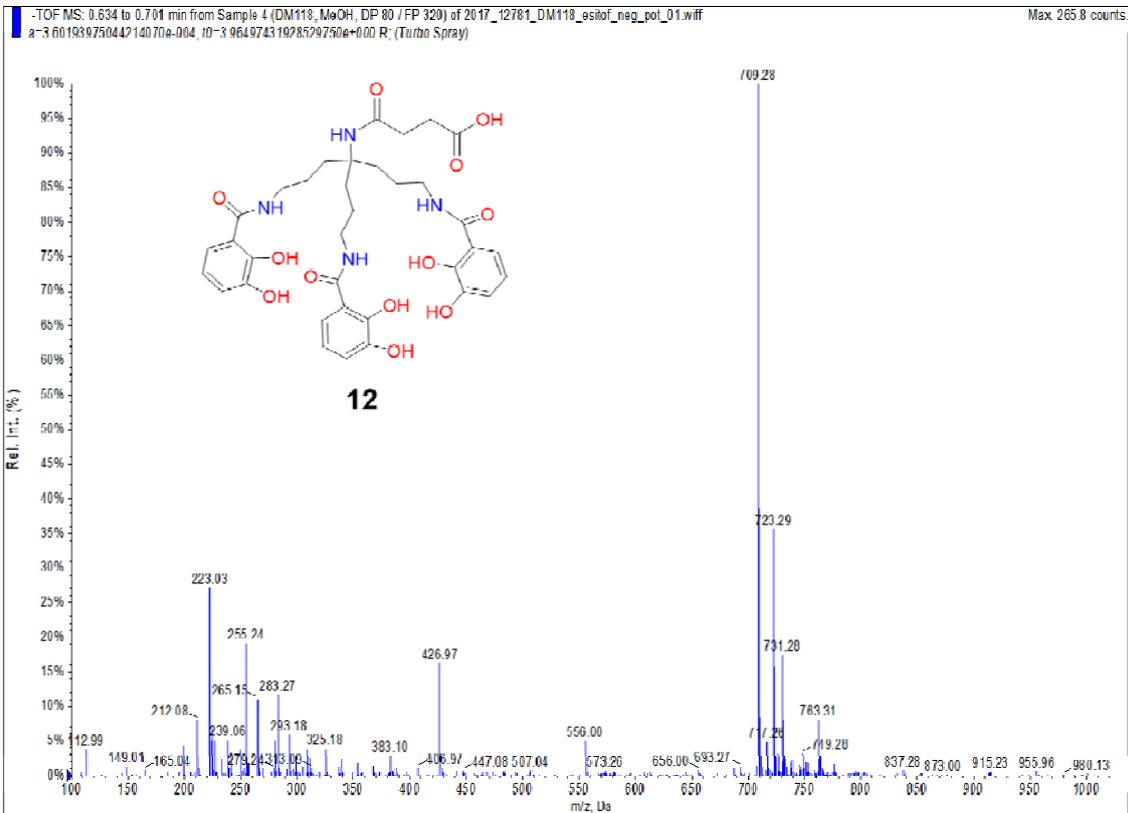


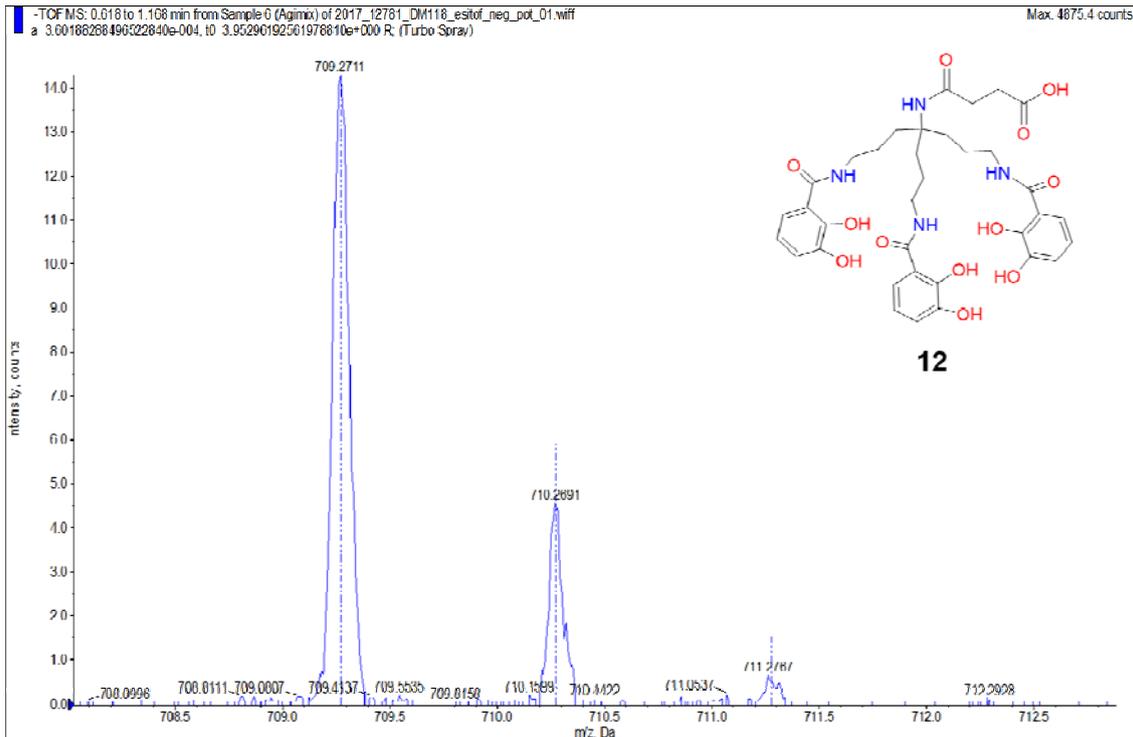
NMR data of compound 12 in CDCl₃ at 400MHz (¹H, ¹³C)





(-)-ESI-LRMS and (-)-ESI-HRMS of compound 12





(-)-ESI-LRMS and (-)-ESI-HRMS of compound 13

