

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



ESCUELA SUPERIOR DE APAN

TESIS DE LICENCIATURA

Análisis funcional de superóxido dismutasas y catalasas de *Stenotrophomonas maltophilia* en la tolerancia al estrés oxidativo y la replicación en fagosomas de *Acanthamoeba castellanii*

Para obtener el título de

Licenciada en Ingeniería en Biociencias

PRESENTA

Karina Mendoza Gómez

Director de tesis

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann. Centro de Ciencias Genómicas – UNAM

Co-director de tesis

Dr. Martín Peralta Gil

Agosto, 2026. Apan, Hidalgo.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Escuela Superior de Apan
Campus Apan

Número de control: ESAP-Bio-143-2026
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Karina Mendoza Gómez P.D.L.I.B.C.
PRESENTE

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias, **Karina Mendoza Gómez (353465)**, a quien le presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título "**Análisis funcional de superóxido dismutasas y catalasas de *Stenotrophomonas maltophilia* en la tolerancia al estrés oxidativo y la replicación en fagosomas de *Acanthamoeba castellanii***", después de la revisión, ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dra. Teresa Romero Cortes

SECRETARIO: Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann

PRIMER VOCAL: Dr. Martín Peralta Gil

SEGUNDO VOCAL: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

TERCER VOCAL: Dr. Víctor Hugo Pérez España

SUPLENTE 1: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SUPLENTE 2: Dra. Gisela Ortíz Yescas

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 30 de junio de 2026.

Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinadora de la Licenciatura en Ingeniería en
Biociencias



"Amor, Orden y Progreso"



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43000
Teléfono: 7717172000 Ext. 50900
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Lugar donde se realizó la tesis

Este trabajo se realizó en el programa de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann, con el apoyo del Ing. Quím. Javier Rivera y el Biól. Mauricio Daniel Osorio Herrera, y financiado por los proyectos SECIHTI CBD-2025-I-1106 y PAPIIT-UNAM IN216424.

Dedicatoria

A mis padres, por su eterno amor, su infinita paciencia y su apoyo incondicional. Este título lleva sus nombres grabados, porque su esfuerzo y sacrificio pavimentaron mi camino.

Gracias por creer en mis sueños incluso antes de que yo misma supiera cómo alcanzarlos. Sin su guía y su fe ciega en mí, nada de esto sería posible.

A mi hermana, porque eres mi mejor amiga, mi alma gemela y la persona más importante de mi vida. Gracias por acompañarme en cada paso y por ser mi mayor motivación. En cada meta que persigo y en cada logro que alcanzo siempre hay una parte de ti que me impulsa a dar lo mejor de mí.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al **Dr. Pablo Vinuesa**, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por confiarme este proyecto. Gracias por su confianza, sus valiosas observaciones y por el tiempo dedicado a mi formación; por enseñarme que la investigación no solo implica obtener resultados, sino también aprender a cuestionar, analizar y perseverar. Al **Ing. Javier Rivera**, por su colaboración y apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto, los cuales contribuyeron significativamente a la realización de esta investigación. Al **Dr. Martín Peralta**, por su constante apoyo, por confiar en mí y por todas las enseñanzas que me brindó durante mi formación universitaria. Gran parte de lo que sé hoy se lo debo a usted.

De manera especial, agradezco a **Brian García** por su amistad, apoyo y los grandes momentos compartidos en este tiempo. A **Mauricio Osorio**, mi más profundo agradecimiento. Gracias por enseñarme todo lo que sé del trabajo en el laboratorio y por tener siempre la paciencia para resolver mis dudas. Con el tiempo te convertiste en mucho más que un compañero: mi amigo, mi confidente y una de las personas que más admiro. Gracias por tu apoyo, por escucharme y por hacer esta etapa tan especial. A mis mejores amigos, **Valeria Bermeo** y **Aaron Miranda**, gracias por hacer de Cuernavaca un hogar; por acompañarme siempre, escucharme, apoyarme, celebrar mis logros, levantarme en los momentos más difíciles y regalarme una amistad que siempre atesoraré.

A mi mejor amiga, **Valeria Rodríguez**, por ser mi compañera incondicional desde la preparatoria. Gracias por recordarme que la verdadera amistad trasciende cualquier situación y cualquier kilómetro. Finalmente, a mis perritos **Golfo, Honey** y **Pichi**, porque su amor siempre ha sido uno de los regalos más grandes de mi vida. A mi **Chencha**, por haber sido mi compañera durante tantas etapas de mi vida. Gracias por crecer conmigo, por acompañarme durante tantos años y por dejar una huella imborrable en mi corazón. Siempre formarás parte de mí.

Resumen

Stenotrophomonas maltophilia es un patógeno oportunista capaz de sobrevivir intracelularmente en la ameba *Acanthamoeba castellanii*, donde se enfrenta a un microambiente fagosomal dinámico caracterizado por múltiples condiciones adversas, entre ellas el estrés oxidativo. La capacidad de contrarrestar este estrés mediante sistemas antioxidantes especializados podría ser determinante para la persistencia intracelular. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue realizar el análisis funcional de las superóxido dismutasas (SODs) y la catalasa KatN de la cepa *S. maltophilia* Sm18 para determinar su rol en la tolerancia al estrés oxidativo intracelular. Para ello, se construyeron fusiones transcripcionales en el vector pSEVA337-mScarlet3 de los loci *sodA2*, *sodB*, *sodC1*, *sodC2* y *katN*, y mutantes por integración de vector (VIM) de *sodC2* y *katN*. Los análisis de expresión en cultivo axénico mostraron patrones diferenciales de regulación frente a distintos estresores oxidativos y condiciones de pH, destacando la elevada actividad basal de *sodA2* y la respuesta del locus *sodC1C2* que codifica para proteínas periplasmáticas. Posteriormente, los ensayos de co-cultivo con *A. castellanii* Neff revelaron que el ambiente intracelular activa de manera diferencial los sistemas antioxidantes de la bacteria. En particular, *sodA2* presentó una actividad transcripcional robusta y sostenida durante la interacción, mientras que *sodB* mantuvo niveles de expresión bajos. Por otra parte, el análisis de las mutantes indicó que la contribución fisiológica de estas enzimas no depende exclusivamente de su regulación transcripcional. La inactivación de *katN* afectó tempranamente el crecimiento bacteriano durante la interacción con la ameba, mientras que la interrupción de *sodC2* comprometió la adaptación en etapas posteriores. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la maquinaria antioxidante de *S. maltophilia* Sm18 participa de manera coordinada y diferencial en la respuesta al estrés oxidativo intracelular. Este sistema constituye un mecanismo adaptativo clave para la supervivencia y persistencia bacteriana dentro de compartimientos fagosomales.

Abstract

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunistic pathogen capable of surviving intracellularly within the amoeba *Acanthamoeba castellanii*, where it faces a dynamic phagosomal microenvironment characterized by multiple adverse conditions, including oxidative stress. The ability to counteract this stress through specialized antioxidant systems could be crucial for intracellular persistence. In this context, the aim of this work was to perform a functional analysis of the superoxide dismutases (SODs) and the catalase KatN from the *S. maltophilia* Sm18 strain to determine their role in tolerance to intracellular oxidative stress. To achieve this, transcriptional fusions of the *sodA2*, *sodB*, *sodC1*, *sodC2* and *katN* loci were constructed in the vector pSEVA337-mScarlet3, alongside vector integration mutants (VIM) for *sodC2* and *katN*. Expression analyses in axenic culture showed differential regulation patterns in response to different oxidative stressors and pH conditions, highlighting the high basal activity of *sodA2* and the response of the *sodC1C2* locus, which encodes periplasmic proteins. Subsequently, co-culture assays with *A. castellanii* Neff revealed that the intracellular environment differentially activates the bacterial antioxidant systems. Notably, *sodA2* exhibited robust and sustained transcriptional activity during the interaction, whereas *sodB* maintained low expression levels. On the other hand, mutant analysis indicated that the physiological contribution of these enzymes does not rely exclusively on their transcriptional regulation. The inactivation of *katN* early affected bacterial growth during the interaction with the amoeba, while the disruption of *sodC2* compromised adaptation at later stages. Altogether, our results demonstrate that the antioxidant machinery of *S. maltophilia* Sm18 participates in a coordinated and differential manner in response to intracellular oxidative stress. This system constitutes a key adaptive mechanism for bacterial survival and persistence within phagosomal compartments.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	10
1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> como modelo para el estudio del estrés oxidativo y la adaptación bacteriana a ambientes contrastantes.....	10
1.2 Modelo de interacción con <i>Acanthamoeba castellanii</i> para estudiar la respuesta oxidativa y la relación bacteria-hospedero	12
1.2.1 Amebas de vida libre (AVL)	12
1.2.2 <i>Acanthamoeba castellanii</i> como reservorio de bacterias	14
1.2.3 NADPH oxidasas (NOXes) y estrés oxidativo en fagocitos profesionales: de amebas de vida libre a neutrófilos y macrófagos.....	16
1.2.4 <i>A. castellanii</i> codifica para dos NOXes (NOXA y NOXC): evidencia filogenómica y estructural	19
1.3 Mecanismos bacterianos de defensa contra ROS: Superóxido dismutasas y catalasas.....	20
1.3.1 Superóxido dismutasas (SODs).....	21
1.3.2 Catalasas (KAT): estructura, clasificación y función en la defensa antioxidante.	24
1.4 Interacción entre <i>S. maltophilia</i> – <i>Acanthamoeba</i>	28
1.4.1 Repertorio de superóxido dismutasas y catalasas en <i>S. maltophilia</i> Sm18: sistemas defensivos ante el estrés oxidativo.	28
2. HIPÓTESIS	35
3. OBJETIVO	36
3.1 Objetivo general	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	38
4.2 Condiciones de cultivo de <i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff.	38
4.3 Generación de fusiones transcripcionales.....	39
4.4 Generación de mutantes por integración de vector (VIM).	40
4.5 Cinética de fluorescencia y crecimiento microbiano.	41
4.6 Análisis gráfico de la fluorescencia y la cinética del crecimiento.	42
4.7 Evaluación cuantitativa de la replicación intracelular de <i>S. maltophilia</i> Sm18 en co-cultivo con <i>A. castellanii</i> Neff.	43
4.8 Ensayo de co-cultivo de <i>A. castellanii</i> Neff - <i>S. maltophilia</i> Sm18 para el análisis de la interacción intracelular mediante microscopía de células vivas (LCI).	44

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de bisulfito sódico de menadiona y peróxido de hidrógeno en <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Sm18.....	45
5.2 Análisis de fusiones transcripcionales en cultivo axénico: Sm18/sodA2, Sm18/sodB, Sm18/sodC1C2 y Sm18/katN.....	49
5.2.1 Respuesta transcripcional de fusiones SOD de <i>S. maltophilia</i> Sm18 frente a estrés oxidativo inducido por MSB.....	49
5.2.2 Efecto del pH y agentes oxidantes sobre la expresión de las fusiones Sm18/sodC1C2 y Sm18/katN.....	53
5.3 Análisis cuantitativo de la replicación intracelular de <i>S. maltophilia</i> Sm18 en co-cultivo con <i>A. castellanii</i> Neff.	58
5.3.1 Fusiones transcripcionales	58
5.3.2 Mutantes por integración de vector.	61
5.4 Análisis de la interacción intracelular entre <i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Sm18 mediante microscopía de células vivas (LCI).	64
6. CONCLUSIONES	66
7. PERSPECTIVAS.....	68
8. REFERENCIAS	69
9. ÍNDICE DE FIGURAS	82
10. ÍNDICE DE TABLAS	84
11. MATERIAL SUPLEMENTARIO	85

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 *Stenotrophomonas maltophilia* como modelo para el estudio del estrés oxidativo y la adaptación bacteriana a ambientes contrastantes

Stenotrophomonas maltophilia es una Gammaproteobacteria Gram-negativa, aeróbica, no fermentadora de glucosa, presente de manera ubicua en entornos naturales y artificiales que con frecuencia se aísla de fuentes de agua dulce y residual, suelos, sedimentos, superficies húmedas y rizosfera de plantas, donde forma parte de comunidades microbianas complejas asociadas a procesos ecológicos dinámicos, como la colonización de superficies, formación de biofilms y la persistencia en ecosistemas degradados o antropizados, además de diversos hospedadores animales (Chauviat *et al.*, 2023; Erinmez *et al.*, 2024; Kalidasan *et al.*, 2018; Mikhailovich *et al.*, 2024). Esta distribución ubicua refleja una elevada plasticidad fisiológica y una notable capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes.

Esta bacteria ha sido identificada como un componente activo de la microbiota asociada a diversos cultivos, donde influye en la dinámica microbiana local, la movilización de nutrientes y la producción de compuestos bioactivos, lo que sugiere un posible papel en la promoción del crecimiento vegetal y en el control biológico de fitopatógenos (Alexander *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2024, 2025). Asimismo, su capacidad para formar biofilms sobre sustratos naturales y artificiales contribuye a su resiliencia frente a fluctuaciones ambientales y favorece su persistencia en entornos sometidos a presión antropogénica, como plantas de tratamiento de agua y redes de distribución de agua potable (García *et al.*, 2023; Pompilio, Ranalli, *et al.*, 2020; Pompilio, Savini, *et al.*, 2020; T. Zhang *et al.*, 2024). *S. maltophilia* también ha sido detectada en suelos contaminados, donde su presencia se ha asociado con procesos de biodegradación de compuestos orgánicos persistentes y con tolerancia a metales pesados, lo que ha despertado interés en su potencial biotecnológico para aplicaciones de biorremediación (Farooq *et al.*, 2025; Hernández Castellanos *et al.*, 2021; Pages *et al.*, 2008; Ramakrishnan *et al.*, 2023).

Esta plasticidad ambiental subyace a su relevancia clínica. Ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los patógenos oportunistas multirresistentes prioritarios, involucrada en infecciones nosocomiales como bacterimia, endocarditis, neumonía, meningitis, infecciones del tracto respiratorio, del torrente sanguíneo y afecciones de la piel y tejidos blandos, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (Chang *et al.*, 2015; Kalidasan *et al.*, 2018; Rello *et al.*, 2019). Su éxito como patógeno se ve reforzado por una resistencia intrínseca a diversos agentes antimicrobianos, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima y tetraciclinas, atribuida a la presencia de β -lactamasas cromosómicas inducibles, a la expresión de bombas de eflujo de diversas familias y a la baja permeabilidad de su membrana externa. A su vez, la adquisición de mecanismos adicionales de resistencia, mediante la transferencia de genes asociados a integrones, transposones y elementos móviles cromosomales, reduce significativamente las opciones terapéuticas contra esta bacteria (Trifonova & Strateva, 2019).

Más allá de su papel como patógeno humano, *S. maltophilia* es capaz de sobrevivir en macrófagos de la médula ósea de murinos y es miembro de la microbiota core específica de las criptas colónicas de mamíferos (Pedron *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2020). Además, estudios recientes mostraron que pertenece a las bacterias resistentes a las amebas (ARB, por sus siglas en inglés, *Amoeba-Resistant Bacteria*) o a los endocitobiontes bacterianos, capaces de resistir la fagocitosis e incluso de multiplicarse dentro de amebas de vida libre (AVL). Estos trabajos también han evidenciado que *S. maltophilia* posee un nicho de replicación alternativo en AVL. Esto la posiciona como un modelo relevante para el estudio de mecanismos ancestrales de adaptación a la vida intracelular bajo condiciones hostiles, como la restricción de nutrientes esenciales, control estricto de metales de transición y una elevada presión oxidativa, características de los compartimientos fagocíticos del hospedero (Cateau *et al.*, 2014; Denet *et al.*, 2017; Healy *et al.*, 2021; Monteith & Skaar, 2021; Rivera *et al.*, 2024; Sanguino-Jorquera *et al.*, 2022).

En este contexto, la capacidad de *S. maltophilia* para mantener la homeostasis metálica se ha identificado como un determinante clave de su adaptación a diversos ambientes y nichos intracelulares. En particular, la disponibilidad de hierro regula procesos fisiológicos centrales, incluyendo la formación de biopelículas, la respuesta al estrés oxidativo, la expresión de proteínas de membrana y factores asociados a la virulencia a través del regulador Fur, lo que sugiere una relación entre la regulación de metales y la defensa antioxidante (Garcia *et al.*, 2015; Kalidasan *et al.*, 2018). De forma complementaria, un estudio reciente de Argueta-Zepeda *et al.* (2026) demostró que el regulador transcripcional MntR controla un miniregulón involucrado en la captación, exportación y homeostasis del manganeso. Este incluye componentes extracitoplasmáticos previamente no caracterizados en *S. maltophilia* y que esta red afecta de manera directa su capacidad de sobrevivir y replicar dentro de fagosomas de *A. castellanii*, un ambiente intracelular caracterizado por restricción nutricional, control metálico y estrés oxidativo, procesos centrales de la inmunidad nutricional del hospedero (Egan *et al.*, 2024; C. A. Lopez & Skaar, 2018).

En conjunto, sus capacidades de resistencia, adaptación redox, homeostasis metálica y supervivencia intracelular posicionan a *S. maltophilia* como un modelo útil para investigar las respuestas al estrés oxidativo y los determinantes que modulan su persistencia en células fagocíticas.

1.2 Modelo de interacción con *Acanthamoeba castellanii* para estudiar la respuesta oxidativa y la relación bacteria-hospedero

1.2.1 Amebas de vida libre (AVL)

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos sin pared celular, ampliamente distribuidos en la naturaleza, que suelen alimentarse de bacterias, hongos y otros protistas, los cuales son internalizados mediante fagocitosis y metabolizados en vacuolas específicas (Balczun & Scheid, 2017; Choaji *et al.*, 2025). Además, existen cuatro géneros asociados con enfermedades humanas —*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinia diploide*— que tienen un impacto clínico importante por su implicación en infecciones oportunistas y no

oportunistas que afectan el sistema nervioso central (SNC), los pulmones, los senos nasales y la córnea, especialmente en humanos inmunodeprimidos (Bellini *et al.*, 2022; Visvesvara *et al.*, 2007).

Estos protistas cambian de una fase trofozoítica móvil a una fase quística inmóvil ante la inanición, la sequedad, la hipoxia y las fluctuaciones de temperatura (Bernard *et al.*, 2022; Salah *et al.*, 2009). La forma trofozoíta, por su parte, corresponde al estado vegetativo en el que las AVL se encuentran metabólicamente activas, con capacidad de movimiento, alimentación y reproducción. No obstante, bajo condiciones ambientales desfavorables, estas entran en el proceso de enquistamiento, mediante el cual las AVL se diferencian del estado trofozoíto al de quiste, una forma de reposo que actúa como mecanismo de protección y favorece su supervivencia. Este proceso es reversible; cuando las condiciones vuelven a ser óptimas, estas células excistan y vuelven al estado de trofozoíto (Bornier *et al.*, 2021; Denet *et al.*, 2017).

Mediante ensayos de co-cultivo y enfoques de metagenómica (Delafont *et al.*, 2013) se ha demostrado que, aunque la mayoría de los microorganismos fagocitados en los fagolisosomas son degradados, diversas especies bacterianas son capaces de evadir este desenlace en distintos protozoos, incluidos los amebozoos y otras AVL (Denet *et al.*, 2017; Rayamajhee *et al.*, 2022).

Una vez internalizadas, algunas de estas bacterias pueden adaptarse a la vida intracelular, lo que les confiere múltiples ventajas: acceso a condiciones óptimas para su crecimiento, protección frente a factores ambientales adversos y la capacidad de dispersarse en el entorno mediante el transporte pasivo a través de sus hospederos (Scheid, 2014). Además, algunas de ellas se vuelven más virulentas y resistentes a los biocidas y a los antibióticos tras su paso por las amebas (Bernard *et al.*, 2022). Este proceso se relaciona con un mayor contenido génico y de ADN en las bacterias resistentes a las amebas en comparación con sus parientes adaptados a otros hospedadores, lo que sugiere procesos de transferencia génica tanto alopátrica como simpátrica.

A su vez, hay bacterias que emplean diversas estrategias para manipular el tráfico vesicular y así impedir la fusión de las vacuolas que contienen patógenos con los lisosomas (Mou & Leung, 2018; Van der Henst *et al.*, 2018). La adaptación a las AVL actuaría como un entorno de “entrenamiento”, permitiendo a los patógenos desarrollar mecanismos para resistir posteriormente a los macrófagos, los cuales, pese a su distancia evolutiva, comparten estrategias depredadoras como la fagocitosis y la degradación en fagolisosomas (Bertelli & Greub, 2012; Guimaraes *et al.*, 2016).

Las cepas silvestres de *Acanthamoeba* suelen albergar un microbioma intracelular que incluye distintos endosimbiontes, así como bacterias que aprovechan a *Acanthamoeba* como nicho secundario para su replicación y supervivencia en condiciones ambientales adversas, como es el caso de *Legionella* y *Vibrio*. En consecuencia, *Acanthamoeba* actúa como un reservorio ambiental de bacterias patógenas oportunistas (Konig *et al.*, 2019; Maita *et al.*, 2018; Van der Henst *et al.*, 2016).

1.2.2 *Acanthamoeba castellanii* como reservorio de bacterias

La Sociedad Internacional de Protozoólogos propuso una revisión taxonómica en la que las AVL fueron agrupadas en dos supergrupos principales. Con base a esta clasificación, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* se integran dentro del supergrupo *Amoebozoa*, específicamente en la familia *Acanthamoebidae*. Por otro lado, *Naegleria fowler* fue ubicada en el supergrupo *Excavata*, en la clase *Heterolobosia* y en la familia *Vahlkampfiidae*. Finalmente, *Sappinia* también forma parte del supergrupo *Amoebozoa*, pero se clasifica en la clase *Flabellinea* y pertenece a la familia *Thecamoebidae* (Adl *et al.*, 2005; Balczun & Scheid, 2017).

El género *Acanthamoeba* fue identificado por primera vez como contaminante en un cultivo de levaduras por Castellani (1930) y, desde entonces, se ha aislado en una amplia variedad de ambientes, como el suelo, el polvo, el aire, el agua de grifo, el mar, los lentes de contacto, entre otros (Grechnikova *et al.*, 2022). Este grupo representa las AVL facultativamente parasitarias más conocidas, cuya patogenicidad varía más por su especie o cepa que por su morfología (Balczun &

Scheid, 2017). Es ampliamente reconocido por su papel como patógeno humano, ya que puede causar una infección ocular potencialmente grave denominada queratitis por *Acanthamoeba*, así como infecciones graves en los pulmones o en los senos paranasales y encefalitis amebial granulomatosa, una enfermedad del sistema nervioso central (Matthey-Doret *et al.*, 2022; Visvesvara *et al.*, 2007).

Dentro de este género, *A. castellanii* es una de las especies más estudiadas y se utiliza como modelo experimental para analizar mecanismos de patogenicidad, la interacción patógeno-hospedero y la resistencia a condiciones ambientales adversas. Además, al igual que muchas AVL, actúa como depredador y reservorio ambiental de diversas especies bacterianas, fúngicas y virales (Clarke *et al.*, 2013; Guimaraes *et al.*, 2016). Como se ha descrito anteriormente, los microbios resistentes a la depredación por amebas emplean múltiples mecanismos para manipular el tráfico vesicular e impedir la fusión de las vacuolas que contienen patógenos (PCVs, por sus siglas en inglés, *Pathogen-Containing Vacuoles*) con los lisosomas. Dichos mecanismos de manipulación del tráfico de membranas son complejos, específicos de cada especie y, en muchos casos, aún no han sido descritos en la mayoría de las bacterias que habitan en los PCVs de *Acanthamoeba* (Konig *et al.*, 2019; Nugraha *et al.*, 2023; Rayamajhee *et al.*, 2022).

Aunque la biología celular de *A. castellanii* ha sido menos estudiada que la de otros modelos, como *Dictyostelium discoideum*, se ha descrito que esta ameba posee un amplio y diverso repertorio de GTPasas Rab, esenciales para el tráfico vesicular. Entre ellas, Rab7 destaca por su función en la maduración del fagosoma y su conexión con la ruta lisosomal (Bozzaro, 2019; Dunn *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2023; Porfirio-Sousa *et al.*, 2022). Análisis filogenómicos recientes sobre la cepa *Neff* identificaron 11 homólogos de Rab7, de los cuales la mayoría correspondía a variantes no canónicas. Tras una corrección de la anotación génica, se identificó el verdadero ortólogo de Rab7A, consolidándolo como un componente clave de la maquinaria vesicular endocítica de *A. castellanii* (Rivera *et al.*, 2024).

1.2.3 NADPH oxidasas (NOXes) y estrés oxidativo en fagocitos profesionales: de amebas de vida libre a neutrófilos y macrófagos

La interacción entre células eucariotas y microorganismos se remonta al origen de los primeros protozoos, hace más de 2.500 millones de años. A lo largo de la evolución, los organismos multicelulares desarrollaron la inmunidad innata, un sistema de defensa ancestral basado en células fagocíticas especializadas —como neutrófilos y macrófagos— capaces de reconocer, migrar hacia (quimiotaxia) y eliminar patógenos mediante la fagocitosis (Metzemaekers *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021).

Entre los mecanismos efectores de la inmunidad innata, uno de los procesos más conservados y eficaces es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*) durante la eliminación de microorganismos fagocitados (Kruger *et al.*, 2015; Van Acker & Coenye, 2017). Este estallido oxidativo es llevado a cabo por el complejo multiproteico de la NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa), conocido como NOXs (del inglés, *NADPH oxidases*), un conjunto de proteínas transmembranales especializadas que transfieren electrones desde el NADPH hacia el oxígeno (Bedard & Krause, 2007; El-Benna *et al.*, 2016), generando el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como producto específico.

Durante la fagocitosis, el oxígeno molecular (O_2) consumido por la NOX dentro de la vacuola fagocítica se reduce a $O_2^{\cdot-}$ de forma espontánea o mediante la acción de enzimas, como las superóxido dismutasas, que generan otras especies oxidantes altamente reactivas, creando un ambiente tóxico que contribuye a la inactivación y eliminación del patógeno. Además, la actividad de la NOX modifica el pH intrafagosomal mediante la liberación de protones, lo que favorece la acción de las proteasas que degradan el microorganismo ingerido. No obstante, las ROS derivadas de NOX, aunque fundamentales para la defensa del hospedero, también pueden causar daño colateral a la propia célula activada y a los tejidos circundantes, lo que subraya la importancia de una regulación precisa de este sistema (Martinvalet & Walch, 2021; Schroder, 2019).

Las ROS —como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)— son moléculas altamente reactivas derivadas del O_2 que pueden causar daño oxidativo en proteínas, lípidos, ADN y ARN, provocando daño en la membrana, pérdida de actividad enzimática, interrupción de la replicación del ADN y mutaciones (Islam *et al.*, 2022).

El anión $O_2^{\bullet-}$ desestabiliza clústeres Fe-S, aumenta el hierro redox-activo y causa la metalación incorrecta de enzimas dependientes de Fe (Gu & Imlay, 2013; Sobota *et al.*, 2014). Además, sirve como precursor de otras especies oxidantes. En fagocitos de mamíferos, el $O_2^{\bullet-}$ reacciona rápidamente con el óxido nítrico (NO) generado por la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) para producir peroxinitrito ($ONOO^-$), un oxidante altamente reactivo que daña proteínas, ADN y centros metálicos, y cuya forma protonada atraviesa membranas (Bartlesaghi & Radi, 2018; Wang *et al.*, 2018). El $O_2^{\bullet-}$ también puede dismutarse a H_2O_2 , que se difunde a través de membranas y participa en reacciones de Fenton generando radicales hidroxilo ($\bullet OH$) (Hayyan *et al.*, 2016). En neutófilos, el H_2O_2 es convertido por la mieloperoxidasa en ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante con efectos proteotóxicos y genotóxicos. En conjunto, estas transformaciones posicionan al $O_2^{\bullet-}$ como el punto de partida clave para la generación de especies reactivas responsables de la actividad microbicida del sistema inmune (Schatzman & Culotta, 2018).

En los fagocitos profesionales de mamíferos, la producción de estos intermediarios reactivos del oxígeno depende estrictamente del ensamblaje ordenado del complejo NOX. Esta regulación es esencial, ya que una vez activado, este produce rápidamente grandes cantidades de ROS (Schroder, 2019; B. Zhang *et al.*, 2022).

En los fagocitos en reposo, la NADPH oxidasa permanece desensamblada e inactiva. Su núcleo catalítico, el flavocitocromo b558 —formado por gp91^{phox} (también llamado Nox2) y p22^{phox}— se localiza en la membrana plasmática y en compartimientos vesiculares. En el citoplasma se encuentran los componentes reguladores p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y Rac1/2 que forman un complejo estable

encargado de coordinar la activación del sistema. Durante la señalización, estos módulos citosólicos se translocan hacia las membranas donde reside el flavocitocromo, ensamblando el complejo activo que impulsa la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Nguyen *et al.*, 2017; Ziegler *et al.*, 2019; Figura 1).

Se ha demostrado que diversas AVL, como *Dictyostelium discoideum* o *Naegleria gruberi* (Jauslin *et al.*, 2021; Sumimoto, 2008), también codifican enzimas NOX que participan en la generación de ROS durante procesos asociados a la fagocitosis. Esto demuestra que la capacidad de producir especies reactivas mediante sistemas dependientes de NADPH está ampliamente distribuida entre los eucariotas unicelulares. Esta presencia en AVL resulta relevante al considerar su interacción con microorganismos ingeridos, ya que contribuye a generar entornos oxidativos dentro de las vacuolas fagocíticas, comparables a los que se producen en otros fagocitos profesionales, como los macrófagos y los neutrófilos.

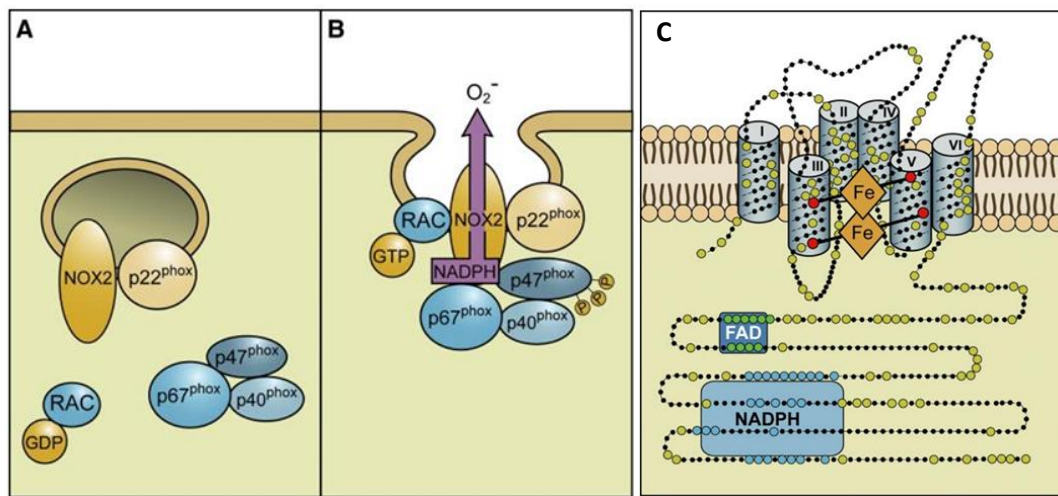


Figura 1. Ensamblaje y arquitectura funcional del complejo NADPH oxidasa NOX2. A) En células fagocíticas en reposo, la subunidad transmembranal NOX2 se encuentra asociada a p22^{phox} en vesículas intracelulares, mientras que las subunidades citosólicas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y Rac permanecen inactivas en el citoplasma. B) La fagocitosis induce el intercambio de GDP por GTP en Rac y la fosforilación de p47^{phox}, promoviendo el reclutamiento de las subunidades citosólicas y el ensamblaje del complejo activo en la membrana. Una vez formado, NOX2 transfiere electrones desde el NADPH al oxígeno, generando superóxido ($O_2^{\cdot-}$). C) Modelo estructural propuesto para la región central de las NADPH oxidasas. Todas las NOX poseen seis dominios transmembranales conservados y dos grupos hemo coordinados por histidinas en los dominios III y V. El extremo citosólico contiene los sitios de unión a FAD y NADPH, que permiten el flujo secuencial de electrones desde NADPH → FAD → hemo interno → hemo externo → oxígeno. Tomado de Bedard and Krause (2007).

1.2.4 *A. castellanii* codifica para dos NOXes (NOXA y NOXC): evidencia filogenómica y estructural

Análisis filogenómicos y de genómica comparativa en curso (Vinuesa, datos sin publicar) han revelado que los genomas de las cepas *A. castellanii* Neff y C3 contienen, cada uno, dos genes que codifican NADPH-oxidasas (NOXs). Estos NOXs se agrupan en clados monofiléticos bien definidos junto con las proteínas NoxA/NoxB y NoxC de *Dictyostelium discoideum*, lo que sugiere que estas amebas ambientales poseen un repertorio de oxidasa conservado evolutivamente y potencialmente funcional en procesos de defensa celular (Dunn *et al.*, 2017; Remacle-Bonnet *et al.*, 1973).

En *D. discoideum*, la NoxA ha sido objeto de diversos estudios funcionales en los que se ha demostrado que participa en la permeabilización de la membrana de *Klebsiella pneumoniae* fagocitada, contribuyendo a su eliminación junto con el pH ácido del fagolisosoma (Crespo-Yanez *et al.*, 2023; Jauslin *et al.*, 2021). Además, NoxA es necesaria para la lisis extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* que no llega a ser internalizada, lo que resalta su papel central en la defensa antimicrobiana de esta ameba modelo (Ayadi *et al.*, 2024).

En conjunto, tanto la literatura reciente (Hay *et al.*, 2025) como los análisis filogenómicos y estructurales (Vinuesa, datos sin publicar) respaldan la hipótesis de que los fagosomas de *A. castellanii* Neff ejercen presión de estrés oxidativo sobre las bacterias fagocitadas mediante la actividad de una o más NADPH oxidasas, probablemente a través de la acción directa de NOXA_NEFF2 (Figura 2).

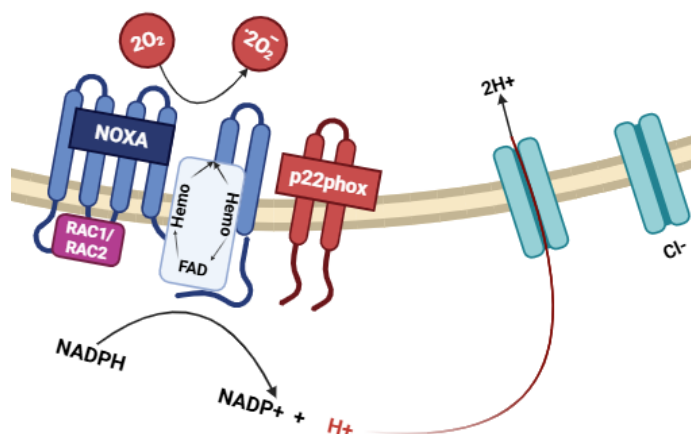


Figura 2. Complejo NOXA_NEFF2. Representación del complejo NOXA_NEFF2 en *A. castellanii* Neff construido en base a análisis filogenómicos, genómica comparativa y evidencia compilada por el Dr. Pablo Vinuesa. La figura resume el mecanismo propuesto para la generación de $O_2^{\bullet-}$ en *A. castellanii* Neff.

1.3 Mecanismos bacterianos de defensa contra ROS: Superóxido dismutasas y catalasas.

La evolución de organismos aeróbicos capaces de prosperar en ambientes ricos en oxígeno ha requerido el desarrollo de mecanismos eficaces para defenderse frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas a partir de reducciones del O_2 (Islam *et al.*, 2022; Zelko *et al.*, 2002).

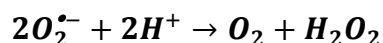
Como se ha mencionado en apartados anteriores, en el sistema inmunitario, células fagocíticas profesionales desencadenan una producción masiva de $O_2^{\bullet-}$, y otros intermediarios reactivos del oxígeno, mediante el estallido oxidativo, con el fin de neutralizar a los microorganismos que atraviesan la barrera epitelial (Broxton & Culotta, 2016; Frye *et al.*, 2022). De manera análoga, las AVL emplean sistemas generadores de ROS durante la fagocitosis, lo que genera un entorno intracelular fuertemente oxidante que contribuye a la eliminación de presas microbianas. En este escenario, los patógenos se enfrentan a una presión selectiva intensa y deben adaptarse para resistir o evadir la respuesta oxidativa del hospedador. (Jauslin *et al.*, 2021; Rivera *et al.*, 2024; Sanguino-Jorquera *et al.*, 2022; Sumimoto, 2008). Así, ya sea que el superóxido se genere endógenamente como subproducto metabólico, o exógenamente como parte de la defensa del huésped, éste representa una amenaza significativa para la integridad celular y tanto el huésped como el patógeno

requieren sistemas de defensa especializados para protegerse contra esta amenaza (Frye *et al.*, 2022).

Las superóxido dismutasas (SODs, por sus siglas en inglés, *Superoxide Dismutases*) contribuyen la principal línea de defensa enzimática frente al estrés oxidativo, actuando de manera específica sobre el $O_2^{\bullet-}$ y catalizando su conversión en especies menos reactivas mediante otras enzimas dentro de la célula, como las catalasas y peroxidasas (Miller, 2012; Sheng *et al.*, 2014). En el marco de este trabajo, el análisis se enfocará particularmente en las superóxido dismutasas y las catalasas.

1.3.1 Superóxido dismutasas (SODs).

Las SODs son metaloenzimas antioxidantes presentes en casi todos los organismos aeróbicos. Su función principal es catalizar la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$, transformándolo en O_2 y H_2O_2 (Gulcin, 2025; Kodirov, 2025). Estas enzimas constituyen un componente central de los sistemas de detoxificación de ROS, ya que limitan la acumulación intracelular de $O_2^{\bullet-}$ y previenen el daño oxidativo (Ighodaro, 2018; Sheng *et al.*, 2014). Este proceso es mucho más rápido. La reacción catalizada por las SODs sigue el siguiente mecanismo:



En donde el metal catalítico, dependiendo del tipo SOD, alterna entre dos estados redox para facilitar la desproporción secuencial de dos equivalentes de superóxido. En la primera semirreacción, el metal se reduce por $O_2^{\bullet-}$ generado por O_2 , en la segunda, el metal reducido transfiere electrones al segundo $O_2^{\bullet-}$ para formar H_2O_2 , cerrando el ciclo catalítico (Abreu & Cabelli, 2010; Sheng *et al.*, 2014)

La especificidad catalítica de las SOD está determinada por la naturaleza del centro metálico que coordina el sitio activo, el cual facilita los eventos de oxidación-reducción que permiten la dismutación del $O_2^{\bullet-}$. El estudio exhaustivo de estas enzimas ha permitido identificar múltiples familias de SOD, diferenciadas por el tipo de cofactor metálico que emplean y por sus funciones especializadas en la biología redox (Case, 2017). La necesidad evolutiva de eliminar esta especie tóxica dio lugar

a la aparición independiente de enzimas capaces de catalizar su dismutación en diversos linajes, lo que refleja un proceso de convergencia funcional (Miller, 2012). Sin embargo, aunque las SOD pueden coordinar distintos iones metálicos, la sustitución de un cofactor por otro fuera del rango permitido generalmente resulta en una enzima inactiva, ya que cada familia requiere ajustar finamente el potencial redox del centro catalítico para que coincida con el potencial de reducción necesario durante el ciclo catalítico (Schatzman & Culotta, 2018).

En la actualidad se reconocen tres familias estructurales de SOD, definidas por el metal que emplean para su actividad enzimática: las Cu/Zn-SOD, que utilizan cobre (Cu) como centro redox y zinc (Zn) como estabilizador estructural; las Fe/Mn-SOD, que pueden funcionar con hierro (Fe) o manganeso (Mn); y las Ni-SOD, cuya actividad depende del níquel (Ni) (Frye *et al.*, 2022; T. Liu *et al.*, 2025). A pesar de esta clasificación funcional, la especificidad metálica no siempre refleja el origen evolutivo, ya que, por ejemplo, las Fe-SOD y Mn-SOD pertenecen a un mismo linaje estructural, mientras que las Cu-Zn-SOD y las Ni-SOD derivan de linajes estructurales independientes (Case, 2017; Harada *et al.*, 2021; Sheng *et al.*, 2014).

La evidencia geoquímica y filogenética sugiere que las primeras SOD utilizaban hierro como cofactor, en concordancia con la abundante disponibilidad de Fe (II) en los océanos primordiales (Miller, 2012; Schatzman & Culotta, 2018). A partir de esta familia ancestral surgieron las enzimas dependientes de Mn y, en algunos casos, SODs “cambialíticas” capaces de funcionar con Fe o Mn (Frye *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2017). Estas últimas generalmente presentan una actividad catalítica reducida, ya que su centro activo no logra calibrar de forma óptima el potencial redox de ambos metales (Barwinska-Sendra *et al.*, 2020; Sheng *et al.*, 2014).

La distribución biológica de las SOD es prácticamente universal: se han identificado en bacterias, arqueas y eucariotas, e incluso en algunos genomas virales, lo que subraya la presión evolutiva ejercida por la presencia ubicua del $O_2^{\cdot-}$ en sistemas aerobios (Lartigue *et al.*, 2015). Además de las clases, el número de SODs varían entre organismos. Por ejemplo, hay tres SOD en *Escherichia coli*, dos

en *Staphylococcus aureus* y uno en *Streptococcus thermophiles* (Garcia *et al.*, 2017; Jair *et al.*, 2019). Dado que el $O_2^{\cdot-}$ no se difunde libremente a través de la membrana, cada compartimiento celular requiere una SOD propia, lo que ha favorecido la diversificación espacial y funcional de estas metaloenzimas. En bacterias patógenas, por ejemplo, las Mn-SOD y Fe-SOD suelen localizarse en el citosol (codificadas por *sodA* y *sodB*, respectivamente), mientras que las Cu/Zn-SOD (codificadas por *sodC*) residen casi exclusivamente en el espacio periplásmico o extracitoplasmático, en concordancia con la estricta exclusión del cobre del citosol bacteriano (Jair *et al.*, 2019; Najmuldeen *et al.*, 2019). Estas SOD periplásmicas son especialmente importantes en la interacción hospedero-patógeno, ya que neutralizan el $O_2^{\cdot-}$ generado por las NOX del hospedero durante la respuesta inmune (Arguello *et al.*, 2013; Ladomersky & Petris, 2015).

Estos mecanismos de defensa antioxidante han sido ampliamente documentados en múltiples patógenos. En el caso de las SODs dependientes de Mn (SodA y SodB), un estudio en *Aeromonas hydrophila* mostró que la inhibición de la expresión de *sodA* y *sodB* redujo significativamente la supervivencia intracelular en macrófagos de pez zebra, lo que provocó un aumento de ROS en los fagocitos, evidenciando la contribución de ambas isoenzimas a la resistencia frente al estrés oxidativo, actuando de forma complementaria y crítica (M. Zhang *et al.*, 2019). Para las SOD periplásmicas, como SodC, se ha caracterizado una Cu/Zn-SOD funcional en *Coxiella burnetii*, activa a pH bajo y capaz de restaurar la resistencia a H_2O_2 en una mutante de *Escherichia coli* que carece de SodC, lo que indica que estas enzimas contribuyen a la detoxificación de ROS en ambientes hostiles, como los fagosomas de los macrófagos (Brennan *et al.*, 2015). Aunque muchos estudios clásicos sobre SodC se basan en *Salmonella*, esta evidencia en *C. burnetii* respalda el papel de las SODs periplásmicas como factores de virulencia y como defensa frente a ROS.

De este modo, las SOD no sólo representan la primera barrera enzimática frente al $O_2^{\cdot-}$, sino que también actúan como elementos integradores dentro de las

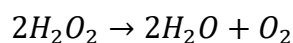
redes celulares de homeostasis redox, modulando el flujo de especies reactivas y condicionando la respuesta fisiológica frente al estrés oxidativo.

1.3.2 Catalasas (KAT): estructura, clasificación y función en la defensa antioxidante.

La conversión de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 por las SODs es clave para limitar la acumulación de $O_2^{\bullet-}$ y la consecuente generación de ROS secundarias. Sin embargo, este radical puede dismutarse espontáneamente a $H_2O_2 + O_2$ —proceso que no requiere enzimas y cuya velocidad aumenta en pH ácido, como ocurre dentro de fagosomas en macrófagos y otros fagocitos—; además de ser catalizado por las SODs, este proceso aporta una vía alternativa para la producción de H_2O_2 (Piacenza *et al.*, 2019). Este H_2O_2 , debido a su alta permeabilidad a través de membranas biológicas, requiere una segunda línea de defensa antioxidante: las catalasas (Kat), cuya nomenclatura deriva de los genes bacterianos *kat* que las codifican, y otras peroxidasas. Estas enzimas descomponen el H_2O_2 y previenen su participación en reacciones Fenton que generan $\bullet OH$, la especie oxidante más destructiva para la célula (Hansberg, 2022; M. B. Lopez *et al.*, 2024). En este contexto, las Kat constituyen el sistema principal encargado de eliminar H_2O_2 a niveles moderados y elevados.

La catalasa es una oxidorreductasa hemo-dependiente ampliamente distribuida en organismos aeróbicos y altamente conservada, que cataliza la descomposición del H_2O_2 en agua (H_2O) y oxígeno (O_2), proceso esencial para mantener la homeostasis redox y prevenir daño oxidativo. Esta función ha sido ampliamente documentada en estudios recientes que destacan su papel central en la defensa frente al estrés oxidativo y en la preservación de la integridad celular.

La reacción global que realiza la catalasa es:



En este proceso, una molécula de H_2O_2 actúa como oxidante y la otra como reductora, realizando una pseudodismutación en la que el grupo hemo oscila entre los estados Fe(III) y Fe(IV)=O evitando su descomposición no enzimática.

Además, la distribución subcelular de la catalasa no es universalmente fija: aunque suele asociarse a peroxisomas en eucariotas, investigaciones recientes muestran que también puede localizarse en el citosol e incluso ser relocalizada en respuesta a señales metabólicas o de estrés, lo que evidencia una regulación dinámica de su función antioxidante (Fujiki & Bassik, 2021). Esta plasticidad subcelular sugiere que en contextos de estrés por una producción elevada de H_2O_2 la célula puede redirigir su reserva de catalasa hacia los compartimentos donde es más necesaria.

Asimismo, se ha demostrado que las catalasas participan en la regulación fina del metabolismo celular y en la protección frente a condiciones ambientales adversas. Por ejemplo, su actividad contribuye a la tolerancia al estrés oxidativo inducido por agentes tóxicos y antibióticos, lo que subraya su papel en los mecanismos adaptativos y de supervivencia (Gomes *et al.*, 2022). Adicionalmente, estudios en contextos patológicos, como el cáncer, han puesto de manifiesto que la catalasa puede modular la respuesta tumoral al estrés oxidativo, lo que refuerza su importancia en procesos biomédicos y fisiopatológicos (Glorieux & Buc Calderon, 2024).

Se clasifican en tres clases diferentes de acuerdo a la arquitectura del sitio activo, el cofactor químico y el mecanismo catalítico: i) catalasas monofuncionales (típicas, hemo-containing), ii) catalasas-peroxidasas (bifuncionales, KatG) y iii) catalasas no-hemínicas (Mn-catalasas) (Hansberg, 2022; Yuan *et al.*, 2021).

Las catalasas monofuncionales dependientes de hemo (también conocidas como catalasas tipo KatE o catalasa clásicas) son, en términos generales, tetraméricas y cada subunidad contiene un grupo hemo b que cataliza la descomposición de H_2O_2 . Estas enzimas exhiben una actividad catalítica elevada, muy cercana al límite de difusión, lo que las hace especialmente eficaces frente a picos de H_2O_2 (Hansberg, 2022). Su estructura presenta canales que dirigen el H_2O_2 al sitio activo y mecanismos moleculares que favorecen la exclusión de agua, lo que mejora la reactividad. Estas están ampliamente distribuidas entre bacterias, arqueas y eucariotas (Chelikani *et al.*, 2004). Por ejemplo, en *Ralstonia solanacearum*, un

fitopatígeno de importancia agrícola, la catalasa codificada por *katE* ha sido identificada como una catalasa monofuncional dependiente de hemo cuya expresión es inducida por H_2O_2 y regulada por factores asociados al contacto con el hospedero. Su disrupción reduce la supervivencia de la bacteria bajo estrés oxidativo (Tondo *et al.*, 2020).

Las catalasas-peroxidasas, comúnmente denominadas KatG, son proteínas bifuncionales que combinan las actividades de catalasa y peroxidasa en un mismo polipéptido; filogenéticamente se distinguen de las catalasas típicas y presentan una arquitectura dimérica (Purkan *et al.*, 2018). Estas enzimas no solo dismutan H_2O_2 , sino que también lo utilizan como oxidante en reacciones con sustratos orgánicos, lo que les confiere un papel dual en la detoxificación y en el metabolismo. En patógenos bacterianos, como *Mycobacterium tuberculosis*, KatG desempeña funciones críticas tanto en la protección frente al estrés oxidativo del hospedero como en la activación de profármacos, lo que evidencia su importancia fisiológica y clínica (A. Liu, 2024).

Las catalasas no-hemínicas, o catalasas dependientes de Mn (de tipo KatN), son holoenzimas citoplasmáticas que forman complejos homohexaméricos, en los que cada subunidad contiene un centro binuclear de manganeso, que utilizan como cofactor catalítico en lugar del hemo, involucrado en la reacción de descomposición del H_2O_2 . Aunque menos frecuentes que las catalasas hemo-dependientes, las Mn-catalasas están ampliamente distribuidas en bacterias y arqueas, especialmente en aquellas adaptadas a condiciones ambientales extremas o en las que la disponibilidad de hierro y porfirinas es limitada. Su mecanismo redox alternativo (ciclos $Mn(II, II) \leftrightarrow Mn(III, III)$) las hace menos susceptibles a inactivación por agentes que dañan centros hemínicos y les confiere ventajas selectivas en ciertos nichos ecológicos (Whittaker, 2012; Yuan *et al.*, 2021). Su importancia ha sido demostrada en diversos patógenos bacterianos. En *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, la capacidad competitiva en el intestino inflamado depende de sistemas que capturan Mn a partir de calprotectina del hospedero; este metal es posteriormente empleado como cofactor por KatN y por SODs dependientes de Mn,

contribuyendo a la protección frente al estrés oxidativo (Díaz-Ochoa *et al.*, 2016). En *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), la regulación de esta proteína se encuentra bajo el control de RpoS y OxyR, y es secretada al lumen del fagosoma de macrófagos a través de un sistema de secreción tipo VI (T6SS), donde participa en la neutralización de ROS (Wan *et al.*, 2017). De manera similar, en *Enterobacter cloacae*, KatN también ha sido identificada como un efector dependiente de T6SS, lo que sugiere que este mecanismo de secreción y su función podrían estar conservados entre distintas enterobacterias (Anderson *et al.*, 2023).

Desde la perspectiva funcional aplicada, las diferencias entre tipos de catalasas implican contrastes en cinética y regulación: las monofuncionales son especialmente apropiadas para eliminar H₂O₂ en situaciones de elevada producción súbita —por ejemplo, durante el estallido oxidativo o en reacciones metabólicas intensas—, mientras que las catalasas-peroxidasas, con mayor afinidad por H₂O₂ pero menor $V_{\text{máx}}$ relativo, pueden manejar niveles persistentes o participar en procesos de oxidación de sustratos orgánicos (Nandi *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2022). Las Mn-catalasas, por su parte, representan una alternativa que evita la dependencia de hemo/Fe y resulta ventajosa cuando la química del entorno o el estrés por metales condiciona la disponibilidad de cofactores clásicos (Yuan *et al.*, 2021).

La clasificación estructural y funcional de las catalasas tiene implicaciones directas en la biología de los patógenos y en la fisiología celular. La presencia o ausencia de un tipo concreto de catalasa influye en la capacidad de un microorganismo para tolerar la presión oxidativa del hospedero, condiciona la respuesta a los antibióticos y puede servir como diana terapéutica (Anwar *et al.*, 2024).

La integración funcional entre SODs y catalasas es esencial en los microorganismos expuestos a ROS generadas durante la respuesta inmunitaria del hospedero. Mientras las SOD convierten radicales reactivos en H₂O₂, la catalasa elimina este producto antes de que alcance niveles tóxicos, proporcionando una defensa antioxidante jerárquica y coordinada. La acción integrada de estos sistemas

constituye un requisito fundamental para mantener la homeostasis celular en entornos aerobios y para neutralizar el estrés oxidativo inducido por NOX en el contexto fagocítico.

1.4 Interacción entre *S. maltophilia* – *Acanthamoeba*.

La evidencia evolutiva y estructural expuesta anteriormente sugiere que el anión $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 constituyen las principales ROS presentes en los fagosomas de *A. castellanii*. En este contexto, planteamos que un subconjunto de SODs y catalasas codificadas en el genoma de *Stenotrophomonas maltophilia* desempeñan un papel central en la supervivencia intracelular de esta bacteria dentro de la vacuola que la contiene.

1.4.1 Repertorio de superóxido dismutasas y catalasas en *S. maltophilia* Sm18: sistemas defensivos ante el estrés oxidativo.

Con el fin de contextualizar el repertorio de SODs y KATs de *S. maltophilia* Sm18, se llevó a cabo un análisis filogenómico comparativo que incluyó representantes de *Stenotrophomonas*, y de géneros filogenéticamente relacionados. La figura 3 ilustra los patrones de conservación y diversificación evolutiva de estos sistemas de defensa, evidenciando una marcada variabilidad en el número y el tipo de enzimas antioxidantes entre las distintas especies del género. Dentro de este marco comparativo, la cepa *S. maltophilia* Sm18 se inscribe en un linaje caracterizado por la presencia de múltiples sistemas antioxidantes, lo cual es consistente con su capacidad para persistir en ambientes sujetos a fluctuaciones de las condiciones oxidativas.

Estudios filogenéticos preliminares (Vinuesa, datos sin publicar) indican que el genoma de la cepa modelo *S. maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18) (Vinuesa *et al.*, 2026) se encuentra particularmente bien equipado para enfrentar el estrés oxidativo, ya que codifica un repertorio inusualmente amplio de cinco SODs. Tres de ellas, SodA1, SodA2 y SodB, pertenecientes a las dependientes de Fe/Mn y presentan una probable localización citoplasmática. Las otras dos, SodC1 y SodC2, corresponden a la familia dependiente de Cu/Zinc y una posible ubicación periplasmática por la presencia de péptidos señal y motivos de lipidación. Estas características sugieren que podrían anclarse al peptidoglicano, de forma análoga a lo descrito para SodC1 de *Salmonella Typhimurium* (Tidhar *et al.*, 2015), lo que evitaría su pérdida al medio extracelular en situaciones de daño a la membrana externa, como el inducido por péptidos antimicrobianos presentes en fagolisosomas o liberados al entorno extracelular (Jauslin *et al.*, 2021; Rosales & Uribe-Querol, 2017; Xu *et al.*, 2021).

En Sm18, el gen *sodA1* se encuentra precedido por una secuencia invertida repetida (5' ACCTCAACCAATGTTGAGGT-3') idéntica a la descrita en *S. maltophilia* K279a, la cual ha sido caracterizada como una caja SoxR, implicada en la regulación de varios genes asociados al alivio del estrés oxidativo (Chiang & Schellhorn, 2012). En esta cepa de referencia, *sodA1* es el único gen que codifica una SOD citoplasmática inducible por menadiona, a diferencia de *sodA2* y *sodB*, esto sugiere una regulación diferencial de las SODs intracelulares frente a estrés oxidativo generado por compuestos redox (Jair *et al.*, 2019). No se detectaron genes que codifiquen SODs dependientes de níquel. Las diferencias estructurales entre las familias SOD respaldan la noción de que estas enzimas surgieron de manera independiente a lo largo de la evolución, lo que constituye un claro ejemplo de convergencia funcional. La figura 4 (Vinuesa *et al.*, 2026) muestra el entorno genético de las cinco SODs codificadas en el genoma de Sm18, las cuales se distribuyen en cuatro loci distintos.

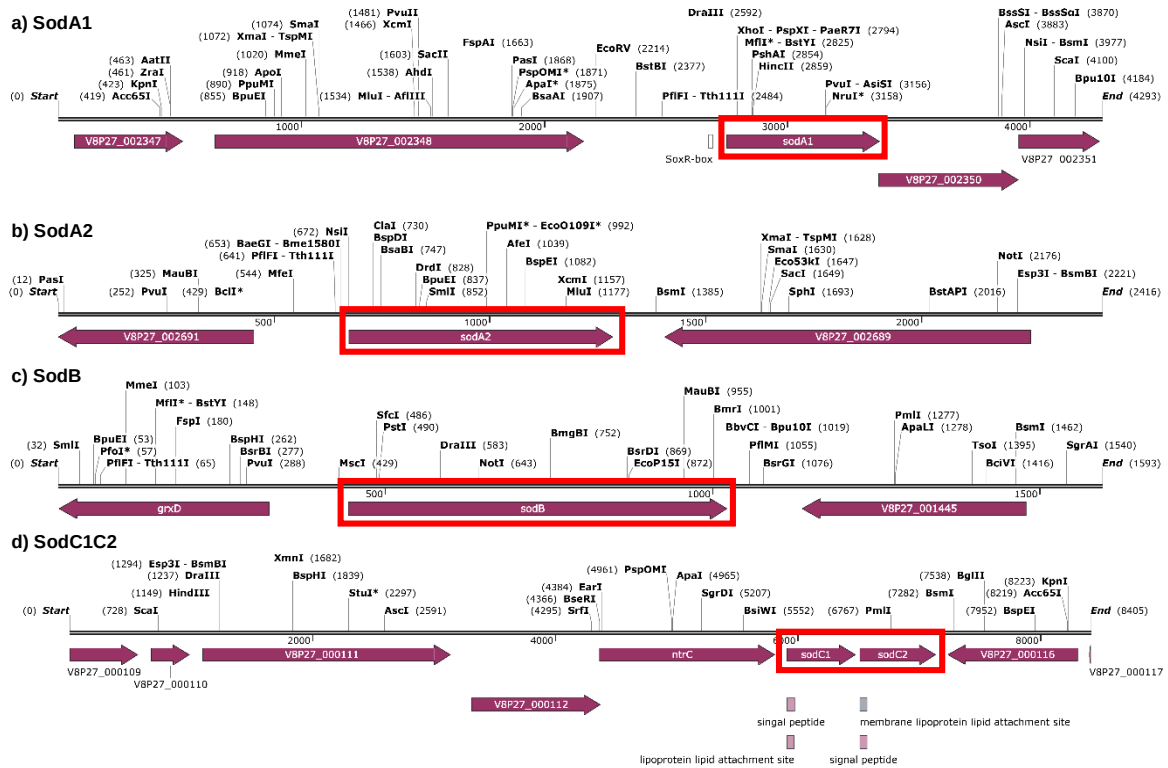


Figura 4. Entorno genético de las cinco SODs codificadas en el genoma de *S. maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18). Las proteínas SodA1, SodA2 y SodB (a, b, c) pertenecen a la familia de las SODs dependientes de Fe/Mn, probablemente citoplasmáticas, mientras que SodC1 y SodC2 (c) pertenecen a la familia de SODs dependientes de Cu/Zn con probable localización periplasmática, y sus genes se co-transcriben. Los recuadros rojos indican los genes *sod*.

Además del amplio repertorio de SODs, el genoma de *S. maltophilia* Sm18 codifica para cuatro catalasas, lo que refuerza la idea de un sistema antioxidante particularmente robusto (Figura 5). Tres de ellas corresponden a catalasas monofuncionales dependientes de hemo, de tipo KatE (V8P27_001227, V8P27_003020 y V8P27_000268) y una no-hemínica dependiente de Mn, KatN (V8P27_002088; KatN_Sm18). En *S. maltophilia*, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo regulatorio que controla la expresión de *katN*, así como la posibilidad de que esta enzima sea secretada mediante algún T6SS codificados en su genoma. Asimismo, no se detectaron genes que codifiquen catalasas bifuncionales tipo KatG, una familia bien caracterizada de catalasas bacterianas (Yuan *et al.*, 2021), lo que sugiere una especialización funcional basada en catalasas monofuncionales y no-hemínicas. Adicionalmente, se identificaron múltiples peróxidasas incluyendo cuatro

de la familia AhpD (alkylhydroperoxidasas dependientes de NADH; V8P27_002215, V8P27_000857, V8P27_002677, V8P27_001445), una peróxido reductasa dependiente de tioredoxina (V8P27_001594), y varias glutatión peroxidasas (V8P27_002638, V8P27_002680, V8P27_004066), entre otras.

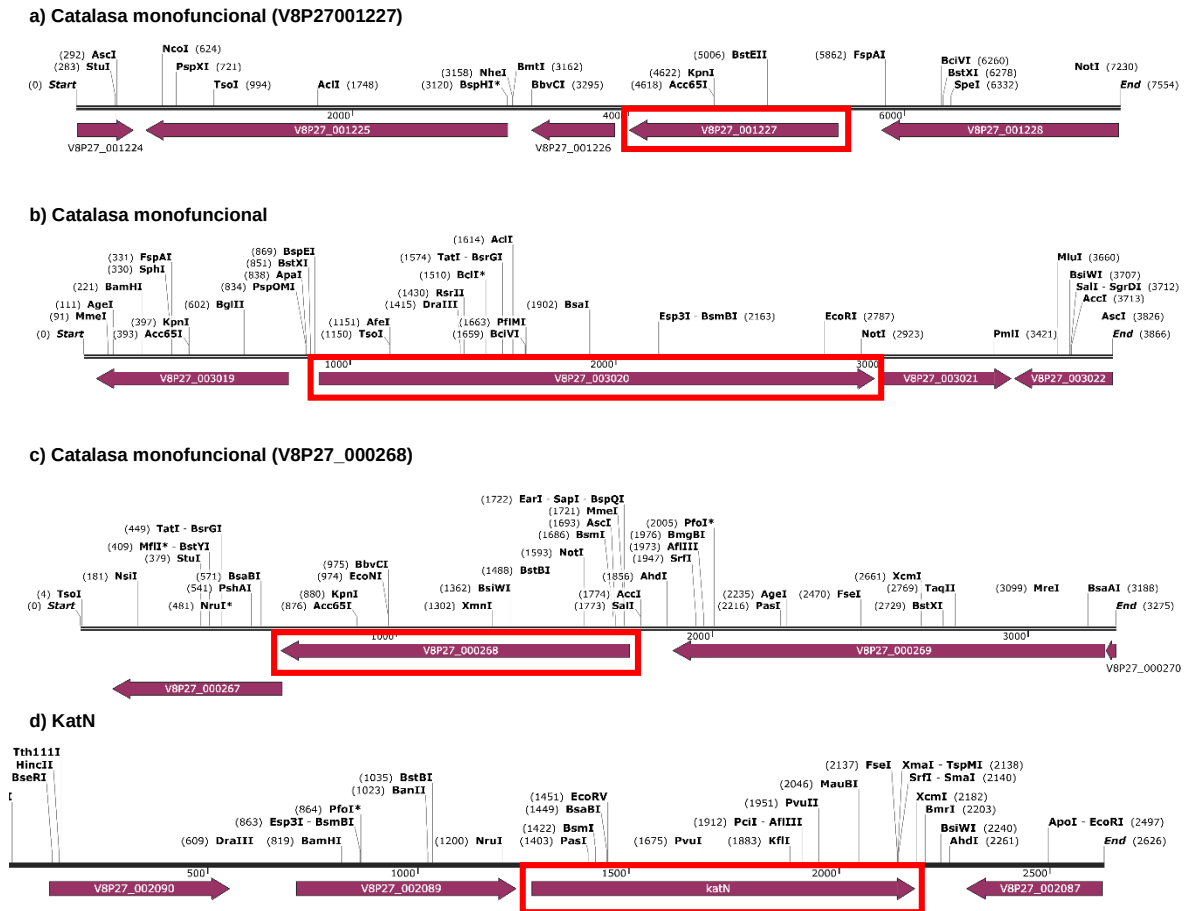


Figura 5. Entorno genético de las tres KATs codificadas en el genoma de *S. maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18). Las proteínas V8P27_001227, V8P27_003020 y V8P27_000268 son catalasas de tipo KatE monofuncionales dependientes de hemo (a, b, c), mientras que KatN es no-hemínica dependiente de Mn (d). Los recuadros rojos indican los genes *kat*.

En conjunto, esta evidencia indica que *S. maltophilia* Sm18 posee un equipamiento genético especialmente sólido para enfrentar el estrés oxidativo generado por distintas ROS, lo que probablemente contribuye a su notable adaptabilidad ambiental (Ezraty *et al.*, 2017; Johnson & Hug, 2019). El número inusualmente elevado de SODs —tres pertenecientes a la familia Fe/Mn y dos a la familia Cu/Zn—, de catalasas y otras proteínas relacionadas para contender con el

estrés oxidativo codificadas por este organismo convierte a *S. maltophilia* en un modelo particularmente atractivo para estudiar el papel diferencial de estas enzimas en la adaptación a la vida intracelular dentro de fagosomas y su posible contribución a la virulencia (Figura 6). En diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas se ha demostrado que SODs específicas son determinantes para la supervivencia intracelular y la patogenicidad; sin embargo, en *S. maltophilia* los estudios disponibles siguen siendo limitados.

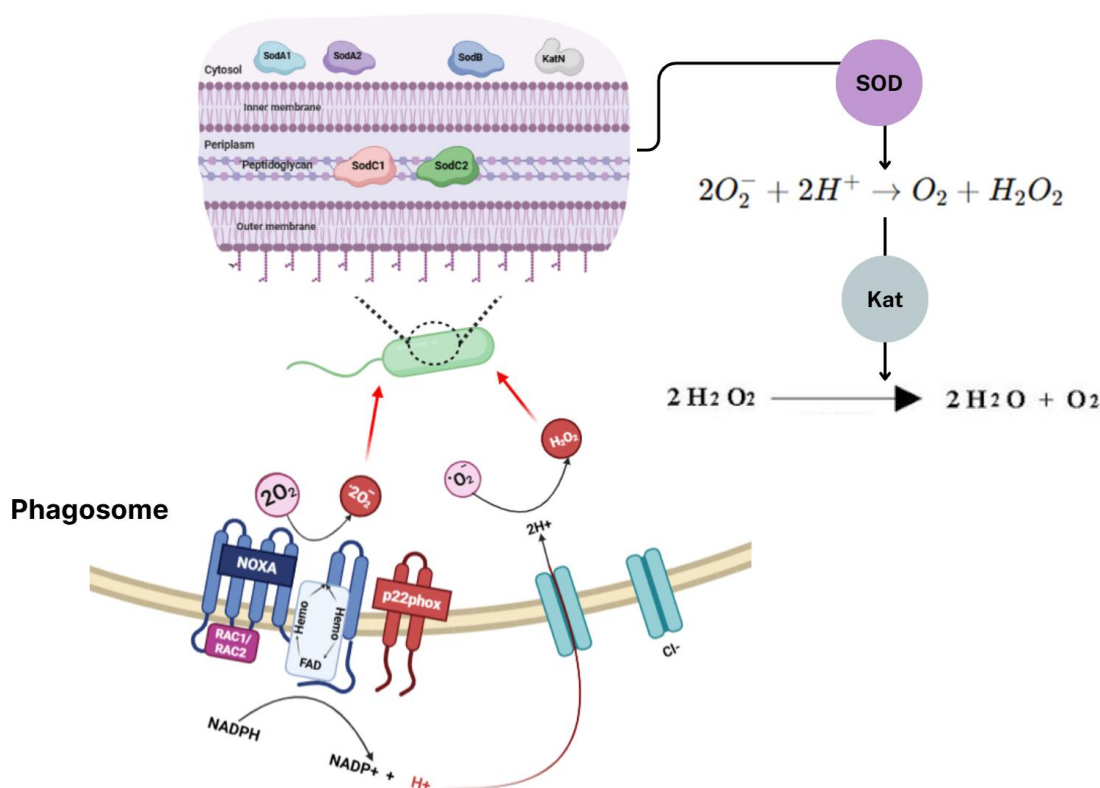


Figura 6. Modelo esquemático del estrés oxidativo generado durante la interacción entre *Acanthamoeba castellanii* Neff y *Stenotrophomonas maltophilia* Sm18, y de los sistemas antioxidantes bacterianos implicados. Durante la fagocitosis, el complejo NADPH oxidasa (NOX) del fagosoma de *A. castellanii* Neff produce $O_2^{\cdot -}$, el cual puede difundirse hacia la bacteria intracelular. En *S. maltophilia* Sm18, el $O_2^{\cdot -}$ es detoxificado por SODs localizadas con el citosol y el periplasma (SodA1, SodA2, SodB, SodC1 y SodC2), que catalizan su conversión a H_2O_2 . Posteriormente, el H_2O_2 es eliminado principalmente por catalasas, limitando el daño oxidativo y favoreciendo la supervivencia y replicación bacteriana en el fagosoma.

El análisis más detallado hasta la fecha del sistema de superóxido dismutasas en *S. maltophilia* fue realizado por Jair *et al.* (2019), en el que se evaluó la expresión de los genes *sodA1*, *sodA2* y *sodB* en la cepa K279a en función de la

fase de crecimiento y de la presencia o ausencia de menadiona (MD, vitamina K3), hierro y manganeso, así como el fenotipo de mutantes simples y dobles. Los resultados mostraron que *sodA2* y *sodB* se expresan principalmente durante la fase exponencial y no responden a los tratamientos evaluados. En particular, *sodB* no mostró evidencia de respuesta al estrés oxidativo ni a variaciones en la disponibilidad de metales, lo que indica una contribución secundaria a la homeostasis redox más que un papel frente a las ROS. En contraste, *sodA1* presentó una regulación inducible ante la menadiona y un patrón compensatorio en ausencia de *sodA2*, lo que indica un papel adaptativo frente al estrés por superóxido. A nivel funcional, la inactivación individual de *sodA1* o *sodA2* no afectó significativamente la viabilidad bacteriana; sin embargo, la doble mutante $\Delta sodA1 \Delta sodA2$ mostró una marcada disminución de la viabilidad en condiciones aerobias y de estrés oxidativo. Esto evidencia que las MnSOD (SodA1 y SodA2) constituyen los componentes centrales del sistema de *S. maltophilia* K279a, mientras que *sodB* desempeña un papel complementario.

2. HIPÓTESIS

La adaptación al estrés oxidativo, mediada por sistemas antioxidantes como las superóxido dismutasas y las catalasas, contribuye a la versatilidad ecológica de *Stenotrophomonas maltophilia* y a su capacidad de sobrevivir en distintos ambientes hostiles, incluidos los fagosomas de fagocitos profesionales.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Determinar la contribución de los sistemas antioxidantes de superóxido dismutasas (SOD) y catalasas (KAT) de *Stenotrophomonas maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18), mediante análisis genómico, regulación transcripcional y caracterización funcional, para dilucidar los mecanismos de adaptación al estrés oxidativo asociados con la supervivencia intracelular en *A. castellanii* Neff.

3.2 Objetivos específicos

1. Análisis filogenómico y de genómica comparativa de los 5 *loci* codificantes de superóxido dismutasas detectadas en la cepa modelo *Stenotrophomonas maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18) para analizar su distribución en el género *Stenotrophomonas* e inferir si los genes parálogos de Sm18 se originaron por duplicación o transferencia horizontal.
2. Construcción de plásmidos para análisis mediante fusiones transcripcionales a proteínas fluorescentes de la actividad de los promotores de los genes SOD y KAT, organizados en cuatro unidades transcripcionales *sodA2*, *sodB*, *sodC1C2* y *KatN* (figuras 4 y 5-d).
3. Evaluar la actividad de las 4 fusiones transcripcionales a estrés oxidativo en cultivo axénico a lo largo de la curva de crecimiento en medio LB, MM-MOPS-CAA y MM-MES-CAA suplementado o no con inductores de estrés oxidativo y diferentes niveles de pH.
4. Evaluar la actividad de las 4 fusiones transcripcionales por 48 h ensayos de co-cultivos con trofozoítos de la ameba de vida libre *Acanthamoeba castellanii* en microplacas de 96 pozos en equipo Synergy.
5. Construcción de plásmidos para generación de mutantes por integración de vector de los genes *sodC1C2* y *katN* que codifican para superóxido dismutasas y un catalasa en la cepa modelo *S. maltophilia* Sm18.
6. Evaluación de fenotipos de tolerancia a estrés oxidativo en cultivo y de replicación intracelular en co-cultivos con trofozoítos de la ameba de vida

libre *Acanthamoeba castellanii* Neff de las mutantes generadas, con especial énfasis en *sodC1*, *sodC2* y *katN*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

En el proyecto se utilizó la cepa modelo *Stenotrophomonas maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_8a (Sm18), aislada de sedimentos del río Las Estacas en Morelos, México, y cuyo genoma está completamente secuenciado (Ochoa-Sanchez & Vinuesa, 2017; Rivera *et al.*, 2024; Vinuesa *et al.*, 2026). La cepa es cultivada en condiciones aeróbicas en medio LB (Lysogeny Broth; 10 g de peptona, 5 g de extracto de levaduras y 10 g de NaCl en 1 L de agua destilada) a 30°C o en medio mínimo MOPS (pH 7), ya que previamente se había demostrado su eficacia para cultivar cepas de *Pseudomonas* utilizando 0.4% (p/v) de glucosa como fuente de carbono (LaBauve & Wargo, 2012). Adicionalmente, se empleó el tampón MES para evaluar el crecimiento en condiciones ácidas. Ambos medios mínimos fueron suplementados con 0.2% (p/v) de casaminoácidos Bacto™ (CAA) y se optimizaron específicamente para el crecimiento de *S. maltophilia* añadiendo tiamina (0.5% p/v) y biotina (0.1% p/v), lo que permitió la formulación de los medios MM-MOPS-CAA (pH 7) y MM-MES-CAA (pH 5.5 y 6.8), respectivamente, de acuerdo con protocolos previamente establecidos en el laboratorio (Argueta-Zepeda *et al.*, 2026).

4.2 Condiciones de cultivo de *Acanthamoeba castellanii* Neff.

La cepa de referencia de *A. castellanii* Neff fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC 30010) y utilizada como modelo de hospedero en los ensayos de interacción con *S. maltophilia* Sm18. El cultivo y mantenimiento de las amebas se realizaron según el protocolo descrito previamente por Rivera *et al.* (2024). Las amebas se cultivaron en condiciones axénicas a 30°C en matraces de cultivo celular de 25 cm² (Nunc), empleando 7 mL de medio peptona-extracto de levadura-glucosa (PYG), de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (American Type Culture Collection).

El cultivo de *A. castellanii* Neff se llevó a cabo en condiciones estáticas para favorecer la adhesión de los trofozoítos al fondo del frasco. Previo a su uso experimental, las amebas se cosecharon por centrifugación a 500 x *g*, se lavaron una vez con medio PYG, se resuspendieron en 3 mL de PYG y se almacenaron a

4°C. Estas condiciones permitieron mantener las amebas como trofozoítos metabólicamente activos, adecuados para su posterior uso en ensayos de co-cultivo.

4.3 Generación de fusiones transcripcionales.

Para la generación de las fusiones transcripcionales a proteínas fluorescentes se utilizó el plásmido pSEVA337-mSc3 (Figura S1). Los amplicones correspondientes a las regiones intergénicas completas río arriba de los cuatro loci *sodA2*, *sodB*, *sodC1C2* y *katN* —que codifican superóxido dismutasas y una catalasa en el genoma de *S. maltophilia* Sm18— fueron amplificados mediante PCR con la enzima Phusion de alta fidelidad, utilizando como molde el ADN genómico de Sm18. Posteriormente, dichos amplicones fueron clonados en el vector pSEVA337-mSc3. Tanto los vectores como los productos de PCR se digirieron con EcoR1-HF y HindIII-HF (NEB), y se ligaron con la ADN T4 ligasa (NEB), según el protocolo del fabricante, generando las construcciones plasmídicas Sm18 pSEVA337-pr_*sodA2*, pSEVA337-pr_*sodB*, pSEVA337-pr_*sodC1C2* y pSEVA337-pr_*katN*.

El plásmido pSEVA337-mSc3 se basa en un replicón *pBBR* de amplio rango de hospedero, con un número de copias intermedio y resistencia a cloranfenicol; este vector fue diseñado a partir del plásmido pSEVA337 en el laboratorio de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas UNAM (Argueta-Zepeda *et al.*, 2026). Los detalles de los vectores, así como los cebadores empleados y sus condiciones de PCR, se describen en las tablas suplementarias.

Una vez generadas las construcciones, los vectores recombinantes fueron transformados en células competentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico, utilizando 10 µL de la mezcla de ligación por cada 50 µL de células. Las transformantes se seleccionaron en cajas de LB suplementadas con cloranfenicol (Cm) y gentamicina (Gm), ambas a 30 µg/mL. La presencia de los insertos se corroboró mediante PCR de colonia utilizando el cebador universal R24 y el cebador reverso específico de cada construcción. Los productos obtenidos mostraron los tamaños esperados: 444 pb (para *sodA2*), 358 pb (para *sodB*), 297 pb (para

sodC1C2) y 289 pb (para *katN*). Como validación adicional, se purificaron y linealizaron los vectores para compararlos con el control vectorial vacío.

Finalmente, las construcciones validadas se introdujeron por electroporación en la cepa Sm18, siguiendo el protocolo previamente establecido en el laboratorio para esta cepa. Posteriormente, las transformantes obtenidas fueron verificadas nuevamente mediante PCR de colonias con las mismas combinaciones de cebadores, confirmándose la amplificación de fragmentos de los tamaños esperados para cada construcción. Para fines prácticos, las cepas transformadas serán referidas de aquí en adelante como Sm18/*sodA2*, Sm18/*sodB*, Sm18/*sodC1C2* y Sm18/*katN*.

4.4 Generación de mutantes por integración de vector (VIM).

Para la obtención de mutantes por integración de vector (VIM), se amplificaron por PCR las regiones internas de los genes *sodC2* y *katN* —en lo sucesivo denominados VIM*sodC2* y VIM*katN*, respectivamente (ver datos de los cebadores en la Tabla S3) —, utilizando la enzima Phusion y el ADN genómico de Sm18 como molde.

Los fragmentos VIM*sodC2* y VIM*katN* fueron clonados en los plásmidos suicidas pEX18TcVIM_mSc1 y pEX18CmVIM_mSc1, respectivamente (Figuras S2 y S3). Tanto los insertos como los vectores se linealizaron con EcoRI-HF y HindIII-HF y, posteriormente, se ligaron con la ADN ligasa T4 (NEB), según el protocolo del fabricante.

Las construcciones generadas se introdujeron en *E. coli* DH5 α mediante transformación por choque térmico, utilizando 10 μ L de la mezcla de ligación para 50 μ L de células competentes. Las colonias transformantes se seleccionaron mediante cribado azul-blanco en placas suplementadas con tetraciclina (Tc) o cloranfenicol (Cm) a 30 μ g/mL—según el marcador de resistencia presente en el vector—, además de IPTG y X-gal a la misma concentración.

Posteriormente, los vectores pEX18TcVIMmSc1_*sodC2* y pEX18CmVIMmSc1_*katN* fueron verificados por PCR con los cebadores

universales F24 y R24, que amplifican fragmentos de 536 pb (para *sodC2*), y 565 pb (para *katN*) flanqueando cada inserto. Como validación adicional, se purificaron y linealizaron los vectores para comparar su tamaño con el del plásmido vacío.

Los vectores suicidas se transfirieron a Sm18 mediante conjugación con *E. coli* S17-1 como donante. La selección de las transconjugantes se realizó en placas de medio LB suplementadas con Tc (50 µg/mL) y Gm (30 µg/mL). La integración cromosómica específica se confirmó mediante PCR utilizando el cebador F24 y los cebadores específicos en sentido directo (*Sm18_VIM-C2.F* y *Sm18_VIM- katN.F*), que amplifican la región desde el plásmido insertado hasta el ADN genómico de Sm18. Para fines prácticos, las transconjugantes obtenidas serán referidas de aquí en adelante como Sm18::*VIMsodC2* y Sm18::*VIMkatN*. Los detalles de los vectores, así como los cebadores empleados y sus condiciones de PCR, se describen en las tablas suplementarias.

4.5 Cinética de fluorescencia y crecimiento microbiano.

La fluorescencia y la cinética de crecimiento se evaluaron por triplicado, tanto a nivel biológico como a nivel técnico (al menos tres réplicas biológicas y tres técnicas), utilizando microplacas de 96 pozos. Todas las cepas empleadas se recuperaron a partir de criopreservados. Para cada evaluación, se tomaron 40-50 µL del criopreservado y se inocularon en 3 mL del medio correspondiente (LB, MM-MOPS-CAA o MM-MES-CAA), suplementado con el antibiótico específico. Los preinóculos se incubaron a 30 °C durante toda la noche, dos días antes de cada experimento.

Una vez que los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) cercana a 1.0, los preinóculos se subcutivaron transfiriendo una alícuota de 5 mL de medio fresco suplementado con el antibiótico correspondiente, incubándose nuevamente a 30 °C durante toda la noche. Este procedimiento de subcultivo previo al experimento permitió homogeneizar el estado fisiológico de las células, asegurando que se encontraran en fase logarítmica activa, lo cual es fundamental para disminuir la variabilidad entre réplicas biológicas y obtener respuestas consistentes ante los tratamientos de estrés oxidativo.

El día del experimento, la DO₆₀₀ inicial de los cultivos se ajustó a 0.05 en cada medio, con un volumen final de 200 µL por pozo. Los medios se suplementaron con concentraciones crecientes de bisulfito sódico de menadiona (MSB, por sus siglas en inglés, *Menadione Sodium Bisulfite*), para el análisis de superóxido dismutasas, y con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para evaluar la actividad de la catalasa. Las concentraciones iniciales de ambos agentes se determinaron a partir de reportes previos en bacterias Gram negativas —incluyendo estudios en *S. maltophilia*— (Blanco *et al.*, 2017; Jair *et al.*, 2019; McBee *et al.*, 2017) y mediante ensayos preliminares realizados en este trabajo. Esta estrategia permitió delimitar rangos subletales que conservaran la viabilidad celular y, al mismo tiempo, generaran una respuesta de estrés oxidativo detectable y cuantificable, sin comprometer la supervivencia bacteriana.

Para las cinéticas de crecimiento, las microplacas se incubaron a 30°C con agitación orbital a 205 rpm en un espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch 2, registrando la DO₆₀₀ cada 30 minutos durante al menos 24 horas. El mismo diseño experimental se empleó para analizar la cinética de fluorescencia, utilizando un lector de microplacas multimodo híbrido BioTek Synergy 2 para registrar simultáneamente los valores de fluorescencia y de crecimiento (DO₆₀₀). Los filtros de excitación y emisión para la proteína fluorescente mScarlet se configuraron a 530/25 nm (48% de ganancia) y 590/35 nm (99% de ganancia), respectivamente.

4.6 Análisis gráfico de la fluorescencia y la cinética del crecimiento.

Las gráficas y el análisis estadístico de los datos se realizaron en R (versión 4.x) mediante RStudio. A partir de los datos crudos de densidad óptica a 600 nm, se usaron los paquetes dplyr y tidyr para filtrar y transformar los datos en un “dataframe en formato largo” requerido por R. Los gráficos se construyeron con ggplot2 y la extensión ggtext, acotando las cinéticas a las 24 horas para apreciar mejor cómo cambia el crecimiento entre fases. Cada punto de la curva muestra el promedio de las réplicas biológicas junto con su error estándar de la media ($\pm$ SEM), lo que permite comparar visualmente de forma clara la tolerancia de *S. maltophilia* Sm18.

De la misma manera, los datos de unidades relativas de fluorescencia para la proteína mScarlet se exportaron de los equipos y se procesaron en R. Se utilizó ggplot2 para graficar las cinéticas de fluorescencia correspondientes. Al igual que en el crecimiento, en estas gráficas se incluyó el error estándar para representar la variabilidad entre réplicas biológicas.

4.7 Evaluación cuantitativa de la replicación intracelular de *S. maltophilia* Sm18 en co-cultivo con *A. castellanii* Neff.

El procedimiento se realizó conforme al protocolo previamente estandarizado en el laboratorio y detallado en Rivera *et al.* (2024). Para evaluar la replicación intracelular, se empleó un co-cultivo en placa microtitulada utilizando los trofozoítos de *A. castellanii* Neff y una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés, *Multiplicity of Infection*) 10. La evaluación se llevó a cabo en las cepas mutantes, Sm18::VIMsodC2 y Sm18::VIMkatN, y en las cepas que contienen las fusiones transcripcionales Sm18/sodA2, Sm18/sodB, Sm18/sodC1C2 y Sm18/katN.

Cada pozo de la placa contenía 100,000 trofozoítos resuspendidos en 100 μ L de medio mínimo MOPS que contiene sales y glucosa (MMSalts-MOPS-Glc), e incubados a 25°C durante 30 minutos para su adherencia antes de la infección. Posteriormente, el medio fue reemplazado por las bacterias a evaluar, ajustadas a la MOI deseada (MOI10), y la fagocitosis se sincronizó mediante centrifugación a 500 x g durante 5 minutos a 25°C.

Tras este paso, las placas se colocaron en el lector multimodal Synergy 2 (BioTek) y se incubaron estáticamente a 25°C. La fluorescencia de mScarlet-I/mScarlet3 se midió cada 30 minutos durante 48 horas con parámetros de excitación de 530/25 nm (48%) y de emisión de 590/35 nm (99%). Los controles experimentales incluyeron pozos con medio, con trofozoítos en medio o con bacterias en medio, y se utilizaron para normalizar los datos obtenidos.

4.8 Ensayo de co-cultivo de *A. castellanii* Neff - *S. maltophilia* Sm18 para el análisis de la interacción intracelular mediante microscopía de células vivas (LCI).

La metodología empleada para los ensayos de co-cultivo se basa en lo descrito previamente por Rivera *et al.* (2024), con las modificaciones que se detallan a continuación. El co-cultivo se estableció sembrando 5×10^5 trofozoítos de *A. castellanii* Neff en placas de cultivo con fondo de vidrio de 20 mm de diámetro, las cuales fueron incubadas por 1 hora a 30°C en medio MMsalts-MOPS-Glc para permitir la adhesión y estabilización celular.

Las cepas de *S. maltophilia* Sm18 que expresan fusiones transcripcionales se recuperaron a partir de criotubos almacenados a -80°C y se sembraron mediante estría por agotamiento en placas de LB suplementadas con Cm (30 µg/mL), con el fin de obtener colonias aisladas. A partir de una colonia individual, se puso un preinóculo en 3 mL de medio LB con Cm por cada fusión, el cual se incubó durante toda la noche a 30°C en agitación. Posteriormente, un día antes del ensayo, el cultivo fue refrescado con 5 mL de medio bajo las mismas condiciones de incubación.

El día del experimento, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación, lavadas para eliminar restos del medio de crecimiento y del antibiótico, y ajustadas a una OD₆₀₀ de 1.0, correspondiente aproximadamente a 4.8×10^8 UFC/mL. Las suspensiones bacterianas se diluyeron en medio MMsalts-MOPS-Glc y se añadieron a los cultivos de amebas para alcanzar una MOI 25.

Para sincronizar el proceso de fagocitosis, las placas de co-cultivo se centrifugaron a 400 x g durante 4 minutos a 25°C. El análisis de la interacción intracelular y de la expresión de las fusiones transcripcionales se realizó a 1 hora del contacto primario mediante microscopía de epifluorescencia de células vivas (LCI), utilizando un microscopio invertido AxioVert A1 (Carl Zeiss).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de bisulfito sódico de menadiona y peróxido de hidrógeno en *Stenotrophomonas maltophilia* Sm18.

Con el objetivo de establecer rangos de concentraciones subletales de agentes generadores de estrés oxidativo para experimentos posteriores, se evaluó la tolerancia de la cepa silvestre *S. maltophilia* Sm18 a bisulfito sódico de menadiona (MSB) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante ensayos de crecimiento en placas de 96 pozos, monitoreados durante al menos 24 h. Estos experimentos se diseñaron con la finalidad de recrear, de manera controlada, las condiciones oxidantes a las que *S. maltophilia* Sm18 se enfrenta durante su interacción intracelular con *A. castellanii* Neff.

Como se mencionó anteriormente, se plantea que la activación del complejo NOX en *A. castellanii* genera aniones $O_2^{\cdot-}$ que pueden dismutarse a H_2O_2 . En este contexto, el uso de MSB como generador intracelular de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 como agente oxidante permitió simular el ambiente oxidativo presente en el interior de los fagosomas (Jair *et al.*, 2019; McBee *et al.*, 2017). Además del estrés oxidativo, el pH constituye un factor determinante del ambiente intracelular al que *S. maltophilia* se enfrenta durante su interacción con *A. castellanii*. Se ha descrito que esta bacteria es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de fagosomas maduros, acidificados y positivos para Rab7a de esta AVL (Rivera *et al.*, 2024). En este contexto, la evaluación del crecimiento bacteriano en medios mínimos ajustados a diferentes valores de pH (7.0, 6.8 y 5.5) permitió aproximar experimentalmente las condiciones presentes durante la interacción intracelular.

La selección de las concentraciones de MSB se realizó considerando estudios previos en cepas clínicas, particularmente en la cepa de referencia *Stenotrophomonas maltophilia* K279a, en la que la menadiona se ha utilizado como inductor de estrés oxidativo en ensayos de sensibilidad bacteriana. A partir de estos antecedentes se definió un rango inicial de concentraciones para la evaluación experimental (Jair *et al.*, 2019).

La tolerancia de la cepa Sm18 se evaluó en medio LB a concentraciones de 0.125 a 2 mM (Figura 7). En este rango se observó crecimiento bacteriano a partir de 0.125 mM, lo que indica que, a bajas concentraciones, la MSB no impide el desarrollo celular. A medida que aumentó la concentración, se observó una disminución progresiva del crecimiento, con un efecto inhibitorio parcial a concentraciones de hasta 1 mM, aunque no afectó por completo el crecimiento bacteriano. A 2 mM, la inhibición fue más pronunciada, lo que estableció este valor como el límite superior del rango evaluado.

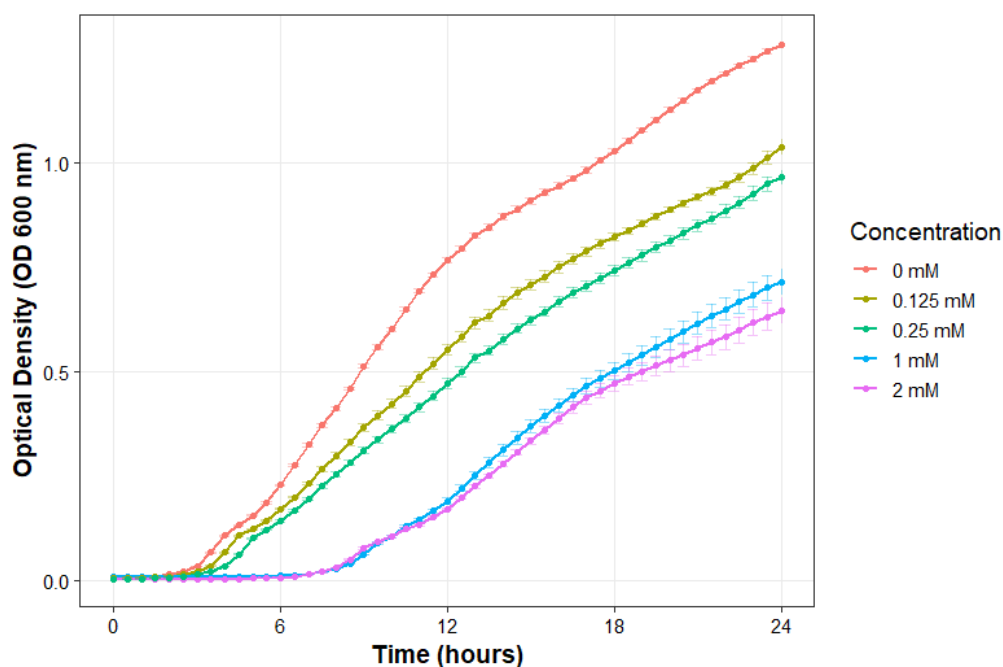


Figura 7. Cinética de crecimiento de *S. maltophilia* Sm18 (WT) bajo estrés oxidativo por MSB. La cepa se evaluó en medio LB con concentraciones de 0.125 a 2 mM de MSB, mostrando un efecto inhibitorio progresivo dependiente de la dosis. A concentraciones bajas (0.125 y 0.25 mM) el desarrollo celular se mantiene activo; dosis de hasta 1 mM provocan una inhibición parcial del crecimiento, mientras que de 1 a 2 mM se observa la inhibición más pronunciada, estableciendo estos valores como el límite superior de tolerancia. Las lecturas se realizaron cada 30 minutos a 30°C en el lector BioTek Epoch 2; de las 48 horas de ensayo total, se muestran las primeras 24 horas para optimizar la visualización de la cinética. Los datos representan el promedio $\pm$ SEM obtenido a partir de $n = 2$ réplicas biológicas independientes (con 6 réplicas técnicas cada una), graficando el tiempo (Time (hours)) en el eje X y la densidad óptica (Optical Density (OD 600 nm)) en el eje Y.

Con el fin de delimitar con mayor precisión las concentraciones subletales en condiciones de medio mínimo, la cepa Sm18 se evaluó en MM-MOPS con concentraciones de MSB de 25, 50, 100 y 400 μ M (Figura 8). En este rango, se

observó un crecimiento robusto a concentraciones bajas (25 y 50 μM), mientras que a partir de 100 μM se detectaron efectos inhibitorios leves a moderados. En concentraciones de 200 y 400 μM , la inhibición fue más marcada, aunque no impidió por completo el crecimiento bacteriano. Estos resultados permitieron identificar un rango reproducible de concentraciones subletales en condiciones definidas.

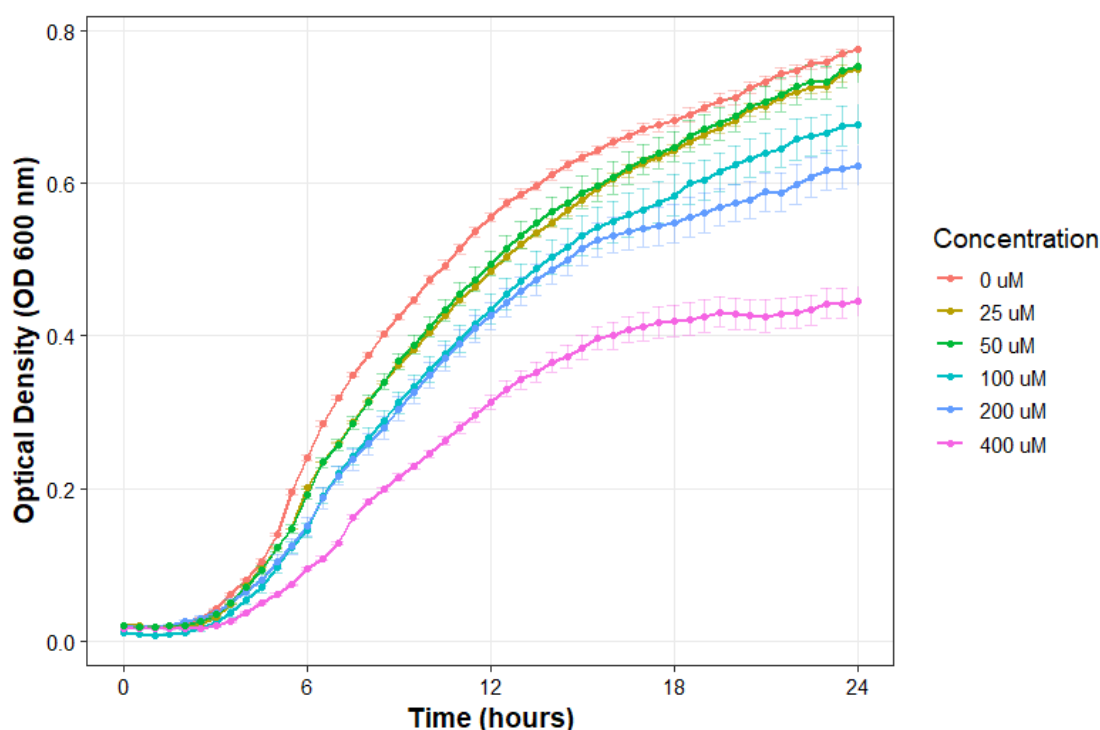


Figura 8. Cinética de crecimiento y tolerancia de *S. maltophilia* Sm18 frente a MSB en medio mínimo. La cepa se evaluó en MM-MOPS empleando concentraciones de MSB de 25 a 400 μM para delimitar el rango subletal. Mientras que a concentraciones bajas (25 y 50 μM) el desarrollo celular es robusto y similar al control (0 μM), a partir de 100 μM se detectan efectos inhibitorios leves a moderados, siendo la inhibición más evidente a 200 y 400 μM , sin impedir por completo el crecimiento. Las lecturas de densidad óptica (OD_{600}) se realizaron cada 30 minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$ en un lector BioTek Epoch 2; de las 48 horas totales del ensayo, se muestran las primeras 24 horas para optimizar la visualización cinética. Los datos representan el promedio $\pm$ SEM obtenido a partir de $n = 2$ réplicas biológicas independientes (cada una con 6 réplicas técnicas), con el tiempo (Time (hours)) en el eje X y la densidad óptica (Optical Density (OD_{600} nm)) en el eje Y.

Por otra parte, las concentraciones de H_2O_2 se seleccionaron basadas en estudios previos de *S. maltophilia* en los cuales se ha evaluado la respuesta bacteriana frente a estrés oxidativo inducido por este agente, empleando concentraciones micromolares a milimolares (Li *et al.*, 2020). Partiendo de estos antecedentes, se definió un rango experimental de 0 a 8 mM. Dado que a

concentraciones de 4 y 8 mM se observó una inhibición total del crecimiento (Figura S1) y con el objetivo de analizar el comportamiento cinético bajo condiciones de estrés oxidativo que permitieran la viabilidad bacteriana pero desafiaran su crecimiento, los rangos se ajustaron de 0 a 2 mM.

Finalmente, se evaluó la respuesta de la cepa *S. maltophilia* Sm18 bajo condiciones de estrés oxidativo en medio mínimo (MM-MOPS), empleando concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre 0.5 y 2 mM, un rango previamente definido como subletal para esta cepa (Figura 9). En este ensayo de cinética de crecimiento, se observó desarrollo bacteriano en todos los tratamientos, lo que confirma el carácter subletal del rango de concentraciones evaluado. Sin embargo, se detectó un efecto inhibitorio progresivo y dependiente de la concentración de H_2O_2 . Mientras que a concentraciones bajas (0.5 mM) el crecimiento fue casi idéntico al del control (0 mM), las dosis de 1 mM y, de manera más pronunciada, de 2 mM provocaron un retraso progresivo en el inicio de la fase logarítmica (fase lag) y una reducción de la velocidad de desarrollo celular. Estos resultados validan este rango de concentraciones subletales para estudios posteriores. En particular, la selección de estas dosis proporciona una base experimental sólida para analizar, en condiciones fisiológicamente relevantes, la regulación transcripcional y los fenotipos asociados a la respuesta antioxidante frente a H_2O_2 en *S. maltophilia*, dado que todas las concentraciones permiten la adaptación y el crecimiento de la cepa.

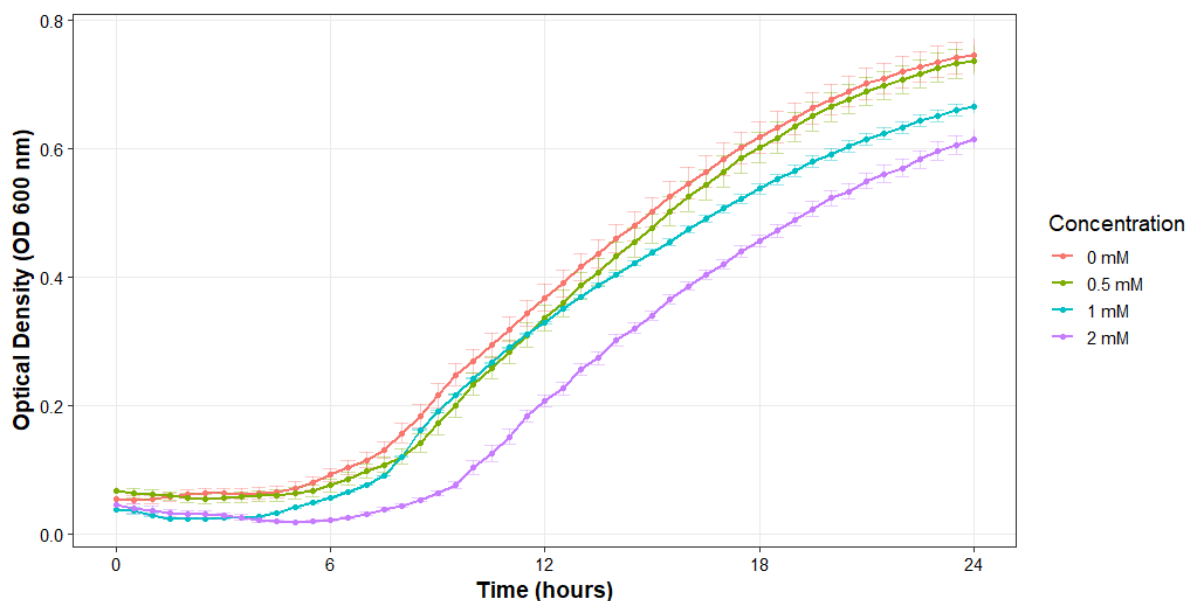


Figura 9. Cinética de crecimiento y tolerancia de *S. maltophilia* Sm18 frente a H₂O₂ en medio mínimo. La tolerancia de la cepa se evaluó en MM-MOPS empleando concentraciones de 0.5 a 2 mM de H₂O₂ como rango subletal ajustado. Mientras que a bajas concentraciones (0.5 mM) el crecimiento se mantiene cercano al del control (0 mM), las dosis de 1 y 2 mM provocan un retraso progresivo y dependiente de la concentración en la fase lag, así como una reducción de la velocidad de desarrollo celular. Las lecturas de densidad óptica (OD₆₀₀) se realizaron cada 30 minutos a 30 °C en un lector BioTek Epoch 2; de las 48 horas totales del ensayo, se muestran las primeras 24 horas para optimizar la visualización cinética. Los datos representan el promedio ± SEM obtenido a partir de n = 2 réplicas biológicas independientes (cada una con 6 réplicas técnicas), con el tiempo (Time (hours)) en el eje X y la densidad óptica (Optical Density (OD 600 nm)) en el eje Y.

5.2 Análisis de fusiones transcripcionales en cultivo axénico: Sm18/sodA2, Sm18/sodB, Sm18/sodC1C2 y Sm18/katN.

Con el fin de evaluar la actividad promotora de genes antioxidantes de *S. maltophilia* Sm18 bajo condiciones de estrés oxidativo, se analizaron fusiones transcripcionales de algunos genes asociados a la detoxificación de ROS, específicamente las superóxido dismutasas (SODs) y una catalasa (Kat). Con base en las evaluaciones previas de tolerancia a agentes oxidantes, se emplearon MSB y H₂O₂ como estímulos en los ensayos de expresión transcripcional.

5.2.1 Respuesta transcripcional de fusiones SOD de *S. maltophilia* Sm18 frente a estrés oxidativo inducido por MSB.

Inicialmente, las fusiones transcripcionales Sm18/sodA2, Sm18/sodC1C2 y Sm18/sodB, indicadas en la Figura 10 como A2, C1C2 y B, respectivamente, fueron

evaluadas en MM-MOPS (M en la figura) a pH 7.0 en presencia de MSB (100, 200 y 400 μ M), con el objetivo de establecer un rango de concentraciones y caracterizar su comportamiento transcripcional. Como control experimental, se incluyó MM-MOPS suplementado únicamente con las concentraciones de MSB con el fin de descartar señales de fluorescencia atribuibles al medio o al compuesto. En todas las condiciones evaluadas, este control no mostró señal detectable, lo que confirma que la fluorescencia registrada corresponde exclusivamente a la actividad transcripcional de las fusiones analizadas.

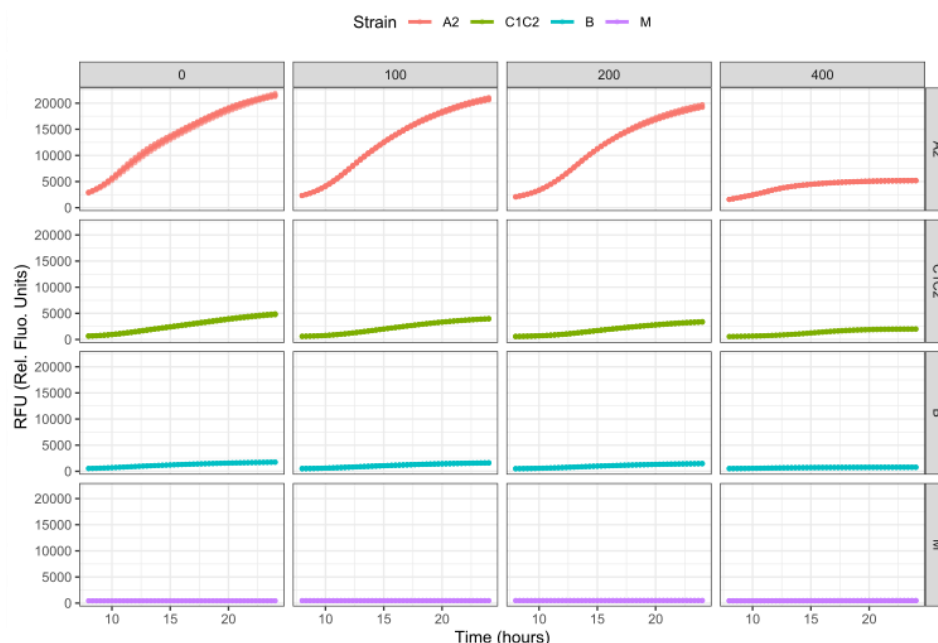


Figura 10. Cinética de la expresión de fusiones transcripcionales en *S. maltophilia* Sm18 bajo condiciones de estrés oxidativo por MSB. Las fusiones transcripcionales Sm18/*sodA2* (A2), Sm18/*sodC1C2* (C1C2) y Sm18/*sodB* (B) fueron evaluadas en MM-MOPS (pH 7.0) suplementado con diferentes concentraciones de MSB (0, 100, 200 y 400 μ M). Mostrando que la fusión *sodA2* exhibe niveles de expresión drásticamente superiores al resto, manteniendo un comportamiento constitutivo en concentraciones bajas e intermedias (0 - 200 μ M) y disminuyendo a 400 μ M. Mientras que *sodC1C2* muestra una expresión basal baja con un ligero incremento tardío, observable también a la concentración más alta. En cambio, la actividad de *sodB* permanece cercana a la línea de base en todas las condiciones. Como control negativo, se incluyó el medio sin cepa (M), que no mostró señal detectable. Las lecturas de densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) y fluorescencia relativa se realizaron cada 30 minutos durante 24 horas utilizando un lector de microplacas Synergy 2 a 30°C. Cada fila de la cuadrícula representa una fusión transcripcional y cada columna una concentración distinta de MSB. Los datos son curvas representativas obtenidas a partir de un total de $n = 4$ réplicas biológicas independientes, con el tiempo (Time (hours)) en el eje X y las unidades relativas de fluorescencia [RFU (Rel. Fluo. Units)] en el eje Y. Las curvas de crecimiento correspondientes (OD_{600}) se detallan en la figura suplementaria S4.

En estas condiciones, la fusión Sm18/*sodA2* mostró los niveles de expresión más altos que los de las otras construcciones. La señal de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés, *Relative Fluorescence Units*) aumentó progresivamente durante la incubación, alcanzando su máximo hacia las ~24 h. Este patrón se observó tanto en ausencia como en presencia de MSB, sin cambios marcados en la expresión a 100 y 200 μ M. Sin embargo, a 400 μ M se observó una disminución evidente en la señal de fluorescencia, mostrando una menor pendiente y valor máximo reducido en comparación con las demás concentraciones. En conjunto, estos resultados sugieren que Sm18/*sodA2* presenta un patrón de expresión predominantemente constitutivo bajo condiciones basales y de estrés moderado, pero que su expresión se ve comprometida bajo condiciones de estrés oxidativo elevado, probablemente como consecuencia de efectos fisiológicos adversos sobre la célula más que de una regulación transcripcional directa.

Por otro lado, Sm18/*sodC1C2* presentó niveles de expresión considerablemente menores que los de Sm18/*sodA2*, con un incremento gradual de la fluorescencia a lo largo del tiempo en todas las condiciones evaluadas. En ausencia de MSB, se observó una expresión basal baja, sin inducción abrupta. Este mismo patrón se mantuvo a 100 y 200 μ M, donde no se detectaron cambios apreciables ni en la pendiente de las curvas ni en la intensidad de la señal, lo que sugiere que Sm18/*sodC1C2* no es inducible en rangos bajos a intermedios de estrés oxidativo. En contraste, a 400 μ M se observó un ligero incremento de la señal de fluorescencia, particularmente en los tiempos tardíos del experimento. Aunque este aumento es bajo, podría indicar que Sm18/*sodC1C2* responde débilmente a condiciones de estrés oxidativo elevado, lo que sugiere un posible papel secundario o específico en la respuesta celular bajo condiciones más exigentes.

Finalmente, *sodB* presentó niveles de fluorescencia muy bajos (casi basales) en todas las condiciones evaluadas. Tanto en ausencia de MSB como a 100 y 200 μ M, la señal fue apenas perceptible, lo que sugiere una actividad transcripcional mínima en estas condiciones. A 400 μ M, los niveles de fluorescencia disminuyeron hasta ser prácticamente nulos, lo que indica la ausencia de actividad transcripcional

detectable a esta concentración. Este comportamiento es consistente con lo previamente descrito para Sm18/*sodB* en la cepa clínica de *S. maltophilia* K279a, donde se ha reportado un patrón de expresión asociado al crecimiento y no inducible por generadores de $O_2^{\cdot -}$ (Jair *et al.*, 2019). En este contexto experimental, los resultados sugieren que las condiciones evaluadas no favorecen una activación significativa de este gen.

En conjunto, estos resultados evidencian que la respuesta antioxidante en *S. maltophilia* bajo estrés inducido por MSB no se caracteriza por una inducción coordinada de todas las superóxido dismutasas, sino por un comportamiento diferencial entre ellas. Este patrón sugiere que la regulación de estos genes está influida tanto por el estado fisiológico celular como por la compartimentalización de la respuesta al estrés oxidativo. En este sentido, la expresión predominante de Sm18/*sodA2* en condiciones basales y su disminución ante concentraciones elevadas de MSB, en contraste con la respuesta leve pero consistente de Sm18/*sodC1C2* a 400 μ M, podrían estar relacionadas con la localización subcelular de sus productos. Mientras que Sm18/*sodA2* y Sm18/*sodB* codifican SODs citoplasmáticas, el locus Sm18/*sodC1C2* codifica SODs periplasmáticas, lo que implica que cada una responde a microambientes oxidativos distintos dentro de la célula. Dado que el $O_2^{\cdot -}$ presenta una difusión limitada a través de las membranas biológicas, su acumulación y efecto pueden variar entre los compartimentos celulares. En este contexto, es posible que, bajo condiciones de estrés oxidativo elevado, la demanda de detoxificación aumente en el periplasma, mientras que la actividad citoplasmática se ve limitada por efectos fisiológicos globales.

Por otro lado, la baja expresión de Sm18/*sodB* en todas las condiciones refuerza la idea de que su participación en la respuesta a este tipo de estrés es limitada en el contexto evaluado. Estos resultados sugieren que cada SOD podría desempeñar un papel específico según el nivel de estrés y el compartimento celular. A partir de estos hallazgos y considerando el comportamiento constitutivo de Sm18/*sodA2* y la ausencia de cambios relevantes en Sm18/*sodB*, los análisis posteriores se centraron en Sm18/*sodC1C2* y Sm18/*katN*, debido a sus

características funcionales y a la limitada información disponible sobre su papel en la respuesta al estrés oxidativo en *S. maltophilia*.

El gen *katN* codifica una catalasa dependiente de manganeso (Mn), lo cual resulta particularmente relevante a la luz de los recientes hallazgos del grupo de trabajo, que destacan la importancia del Mn en la fisiología y la adaptación intracelular de *S. maltophilia*, incluida su supervivencia en el fagosoma de *A. castellanii* (Argueta-Zepeda et al., 2026). En este entorno, caracterizado por estrés oxidativo y limitación de hierro, los sistemas antioxidantes independientes de Fe podrían conferir una ventaja adaptativa (Becker & Skaar, 2014; Whittaker, 2012).

Por su parte, *sodC1* y *sodC2* codifican SODs dependientes de Cu/Zn, cuya función en *S. maltophilia* ha sido poco explorada. Esta falta de estudios funcionales, junto con el comportamiento observado bajo las condiciones mencionadas, motivó su selección para el presente trabajo. En particular, su posible participación en la respuesta a ROS de origen externo, como el $O_2^{\bullet-}$ generado por el hospedero, las posiciona como candidatas relevantes para el estudio de mecanismos de defensa bacteriana bajo condiciones de estrés oxidativo.

5.2.2 Efecto del pH y agentes oxidantes sobre la expresión de las fusiones Sm18/*sodC1C2* y Sm18/*katN*.

Como se muestra en la figura 11, la actividad transcripcional de Sm18/*sodC1C2* y Sm18/*katN* fue evaluada en MM-MOPS a pH 7, en presencia de diferentes concentraciones de MSB (100, 250 y 500 μ M) y H_2O_2 (0.5, 1 y 2 mM), con el fin de analizar su respuesta frente a distintos tipos de estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno. La actividad transcripcional se monitoreó mediante el reportero fluorescente mScarlet-3 durante ~25 horas.

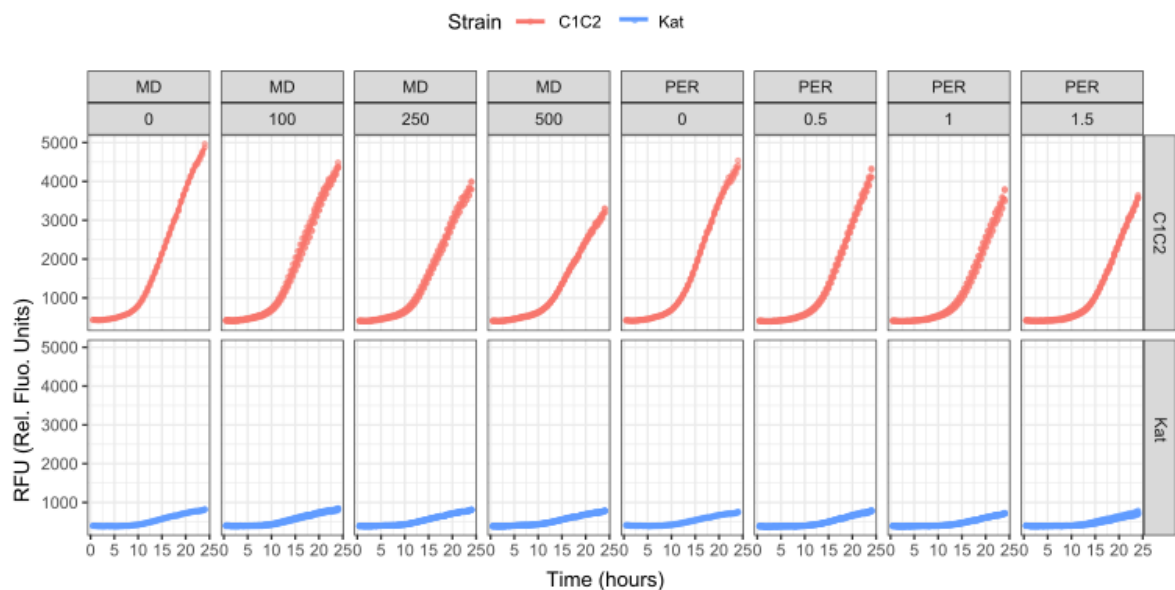


Figura 11. Cinética de expresión de las fusiones transcripcionales *Sm18/sodC1C2* (C1C2) y *Sm18/katN* (Kat) en *Stenotrophomonas maltophilia* Sm18 bajo estrés oxidativo inducido por MSB y H₂O₂. Las evaluaciones se realizaron en MM-MOPS (pH 7.0) suplementado con concentraciones crecientes de MSB (0, 100, 250 y 500 μM; MD en la figura) o H₂O₂ (0, 0.5, 1 y 1.5 mM; PER en la figura). La fusión *sodC1C2* (fila superior) presenta una actividad basal elevada en todas las condiciones, caracterizada por una fase de latencia inicial de varias horas, seguida de un incremento pronunciado que alcanza su máximo al final del ensayo; este pico de fluorescencia disminuye de forma dependiente de la concentración, siendo más evidente a 500 μM de MSB. En contraste, la fusión *katN* (fila inferior) exhibe niveles de fluorescencia más bajos y muestra un incremento discreto correlacionado con el aumento de la biomasa. Las lecturas se realizaron cada 30 minutos durante 25 horas utilizando un lector de microplacas Synergy 2 a 30°C. Cada columna representa una condición de estrés oxidativo y cada fila una fusión transcripcional. Los datos corresponden a valores crudos de fluorescencia (Raw RFU) representativos de n = 8 réplicas biológicas, utilizando el eje X para el tiempo (Time (hours)) y el eje Y para la fluorescencia relativa. Las curvas de crecimiento correspondientes (OD600) se detallan en la figura suplementaria S5.

Sm18/sodC1C2 presentó una señal de fluorescencia elevada tanto en ausencia como en presencia de los agentes oxidantes evaluados, lo que indica actividad transcripcional basal del locus. Esta expresión, en ausencia de estrés oxidativo exógeno, sugiere que *Sm18/sodC1C2* podría participar en el manejo de ROS generadas endógenamente durante el metabolismo aerobio de la bacteria.

En todas las condiciones evaluadas, la expresión de *Sm18/sodC1C2* presentó una fase inicial de baja expresión de varias horas previa al incremento pronunciado de la fluorescencia. Posteriormente, la señal aumentó progresivamente

a lo largo del experimento, alcanzando su valor máximo al final del periodo de incubación. Sin embargo, conforme aumentó la concentración de MSB y H_2O_2 , la intensidad máxima de fluorescencia disminuyó gradualmente, siendo más evidente en presencia de MSB a 500 μM . Este comportamiento sugiere que niveles elevados de estrés oxidativo, similares a los observados en la cepa WT, afectan negativamente la actividad fisiológica celular y/o la regulación transcripcional de *Sm18/sodC1C2*. Adicionalmente, la diferencia observada entre MSB y H_2O_2 , aunque no es muy marcada, indica que la respuesta del locus podría depender del tipo de ROS a los que la bacteria es sometida.

En contraste con *Sm18/sodC1C2*, la fusión *Sm18/katN* presentó niveles de fluorescencia considerablemente menores en todas las condiciones evaluadas. Aunque se observó un incremento discreto de la señal, probablemente asociado al aumento de la biomasa celular, esta permaneció baja y sin cambios importantes en respuesta al incremento de la concentración de los agentes oxidantes. Este resultado sugiere que, aunque *katN* codifica una catalasa dependiente de Mn potencialmente relevante en ambientes con restricción de hierro, su regulación transcripcional no responde directamente a los niveles de ROS analizados en estas condiciones experimentales, o bien podría estar regulada a nivel postranscripcional o activarse por estímulos fisiológicos distintos. Las curvas de crecimiento correspondientes (OD_{600}) de este experimento se muestran en la Figura S5.

Para aproximar las condiciones de pH a las presentes en fagosomas maduros de *A. castellanii* Neff, las fusiones transcripcionales *Sm18/sodC1C2* y *Sm18/katN* se evaluaron en MM-MES ajustado a pH 6.8 y 5.5, en presencia de MSB y H_2O_2 durante aproximadamente 40 horas (Figura 12).

La fusión *Sm18/sodC1C2* presentó fluorescencia detectable en todas las condiciones evaluadas, lo que confirma nuevamente la actividad transcripcional basal del locus. En ausencia de estresor, el nivel de fluorescencia fue ligeramente mayor a pH 6.8 que a pH 5.5. En presencia de 500 μM de MSB, *Sm18/sodC1C2* mostró perfiles de fluorescencia similares en las etapas iniciales del crecimiento a ambos valores de pH. Sin embargo, hacia el final del experimento (~30 horas), las

curvas comenzaron a divergir ligeramente, observándose un incremento leve de la fluorescencia a pH 5.5, mientras que a pH 6.8 la señal fue menos pronunciada. Estos resultados sugieren que el pH podría influir en el patrón de expresión de *Sm18/sodC1C2* durante el crecimiento bacteriano bajo estrés oxidativo inducido por MSB.

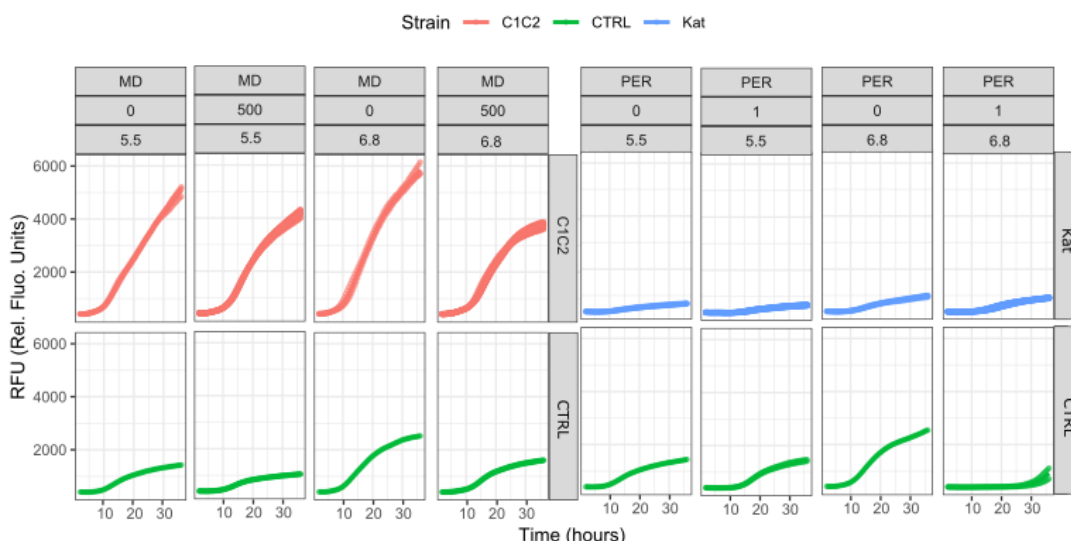


Figura 12. Cinética de expresión de las fusiones transcripcionales *Sm18/sodC1C2* (C1C2) y *Sm18/katN* (Kat) en *S. maltophilia* Sm18 bajo variaciones de pH y estrés oxidativo. Las curvas demuestran que *sodC1C2* (fila superior) mantiene su alta actividad basal en ambos pHs, pero bajo el estrés con 500 μ M de MSB las curvas divergen hacia las ~30 horas, alcanzando un nivel de fluorescencia discretamente mayor a pH 5.5 que a pH 6.8. Por otra parte, la fusión *katN* (fila intermedia) muestra perfiles muy bajos, en los que, a pH 6.8, se observa un incremento gradual de la señal a lo largo del tiempo, mientras que a pH ácido (5.5) la actividad transcripcional mantiene niveles basales. El medio utilizado fue MM-MES ajustado a pH 5.5 y 6.8, suplementado con MSB (MD en la figura; 0 y 500 μ M) para *sodC1C2* y con H_2O_2 (PER en la figura; 0 y 1 mM) para *katN*. Como control (CTRL), se utilizó la cepa portadora del plásmido vacío. Las lecturas de densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) y RFU se realizaron cada 30 minutos durante ~40 horas utilizando un lector de microplacas Synergy 2 a 30°C. Cada columna representa una condición de estrés oxidativo y de pH, mientras que cada fila corresponde a una fusión transcripcional. Los datos corresponden a valores crudos de fluorescencia representativos de $n = 9$ réplicas biológicas, indicando el tiempo (Time (hours)) en el eje X y la fluorescencia relativa [RFU (Rel. Fluo. Units)] en el eje Y. Las curvas de crecimiento correspondientes (OD_{600}) se detallan en la figura suplementaria S6.

En contraste y de manera consistente con los resultados obtenidos previamente, *Sm18/katN* presentó niveles de fluorescencia considerablemente menores que los de *Sm18/sodC1C2* en todas las condiciones evaluadas. No obstante, a pH 6.8 se observó un incremento gradual de la señal a lo largo del

experimento, mientras que a pH 5.5 la señal se mantuvo baja y sin cambios notables. Este comportamiento sugiere que las condiciones ácidas podrían afectar la actividad transcripcional de *katN* o influir en la fisiología celular de la bacteria.

Además, no se descarta que el patrón de expresión observado para la fusión Sm18/*sodC1C2* podría estar influenciado, al menos en parte, por su contexto genómico. Como se muestra en la figura 4-d, en el genoma de *S. maltophilia* Sm18, *sodC1* y *sodC2* se localizan de manera adyacente y con la misma orientación, lo que sugiere una posible regulación coordinada. Asimismo, la proximidad de estos genes a elementos regulatorios como *ntrC* sugiere que su expresión no depende exclusivamente del estrés oxidativo, sino también de otras redes regulatorias. Esta coregulación con un sistema de respuesta al estrés por nitrógeno y nutrientes posee un sentido biológico en el contexto intracelular; dentro de los fagosomas, el estrés oxidativo coexiste de manera estrecha con el estrés nitrosativo generado por el hospedero (como la producción de óxido nítrico, NO). De este modo, la cercanía a *ntrC* podría constituir un mecanismo de coordinación transcripcional para responder simultáneamente a la limitación de nutrientes y al ataque de ROS en la vacuola. Esta organización genómica podría contribuir a explicar la expresión basal observada en medio mínimo, así como las variaciones observadas en respuesta a cambios de pH y a distintos generadores de ROS. Sin embargo, en este estudio no se evaluaron directamente ni la influencia ni la relación con genes vecinos o reguladores asociados. En contraste, *katN* se encuentra ubicado en una región genómica aparentemente menos asociada a reguladores transcripcionales, lo que sugiere que su expresión podría depender de señales no evaluadas en este estudio.

En conjunto, estos resultados indican que Sm18/*sodC1C2* y Sm18/*katN* presentan patrones de expresión diferencial bajo condiciones de estrés oxidativo y acidificación. Mientras que *sodC1C2* mantuvo una elevada actividad basal y mostró variaciones moderadas dependientes del pH y del tipo de ROS, *katN* presentó una expresión más limitada y, aparentemente, más susceptible a las condiciones ácidas. Estos hallazgos sugieren que ambos sistemas antioxidantes podrían participar de manera distinta en la adaptación fisiológica de *S. maltophilia*. No obstante, estos

hallazgos fueron posteriormente complementados mediante el análisis de mutantes y estudios funcionales de la interacción con *A. castellanii* Neff, a fin de profundizar en la contribución fisiológica de *sodC1*, *sodC2* y *katN* durante la respuesta al estrés oxidativo y a condiciones de acidificación.

5.3 Análisis cuantitativo de la replicación intracelular de *S. maltophilia* Sm18 en co-cultivo con *A. castellanii* Neff.

Tras evaluar la respuesta de *S. maltophilia* Sm18 bajo distintas condiciones de estrés oxidativo y variaciones de pH en MM-MOPS y MM-MES, se analizó el comportamiento de las cepas de estudio durante su interacción con *A. castellanii* Neff mediante un sistema de co-cultivo. Este enfoque permitió evaluar la respuesta bacteriana en un contexto más dinámico y complejo.

Para ello, se realizó el co-cultivo de trofozoitos de *A. castellanii* Neff con *S. maltophilia* Sm18 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 durante 48 horas a 30°C en MM-MOPS. La actividad se evaluó mediante el monitoreo de las RFU.

5.3.1 Fusiones transcripcionales

Con el fin de evaluar el comportamiento funcional de los promotores asociados a genes antioxidantes durante la interacción con *A. castellanii* Neff, se evaluaron las fusiones transcripcionales Sm18/*sodA2*, Sm18/*sodB*, Sm18/*sodC1C2* y Sm18/*katN* en *S. maltophilia* Sm18 empleando como reportero fluorescente mScarlet-3 (Figura 13).

Sm18/*sodA2* presentó la mayor actividad promotora durante el co-cultivo con *A. castellanii* Neff, observándose un incremento marcado a partir de las 18-20 horas aproximadamente. Este comportamiento podría relacionarse con el proceso de adaptación de la bacteria a las condiciones generadas durante la interacción con la AVL. Más allá de una respuesta inmediata al estrés oxidativo agudo, el incremento tardío de la actividad promotora sugiere que este gen podría activarse por cambios fisiológicos en el sistema de co-cultivo, como la disponibilidad de nutrientes o la generación progresiva de ROS. Esto coincide con lo observado previamente en MM-MOPS y bajo estrés con MDs, donde *sodA2* mostró una alta actividad incluso en condiciones basales, lo que respalda la idea de que este gen participa

principalmente en la homeostasis redox asociada al metabolismo aeróbico. Estudios previos en *S. maltophilia* han reportado que SodA2 constituye la principal MnSOD involucrada en la detoxificación del superóxido y que su expresión presenta un patrón constitutivo asociado al crecimiento bacteriano más que a una inducción específica por estrés oxidativo (Jair *et al.*, 2019).

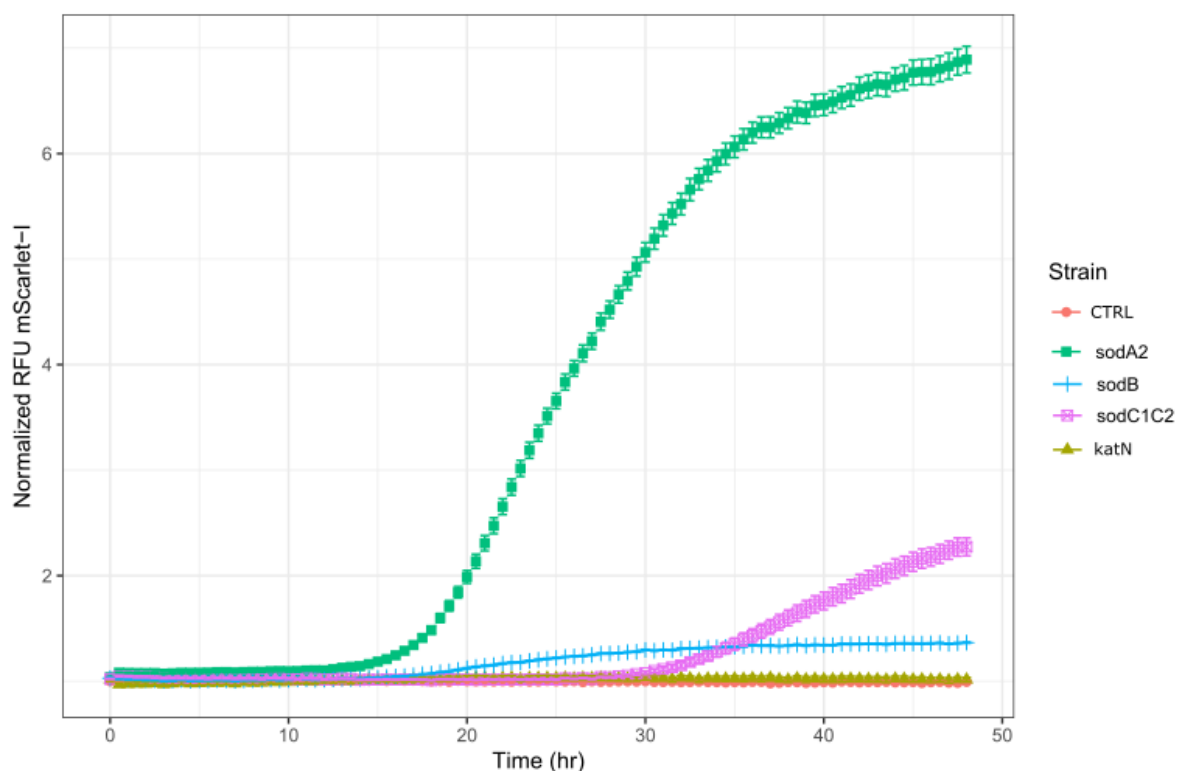


Figura 13. Cinética de expresión de las fusiones transcripcionales de genes antioxidantes durante el co-cultivo de *S. maltophilia* Sm18 con *A. castellanii* Neff. Durante la interacción, la respuesta transcripcional de la fusión *sodA2* destaca de manera contundente, mostrando una curva de inducción sigmoidea pronunciada que inicia entre las 18 y 20 horas postcontacto y continúa en ascenso hasta el final del ensayo. En un segundo plano, *sodC1C2* muestra una inducción muy tardía y moderada que comienza a despegar después de las 30 horas de interacción, mientras que la fusión *sodB* presenta únicamente un leve incremento basal y *katN* permanece completamente inactiva y superpuesta a la línea de la cepa control que contiene el plásmido vacío (CTRL). Las cepas portadoras de las fusiones transcripcionales construidas en el vector pSEVA337mScarlet3 fueron cocultivadas con trofozoitos de *A. castellanii* Neff en MM-MOPS a 25°C bajo una multiplicidad de infección (MOI) de 10 durante 48 horas. Como control (CTRL) se utilizó la cepa portadora del plásmido vacío. Las lecturas de puntos representan la media $\pm$ error estándar (SE) de $n = 6$ réplicas biológicas independientes, empleando el eje X para el tiempo de incubación (Time (hr)) y el eje Y para la fluorescencia relativa [RFU (Rel. Fluo. Units)].

Por el contrario, la fusión Sm18/*sodB* presentó un leve incremento durante el co-cultivo, aunque ligeramente superior al observado en condiciones previas de MM-MOPS suplementado con MSB. El bajo nivel de inducción observado para Sm18/*sodB* podría indicar que este gen no representa la principal respuesta frente al estrés generado durante el co-cultivo, aunque podría contribuir de manera secundaria al equilibrio redox bacteriano. Este comportamiento coincide con lo reportado previamente para *S. maltophilia*, en el que SodB presenta una contribución menor a la respuesta antioxidante global en comparación con SodA2 (Jair *et al.*, 2019).

Sm18/*sodC1C2* durante el co-cultivo presentó una inducción tardía (después de las 30 horas) y de menor magnitud, mostrando un patrón distinto al observado previamente en MM-MES a diferentes valores de pH, donde la actividad promotora permaneció a niveles altos durante todo el experimento, lo que sugiere que la regulación de Sm18/*sodC1C2* podría depender no solo del pH, sino también de factores adicionales generados durante el co-cultivo.

Aunque en *S. maltophilia* existe poca o nula información sobre las Cu/ZnSOD, en bacterias Gram negativas las enzimas SodC suelen localizarse en compartimentos periplásmicos o extracelulares y participan en la detoxificación de ROS derivados del ambiente o de la interacción con el hospedero (Schatzman & Culotta, 2018). En este contexto, la activación tardía observada en Sm18/*sodC1C2* podría relacionarse con cambios progresivos en el co-cultivo, como modificaciones en las condiciones oxidativas o en la disponibilidad de los metales necesarios para la actividad enzimática.

Finalmente, Sm18/*katN* no mostró cambios notorios durante el co-cultivo, un comportamiento consistente con lo observado previamente bajo distintas condiciones de estrés oxidativo y variaciones de pH, en las que tampoco presentó una inducción relevante.

En *S. maltophilia* se ha reportado que otros sistemas antioxidantes, en particular KatA2 y AhpCF, constituyen los principales mecanismos de detoxificación frente al peróxido de hidrógeno (Li *et al.*, 2020). Por ello, la baja actividad observada

de *katN* podría indicar una participación limitada de este gen en las condiciones evaluadas.

5.3.2 Mutantes por integración de vector.

La replicación intracelular de las mutantes Sm18::VIM*sodC2* y Sm18::VIM*katN* se evaluó mediante co-cultivos con *A. castellanii* Neff en MM-MOPS a 25°C durante 48 horas, utilizando mScarlet-I como marcador de fluorescencia (Figura 14). Como control, se empleó la cepa portadora del plásmido vacío. En comparación con el control, ambas mutantes presentaron cinéticas de fluorescencia distintas durante el co-cultivo, lo que indica una atenuación diferencial de su capacidad de adaptación al ambiente intracelular de la ameba.

Por un lado, en la figura 14, la mutante Sm18::VIM*sodC2* mostró una prolongada fase de latencia durante las primeras 20 horas del co-cultivo, lo que sugiere una adaptación menos eficiente en las etapas tempranas de adaptación y una incapacidad para replicarse al ritmo de la cepa control. Sin embargo, después de este tiempo, la cepa recuperó parcialmente la replicación, aunque sus niveles de fluorescencia se mantuvieron consistentemente por debajo de los del control. Este fenotipo es congruente con los resultados obtenidos previamente mediante fusiones transcripcionales, en los que el promotor de *sodC1C2* mostró actividad bajo condiciones de estrés oxidativo. En cultivo axénico, la expresión de Sm18/*sodC1C2* respondió principalmente a MSB (especialmente a pH neutro) y a H₂O₂. De manera consistente, durante el co-cultivo con *A. castellanii* Neff se observó un incremento progresivo de la expresión intracelular de Sm18/*sodC1C2*, lo que indica que este sistema antioxidante se activa de forma gradual durante la maduración del fagosoma.

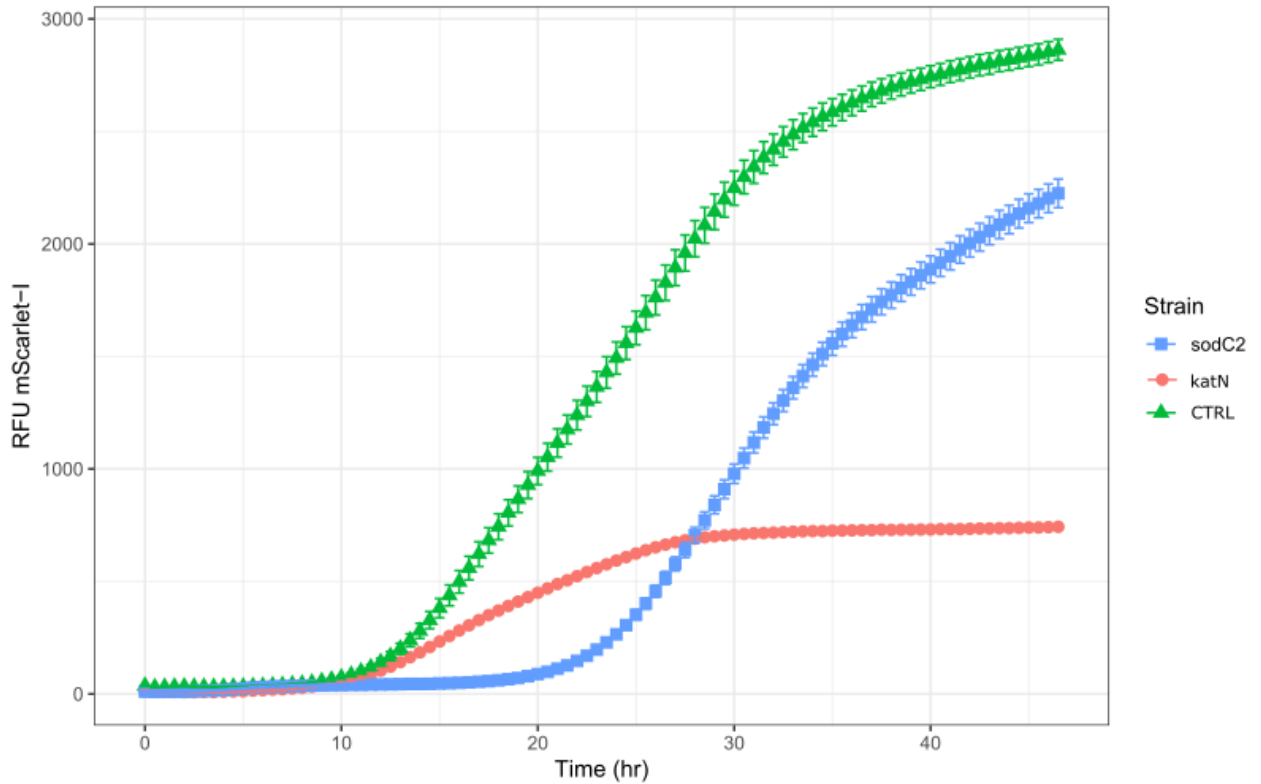


Figura 14. Replicación intracelular de las cepas mutantes por integración Sm18::VIMsodC2 y Sm18::VIMkatN en co-cultivo con trofozoítos de *A. castellanii* Neff. Las curvas evidencian que ambas mutantes presentan un fenotipo claro de atenuación en su replicación intracelular en comparación con el control de la cepa con el plásmido vacío (CTRL; triángulos verdes), que inicia su fase exponencial hacia las ~10 horas postcontacto. Específicamente, Sm18::VIMsodC2 (*sodC2*; cuadros azules) exhibe una prolongada fase de latencia de entre 15 y 20 horas que retrasa significativamente el inicio de su replicación, lo que le permite entrar posteriormente en una fase exponencial tardía con una tasa de crecimiento menor que la del control. Por su parte, Sm18::VIMkatN (*katN*; círculos rojos) mantiene una fase de latencia de ~10 horas y posteriormente muestra un leve incremento en sincronía con el control, pero presenta el impacto más notorio al estancarse de forma inmediata en una meseta de fluorescencia baja que se mantiene constante hasta el final de las 48 horas del experimento. Las cepas bacterianas marcadas constitutivamente con mScarlet-I fueron incubadas en MM-MOPS a 25°C bajo una MOI de 10 durante 48 horas. Como control (CTRL) se utilizó la cepa portadora del plásmido vacío. Las lecturas se realizaron cada 30 minutos en un lector de microplacas Synergy 2. Los valores graficados corresponden a la media $\pm$ el error estándar de $n = 8$ réplicas biológicas. El eje X representa el tiempo de incubación (hr) y el eje Y la fluorescencia del reportero (RFU mScarlet-I).

La correlación entre la inducción transcripcional observada para Sm18/*sodC1C2* y el fenotipo intracelular de la mutante Sm18::VIMsodC2 respalda la importancia funcional de esta SOD frente al estrés oxidativo presente en los fagosomas de *A. castellanii* Neff, sugiriendo que este sistema antioxidante se activa progresivamente durante la maduración del fagosoma. Considerando que este

microambiente hostil combina el estallido respiratorio con acidificación y limitación de nutrientes, la actividad de SodC2 parece ser un componente fundamental de la respuesta adaptativa temprana de *S. maltophilia* Sm18 en el hospedero.

En contraste, la mutante Sm18::VIM*katN* mostró un cese abrupto de su crecimiento en las primeras horas posinfección, manteniéndose en niveles basales de fluorescencia al inicio del ensayo. Sin embargo, de manera inesperada, la cepa exhibió una ligera recuperación en su replicación intracelular a partir de las ~10 horas, aunque alcanzó niveles de biomasa notablemente menores que la mutante *sodC2*. Este fenotipo de recuperación parcial llamó particularmente la atención porque, a diferencia de *sodC1C2*, las fusiones transcripcionales de *katN* no mostraron inducción evidente ni en condiciones axénicas bajo estrés oxidativo ni durante el co-cultivo con *A. castellanii* Neff.

Esta aparente discrepancia entre la ausencia de inducción transcripcional y el fenotipo observado para Sm18::VIM*katN* sugiere que la contribución de KatN durante la interacción con *A. castellanii* Neff podría depender de mecanismos distintos de la regulación transcripcional inducible. Es probable que los niveles transcripcionales basales sean suficientes y necesarios para mantener las funciones de detoxificación de H₂O₂. Alternativamente, la actividad de KatN podría estar sujeta a una regulación postranscripcional o depender directamente de la disponibilidad de cofactores metálicos.

En este contexto, resulta particularmente relevante el papel del Mn en la fisiología intracelular de Sm18. Estudios previos realizados en el grupo de trabajo (Argueta-Zepeda *et al.*, 2026) demostraron que la homeostasis de Mn contribuye de manera significativa a la defensa frente al estrés oxidativo y a la replicación intracelular de *S. maltophilia* Sm18 en los fagosomas de *A. castellanii* Neff. Dado que KatN es una catalasa dependiente de Mn, la funcionalidad de esta enzima in vivo podría estar dictada por la captación y la disponibilidad intracelular del metal más que por fluctuaciones en su tasa de transcripción. Esto podría explicar por qué la mutante Sm18::VIM*katN* presenta el genotipo intracelular mostrado aun cuando

las fusiones transcripcionales no mostraron inducción bajo las condiciones evaluadas.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la adaptación intracelular de Sm18 depende de una red antioxidante compleja en la que participan tanto sistemas de detoxificación de ROS como mecanismos de homeostasis metálica. Además, sugieren que la relevancia fisiológica de ciertos genes antioxidantes durante la interacción intracelular no necesariamente se relaciona con cambios en su expresión transcripcional.

Finalmente, estos hallazgos abren la posibilidad de evaluar en estudios futuros el comportamiento de estos genes bajo condiciones de limitación metálica, como las de Mn y Fe, con el fin de determinar cómo la disponibilidad de estos metales modula la respuesta oxidativa y la adaptación intracelular de *S. maltophilia* Sm18.

5.4 Análisis de la interacción intracelular entre *Acanthamoeba castellanii* Neff y *Stenotrophomonas maltophilia* Sm18 mediante microscopía de células vivas (LCI).

Los análisis de expresión realizados durante los co-cultivos con *A. castellanii* Neff mostraron que la fusión transcripcional Sm18/*sodA2* presentó los niveles de expresión más elevados entre las construcciones evaluadas, lo que sugiere una posible participación de este gen en la interacción bacteria-ameba (Figura 15). Con el fin de determinar si dicha expresión se observaba durante la interacción intracelular entre ambos organismos, se realizaron ensayos de microscopía de células vivas (LCI) empleando la fusión Sm18/*sodA2* marcada con mSc3.

Como se muestra en la Figura 15, se detectó fluorescencia asociada a bacterias internalizadas en trofozoítos de *A. castellanii* Neff tanto a las 3 horas como a las 22 horas postcontacto primario. Mientras que a las 3 h la señal se observó de forma puntual (Figura 15-A), la señal a las 22 horas fue más abundante y se distribuyó ampliamente en el interior de las amebas ocupando grandes porciones del espacio vacuolar (Figura 15-D y G). Asimismo, se observaron alteraciones morfológicas en algunos trofozoítos, como el redondeamiento celular (Figura 15-H),

lo que sugiere un impacto en la fisiología del hospedador debido a la alta carga bacteriana. Esto indica que las bacterias permanecen viables, transcripcionalmente activas y logran replicarse durante la interacción intracelular. Esto último concuerda con lo previamente reportado por el grupo donde se demostró que *S. maltophilia* Sm18 resiste la digestión por trofozoitos de *A. castellanii* Neff y puede replicarse en vacuolas acidificadas que contienen *Stenotrophomonas* (SCVs) de este fagocito profesional de vida libre (Rivera *et al.*, 2024). En contraste, las fusiones *sodB*, *katN* y *sodC1C2* generaron señales considerablemente más débiles bajo las mismas condiciones (datos no mostrados).

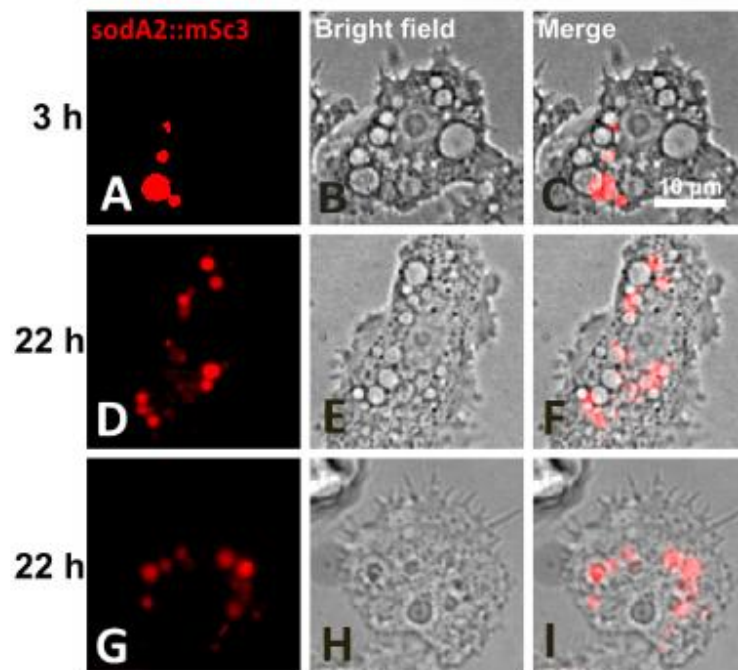


Figura 15. Expresión intracelular de *sodA2* en *S. maltophilia* Sm18 durante la interacción con *A. castellanii* Neff. Ensayos de microscopía de células vivas (LCI) de trofozoitos de *A. castellanii* infectados con Sm18/*sodA2*::mSc3. Se muestran imágenes representativas tomadas a las 3 horas y 22 horas postcontacto primario. (A, D, G) Canal de fluorescencia roja (mScarlet-3) que evidencia la expresión activa del gen *sodA2* en las bacterias internalizadas. (B, E, H) Imágenes en campo claro (Bright field) que muestran la morfología de los trofozoitos de la ameba y la presencia de vacuolas. (C, F, I) Superposición de imágenes (Merge) que muestra la localización y el incremento de la biomasa bacteriana en las vacuolas acidificadas que contienen *Stenotrophomonas* (SCVs). A las 22 horas postcontacto se observan alteraciones morfológicas en el hospedador, como el redondeamiento celular (H, I). Barra de escala = 10 µm.

Estos resultados son consistentes con las cinéticas de expresión obtenidas en los ensayos de co-cultivo, donde *sodA2* mostró los niveles de fluorescencia más altos entre todas las fusiones analizadas. Dado que uno de los mecanismos para limitar la supervivencia de los microorganismos fagocitados es el estrés oxidativo, la expresión de *sodA2* en las vacuolas de las células hospedadoras sugiere que esta SOD podría contribuir a la adaptación de *S. maltophilia* Sm18 al ambiente intracelular. En conjunto, estas observaciones respaldan la participación de la enzima SodA2 en la respuesta al estrés oxidativo durante la interacción entre la bacteria y la ameba.

6. CONCLUSIONES

La adaptación y supervivencia intracelular de *Stenotrophomonas maltophilia* Sm18 dentro de los fagosomas de *Acanthamoeba castellanii* Neff dependen de una red antioxidante coordinada espacial y temporalmente, en la que distintos sistemas de detoxificación actúan en etapas específicas para contrarrestar el estrés oxidativo acumulado. En el núcleo de esta respuesta, el gen *sodA2* se perfila como pieza central en el mantenimiento de la homeostasis redox bacteriana. Su elevada expresión constitutiva y su robusta inducción durante el co-cultivo demuestran que esta SOD citoplasmática es fundamental para mantener la viabilidad y facilitar la replicación masiva de la bacteria a largo plazo en las vacuolas acidificadas (SCVs).

En contraste, SodB parece desempeñar un rol secundario o estrictamente basal en la interacción intracelular. A diferencia de la robusta actividad de *sodA2*, la expresión intracelular de *sodB* permanece en niveles considerablemente bajos y sin inducciones significativas dentro del fagosoma, lo que sugiere que su contribución biológica no forma parte de la respuesta aguda frente al estallido oxidativo de la ameba, sino posiblemente del mantenimiento metabólico rutinario.

Esta respuesta antioxidante de la bacteria se divide en dos fases clave: una para resistir el choque oxidativo inicial y otra para adaptarse a la maduración del fagosoma. Por un lado, la catalasa no-hemínica KatN actúa como primera línea de defensa, indispensable para la supervivencia temprana. A pesar de que este gen no presenta una inducción transcripcional evidente frente a ROS exógenos, su pérdida

funcional imposibilita de inmediato la replicación bacteriana y estanca el crecimiento durante las primeras 10 horas de interacción. Este fenotipo demuestra que los niveles basales y constitutivos de KatN son críticos durante las etapas iniciales de la fagocitosis, lo que sugiere, además, una fuerte dependencia metabólica respecto a la disponibilidad y la captación de su cofactor metálico, el manganeso (Mn), en el nicho intracelular.

Por otro lado, el sistema periplásmico dependiente de Cu-Zn, SodC2, desempeña un papel complementario como amortiguador de estrés en etapas posteriores. La activación transcripcional tardía del locus *sodC1C2* durante el co-cultivo y la prolongada fase de latencia de 15-20 horas observada en la mutante de *sodC2* indican que la enzima no es requerida para resistir el estallido respiratorio temprano, pero probablemente garantiza una adaptación frente a la acumulación progresiva de ROS exógenas y la acidificación del fagosoma maduro, lo que permite que la bacteria retome una fase de crecimiento exponencial. Asimismo, la vinculación genómica de este locus con reguladores del metabolismo de nitrógeno sugiere que la respuesta mediada por este tipo de SODs no es un evento aislado, sino que puede formar parte de una estrategia transcripcional integrada para responder simultáneamente a la limitación de nutrientes y al estrés nitrosativo dentro de la vacuola.

En conjunto, esta investigación pone de manifiesto que la relevancia fisiológica de los genes antioxidantes estudiados no se determina exclusivamente por su perfil de inducción transcripcional. La discrepancia observada entre la casi nula actividad transcripcional de *katN* y el fenotipo de atenuación de su mutante proporciona evidencia sustancial de que las condiciones microambientales del fagosoma, en particular la restricción o la disponibilidad de cofactores metálicos, determinan la funcionalidad enzimática *in vivo*. Finalmente, el despliegue coordinado de esta maquinaria antioxidante permite a *S. maltophilia* Sm18 evadir la digestión celular, lo que le permite proliferar activamente hasta el punto de inducir alteraciones morfológicas severas en los trofozoitos de *A. castellanii*, subrayando así su éxito adaptativo frente a fagocitos profesionales de vida libre.

7. PERSPECTIVAS

A partir de los hallazgos y las interrogantes surgidas en el presente trabajo de investigación, se desprenden las siguientes directrices para la continuidad del proyecto:

- a. En primer lugar, resulta indispensable profundizar en la caracterización fisiológica de la catalasa KatN, particularmente bajo condiciones de disponibilidad y restricción de metales. Dado que estudios previos del grupo de trabajo evidenciaron la relevancia de la homeostasis de manganeso (Mn) en la replicación intracelular de *S. maltophilia* Sm18 (Argueta-Zepeda *et al.*, 2026), el siguiente paso metodológico consistirá en evaluar la cinética de expresión de *katN* en medios axénicos limitados en metales (Fe y Mn). Esto permitirá esclarecer si la funcionalidad *in vivo* de esta enzima no-hemínica depende de la disponibilidad del cofactor en el fagosoma.
- b. En segundo lugar, se plantea el rediseño y la optimización de las estrategias moleculares para lograr la clonación y la evaluación de la fusión transcripcional del gen *sodA1*. La caracterización de este locus es de alta prioridad biológica, ya que análisis bioinformáticos previos revelaron la presencia de cajas de regulación Sox en su región promotora (Figura 4-a). Lograr medir su expresión en co-cultivo con *A. castellanii* Neff permitirá contrastar su comportamiento con el de *sodA2* y determinar si existe una especialización funcional o cooperativa entre ambas SODs citoplasmáticas.
- c. Asimismo, la caracterización fenotípica se fortalecerá mediante la generación de mutantes por delección de los genes estudiados, acompañados de sus respectivos ensayos de complementación genética en plásmidos replicativos. Esto permitirá validar que los fenotipos de atenuación observados en las mutantes se deben exclusivamente a la pérdida del gen blanco y no a efectos polares secundarios.
- d. Finalmente, a largo plazo, se plantea estudiar la cascada de señalización molecular aguas arriba. Se propone identificar y caracterizar a los

reguladores transcripcionales globales (tales como OxyR, SoxR o el sistema NtrC) que gobiernan la red antioxidante bacteriana.

8. REFERENCIAS

- Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta*, 1804(2), 263-274. doi:10.1016/j.bbapap.2009.11.005
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*, 52(5), 399-451. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x
- Alexander, A., Singh, V. K., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Plant growth promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N₂ starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogea*. *PLoS One*, 14(9), e0222405. doi:10.1371/journal.pone.0222405
- American Type Culture Collection. *Acanthamoeba castellanii* (Douglas) Page, strain Neff (ATCC® 30010™). Retrieved from <https://www.atcc.org/products/30010>
- Anderson, A. J. G., Morrell, B., Lopez Campos, G., & Valvano, M. A. (2023). Distribution and diversity of type VI secretion system clusters in *Enterobacter bugandensis* and *Enterobacter cloacae*. *Microb Genom*, 9(12). doi:10.1099/mgen.0.001148
- Anwar, S., Alrumaihi, F., Sarwar, T., Babiker, A. Y., Khan, A. A., Prabhu, S. V., & Rahmani, A. H. (2024). Exploring Therapeutic Potential of Catalase: Strategies in Disease Prevention and Management. *Biomolecules*, 14(6). doi:10.3390/biom14060697
- Arguello, J. M., Raimunda, D., & Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 73. doi:10.3389/fcimb.2013.00073
- Argueta-Zepeda, F.-S., Rivera, J., Valerdi-Negreros, J. C., Rensing, C., & Vinuesa, P. (2026). Manganese homeostasis supports *Stenotrophomonas maltophilia* oxidative stress defense and replication in *Acanthamoeba castellanii* phagosomes. *Current Research in Microbial Sciences*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2026.100604>
- Ayadi, I., Lamrabet, O., Munoz-Ruiz, R., Jauslin, T., Guilhen, C., & Cosson, P. (2024). Extracellular and intracellular destruction of *Pseudomonas*

- aeruginosa* by *Dictyostelium discoideum* phagocytes mobilize different antibacterial mechanisms. *Mol Microbiol*, 121(1), 69-84. doi:10.1111/mmi.15197
- Balczun, C., & Scheid, P. L. (2017). Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses*, 9(4). doi:10.3390/v9040065
- Bartesaghi, S., & Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*, 14, 618-625. doi:10.1016/j.redox.2017.09.009
- Barwinska-Sendra, A., Garcia, Y. M., Sendra, K. M., Basle, A., Mackenzie, E. S., Tarrant, E., Card, P., Tabares, L. C., Bicep, C., Un, S., Kehl-Fie, T. E., & Waldron, K. J. (2020). An evolutionary path to altered cofactor specificity in a metalloenzyme. *Nat Commun*, 11(1), 2738. doi:10.1038/s41467-020-16478-0
- Becker, K. W., & Skaar, E. P. (2014). Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol Rev*, 38(6), 1235-1249. doi:10.1111/1574-6976.12087
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Bellini, N. K., Thiemann, O. H., Reyes-Batlle, M., Lorenzo-Morales, J., & Costa, A. O. (2022). A history of over 40 years of potentially pathogenic free-living amoeba studies in Brazil - a systematic review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 117, e210373. doi:10.1590/0074-02760210373
- Bernard, C., Locard-Paulet, M., Noel, C., Duchateau, M., Gai Gianetto, Q., Moumen, B., Rattei, T., Hechard, Y., Jensen, L. J., Matondo, M., & Samba-Louaka, A. (2022). A time-resolved multi-omics atlas of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Nat Commun*, 13(1), 4104. doi:10.1038/s41467-022-31832-0
- Bertelli, C., & Greub, G. (2012). Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 110. doi:10.3389/fcimb.2012.00110
- Blanco, P., Corona, F., Sanchez, M. B., & Martinez, J. L. (2017). Vitamin K(3) Induces the Expression of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeVWX Multidrug Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(5). doi:10.1128/AAC.02453-16
- Bornier, F., Zas, E., Potheret, D., Laaberki, M. H., Coupat-Goutaland, B., & Charpentier, X. (2021). Environmental Free-Living Amoebae Can Predate on Diverse Antibiotic-Resistant Human Pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 87(18), e0074721. doi:10.1128/AEM.00747-21
- Bozzaro, S. (2019). The past, present and future of *Dictyostelium* as a model system. *Int J Dev Biol*, 63(8-9-10), 321-331. doi:10.1387/ijdb.190128sb

- Brennan, R. E., Kiss, K., Baalman, R., & Samuel, J. E. (2015). Cloning, expression, and characterization of a *Coxiella burnetii* Cu/Zn Superoxide dismutase. *BMC Microbiol*, 15, 99. doi:10.1186/s12866-015-0430-8
- Broxton, C. N., & Culotta, V. C. (2016). SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection. *PLoS Pathog*, 12(1), e1005295. doi:10.1371/journal.ppat.1005295
- Case, A. J. (2017). On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*, 6(4). doi:10.3390/antiox6040082
- Castellani, A. (1930). An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *J Trop Med Hyg*, 33, 160.
- Cateau, E., Maisonneuve, E., Peguilhan, S., Quellard, N., Hechard, Y., & Rodier, M. H. (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* and *Vermamoeba vermiformis* relationships: bacterial multiplication and protection in amoeba-derived structures. *Res Microbiol*, 165(10), 847-851. doi:10.1016/j.resmic.2014.10.004
- Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol*, 6, 893. doi:10.3389/fmicb.2015.00893
- Chauviat, A., Meyer, T., & Favre-Bonte, S. (2023). Versatility of *Stenotrophomonas maltophilia*: Ecological roles of RND efflux pumps. *Heliyon*, 9(4), e14639. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e14639
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 61(2), 192-208. doi:10.1007/s00018-003-3206-5
- Chiang, S. M., & Schellhorn, H. E. (2012). Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys*, 525(2), 161-169. doi:10.1016/j.abb.2012.02.007
- Choaji, M., Samba-Louaka, A., Fechtali-Moute, Z., Aucher, W., & Pomel, S. (2025). Encystment and Excystment Processes in *Acanthamoeba castellanii*: An Emphasis on Cellulose Involvement. *Pathogens*, 14(3). doi:10.3390/pathogens14030268
- Clarke, M., Lohan, A. J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., Bertelli, C., Schilde, C., Kianianmomeni, A., Burglin, T. R., Frech, C., Turcotte, B., Kopec, K. O., Synnott, J. M., Choo, C., Paponov, I., Finkler, A., Heng Tan, C. S., Hutchins, A. P., Weinmeier, T., Rattei, T., Chu, J. S., Gimenez, G., Irimia, M., Rigden, D. J., Fitzpatrick, D. A., Lorenzo-Morales, J., Bateman, A., Chiu, C. H., Tang, P., Hegemann, P., Fromm, H., Raoult, D., Greub, G., Miranda-Saavedra, D., Chen, N., Nash, P., Ginger, M. L., Horn, M., Schaap, P., Caler, L., & Loftus, B. J. (2013). Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights

- extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol*, 14(2), R11. doi:10.1186/gb-2013-14-2-r11
- Crespo-Yanez, X., Oddy, J., Lamrabet, O., Jauslin, T., Marchetti, A., & Cosson, P. (2023). Sequential action of antibacterial effectors in *Dictyostelium discoideum* phagosomes. *Mol Microbiol*, 119(1), 74-85. doi:10.1111/mmi.15004
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., & Hechard, Y. (2013). Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res*, 47(19), 6958-6965. doi:10.1016/j.watres.2013.07.047
- Denet, E., Coupât-Goutaland, B., Nazaret, S., Pelandakis, M., & Favre-Bonte, S. (2017). Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitol Res*, 116(11), 3151-3162. doi:10.1007/s00436-017-5632-6
- Diaz-Ochoa, V. E., Lam, D., Lee, C. S., Klaus, S., Behnsen, J., Liu, J. Z., Chim, N., Nuccio, S. P., Rathi, S. G., Mastroianni, J. R., Edwards, R. A., Jacobo, C. M., Cerasi, M., Battistoni, A., Ouellette, A. J., Goulding, C. W., Chazin, W. J., Skaar, E. P., & Raffatellu, M. (2016). *Salmonella* Mitigates Oxidative Stress and Thrives in the Inflamed Gut by Evading Calprotectin-Mediated Manganese Sequestration. *Cell Host Microbe*, 19(6), 814-825. doi:10.1016/j.chom.2016.05.005
- Dunn, J. D., Bosmani, C., Barisch, C., Raykov, L., Lefrançois, L. H., Cardenal-Munoz, E., Lopez-Jimenez, A. T., & Soldati, T. (2017). Eat Prey, Live: *Dictyostelium discoideum* As a Model for Cell-Autonomous Defenses. *Front Immunol*, 8, 1906. doi:10.3389/fimmu.2017.01906
- Egan, M. S., de Macedo, R., & Zackular, J. P. (2024). Metals in the gut: microbial strategies to overcome nutritional immunity in the intestinal tract. *Metallomics*, 16(12). doi:10.1093/mtomcs/mfae052
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidalo, M. A., & Dang, P. M. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*, 273(1), 180-193. doi:10.1111/imr.12447
- Erinmez, M., Askin, F. N., & Zer, Y. (2024). *Stenotrophomonas maltophilia* outbreak in a university hospital: epidemiological investigation and literature review of an emerging healthcare-associated infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 66, e46. doi:10.1590/S1678-9946202466046
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., & Collet, J. F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 15(7), 385-396. doi:10.1038/nrmicro.2017.26
- Farooq, A., Kanwal, R., Bashir, K., Tian, X., Chen, Y., Liu, D., Zhang, L., Xiang, Q., Zhao, K., Yu, X., Chen, Q., Penttinen, P., & Gu, Y. (2025). Multi-omics analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* S-11 reveals its potential for

- Pb(2+) bioremediation in contaminated soil. *J Hazard Mater*, 495, 138867. doi:10.1016/j.jhazmat.2025.138867
- Frye, K. A., Sendra, K. M., Waldron, K. J., & Kehl-Fie, T. E. (2022). Old dogs, new tricks: New insights into the iron/manganese superoxide dismutase family. *J Inorg Biochem*, 230, 111748. doi:10.1016/j.jinorgbio.2022.111748
- Fujiki, Y., & Bassik, M. C. (2021). A New Paradigm in Catalase Research. *Trends Cell Biol*, 31(3), 148-151. doi:10.1016/j.tcb.2020.12.006
- Garcia, C. A., Alcaraz, E. S., Franco, M. A., & Passerini de Rossi, B. N. (2015). Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. *Front Microbiol*, 6, 926. doi:10.3389/fmicb.2015.00926
- García, G., Girón, J. A., Yañez, J. A., & Cedillo, M. L. (2023). *Stenotrophomonas maltophilia* and Its Ability to Form Biofilms. *Microbiology Research*, 14(1), 1-20. doi:10.3390/microbiolres14010001
- Glorieux, C., & Buc Calderon, P. (2024). Targeting catalase in cancer. *Redox Biol*, 77, 103404. doi:10.1016/j.redox.2024.103404
- Gomes, M. P., Kitamura, R. S. A., Marques, R. Z., Barbato, M. L., & Zamocky, M. (2022). The Role of H₂O₂-Scavenging Enzymes (Ascorbate Peroxidase and Catalase) in the Tolerance of *Lemna minor* to Antibiotics: Implications for Phytoremediation. *Antioxidants (Basel)*, 11(1). doi:10.3390/antiox11010151
- Grechnikova, M., Arbon, D., Zeniskova, K., Malych, R., Mach, J., Krejbichova, L., Simackova, A., & Sutak, R. (2022). Elucidation of iron homeostasis in *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Parasitol*, 52(8), 497-508. doi:10.1016/j.ijpara.2022.03.007
- Gu, M., & Imlay, J. A. (2013). Superoxide poisons mononuclear iron enzymes by causing mismetallation. *Mol Microbiol*, 89(1), 123-134. doi:10.1111/mmi.12263
- Guimaraes, A. J., Gomes, K. X., Cortines, J. R., Peralta, J. M., & Peralta, R. H. (2016). *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res*, 193, 30-38. doi:10.1016/j.micres.2016.08.001
- Gulcin, I. (2025). Antioxidants: a comprehensive review. *Arch Toxicol*, 99(5), 1893-1997. doi:10.1007/s00204-025-03997-2
- Hansberg, W. (2022). Monofunctional Heme-Catalases. *Antioxidants (Basel)*, 11(11). doi:10.3390/antiox11112173
- Harada, M., Akiyama, A., Furukawa, R., Yokobori, S. I., Tajika, E., & Yamagishi, A. (2021). Evolution of Superoxide Dismutases and Catalases in *Cyanobacteria*: Occurrence of the Antioxidant Enzyme Genes before the Rise of Atmospheric Oxygen. *J Mol Evol*, 89(8), 527-543. doi:10.1007/s00239-021-10021-5
- Hay, A., Aucher, W., Pigeault, R., Bertaux, J., Crepin, A., Remaury, Q. B., Hechard, Y., Samba-Louaka, A., & Villegier, R. (2025). *Legionella pneumophila*

- subverts the antioxidant defenses of its amoeba host *Acanthamoeba castellanii*. *Curr Res Microb Sci*, 8, 100338. doi:10.1016/j.crmicr.2024.100338
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev*, 116(5), 3029-3085. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00407
- Healy, C., Munoz-Wolf, N., Strydom, J., Faherty, L., Williams, N. C., Kenny, S., Donnelly, S. C., & Cloonan, S. M. (2021). Nutritional immunity: the impact of metals on lung immune cells and the airway microbiome during chronic respiratory disease. *Respir Res*, 22(1), 133. doi:10.1186/s12931-021-01722-y
- Hernández Castellanos, J. L. C. G., Rodrigo, Montañez Soto, J. L., Hernández Castellanos, N. D., Pérez Vargas, M. A., Cruz Hernández, A., & Chaires Martínez, L. (2021). Biodegradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados por *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* en microcosmos del suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 37, 53889. doi:<https://doi.org/10.20937/rica.53889>
- Hmelo, L. R., Borlee, B. R., Almblad, H., Love, M. E., Randall, T. E., Tseng, B. S., Lin, C., Irie, Y., Storek, K. M., Yang, J. J., Siehnell, R. J., Howell, P. L., Singh, P. K., Tolker-Nielsen, T., Parsek, M. R., Schweizer, H. P., & Harrison, J. J. (2015). Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat Protoc*, 10(11), 1820-1841. doi:10.1038/nprot.2015.115
- Hong, Z. B., Huang, J. M., Tsai, C. M., & Lin, W. C. (2022). Potential role of *Acanthamoeba* Rab7. *Exp Parasitol*, 239, 108312. doi:10.1016/j.exppara.2022.108312
- Huang, W., & Wilks, A. (2017). A rapid seamless method for gene knockout in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*, 17(1), 199. doi:10.1186/s12866-017-1112-5
- Ighodaro, O. A., OA. (2018). First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001
- Islam, M. N., Rauf, A., Fahad, F. I., Emran, T. B., Mitra, S., Olatunde, A., Shariati, M. A., Rebezov, M., Rengasamy, K. R. R., & Mubarak, M. S. (2022). Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62(26), 7282-7300. doi:10.1080/10408398.2021.1913400
- Jair, H. W., Lu, H. F., Huang, Y. W., Pan, S. Y., Lin, I. L., Huang, H. H., & Yang, T. C. (2019). Roles of the Two-MnSOD System of *Stenotrophomonas maltophilia* in the Alleviation of Superoxide Stress. *Int J Mol Sci*, 20(7). doi:10.3390/ijms20071770

- Jauslin, T., Lamrabet, O., Crespo-Yanez, X., Marchetti, A., Ayadi, I., Ifrid, E., Guilhen, C., Leippe, M., & Cosson, P. (2021). How Phagocytic Cells Kill Different Bacteria: a Quantitative Analysis Using *Dictyostelium discoideum*. *mBio*, 12(1). doi:10.1128/mBio.03169-20
- Johnson, L. A., & Hug, L. A. (2019). Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. *Free Radic Biol Med*, 140, 93-102. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.032
- Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Awang Hamat, R., & Neela, V. K. (2018). Iron and Virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*: All We Know So Far. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 401. doi:10.3389/fcimb.2018.00401
- Kim, M. J., Moon, E. K., Jo, H. J., Quan, F. S., & Kong, H. H. (2023). Phagocytosis-associated genes in *Acanthamoeba castellanii* feeding on *Escherichia coli*. *Parasites Hosts Dis*, 61(4), 397-404. doi:10.3347/PHD.23088
- Kodirov, S. A. (2025). Comparison of Superoxide Dismutase Activity at the Cell, Organ, and Whole-Body Levels. *Cell Biochem Biophys*, 83(3), 2713-2726. doi:10.1007/s12013-025-01708-3
- Konig, L., Wentrup, C., Schulz, F., Wascher, F., Escola, S., Swanson, M. S., Buchrieser, C., & Horn, M. (2019). Symbiont-Mediated Defense against *Legionella pneumophila* in *Amoebae*. *mBio*, 10(3). doi:10.1128/mBio.00333-19
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., & Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*, 11(3), e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651
- LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 6, Unit 6E 1. doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25
- Ladomersky, E., & Petris, M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 7(6), 957-964. doi:10.1039/c4mt00327f
- Lartigue, A., Burlat, B., Coutard, B., Chaspoul, F., Claverie, J. M., & Abergel, C. (2015). The megavirus chilensis Cu,Zn-superoxide dismutase: the first viral structure of a typical cellular copper chaperone-independent hyperstable dimeric enzyme. *J Virol*, 89(1), 824-832. doi:10.1128/JVI.02588-14
- Li, L. H., Shih, Y. L., Huang, J. Y., Wu, C. J., Huang, Y. W., Huang, H. H., Tsai, Y. C., & Yang, T. C. (2020). Protection from hydrogen peroxide stress relies mainly on AhpCF and KatA2 in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Biomed Sci*, 27(1), 37. doi:10.1186/s12929-020-00631-4
- Liu, A. (2024). Catalase-peroxidase (KatG): a potential frontier in tuberculosis drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 59(6), 434-446. doi:10.1080/10409238.2025.2470630

- Liu, T., Shang, J., & Chen, Q. (2025). Superoxide Dismutases in Immune Regulation and Infectious Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 14(7). doi:10.3390/antiox14070809
- Lopez, C. A., & Skaar, E. P. (2018). The Impact of Dietary Transition Metals on Host-Bacterial Interactions. *Cell Host Microbe*, 23(6), 737-748. doi:10.1016/j.chom.2018.05.008
- Lopez, M. B., Oterino, M. B., & Gonzalez, J. M. (2024). The Structural Biology of Catalase Evolution. *Subcell Biochem*, 104, 33-47. doi:10.1007/978-3-031-58843-3_3
- Maita, C., Matsushita, M., Miyoshi, M., Okubo, T., Nakamura, S., Matsuo, J., Takemura, M., Miyake, M., Nagai, H., & Yamaguchi, H. (2018). Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* protects host amoebae against *Legionella pneumophila* infection by preventing *Legionella* entry. *Microbes Infect*, 20(4), 236-244. doi:10.1016/j.micinf.2017.12.012
- Martinhalet, D., & Walch, M. (2021). Editorial: The Role of Reactive Oxygen Species in Protective Immunity. *Front Immunol*, 12, 832946. doi:10.3389/fimmu.2021.832946
- Matthey-Doret, C., Colp, M. J., Escoll, P., Thierry, A., Moreau, P., Curtis, B., Sahr, T., Sarrasin, M., Gray, M. W., Lang, B. F., Archibald, J. M., Buchrieser, C., & Koszul, R. (2022). Chromosome-scale assemblies of *Acanthamoeba castellanii* genomes provide insights into *Legionella pneumophila* infection-related chromatin reorganization. *Genome Res*, 32(9), 1698-1710. doi:10.1101/gr.276375.121
- McBee, M. E., Chionh, Y. H., Sharaf, M. L., Ho, P., Cai, M. W., & Dedon, P. C. (2017). Production of Superoxide in Bacteria Is Stress- and Cell State-Dependent: A Gating-Optimized Flow Cytometry Method that Minimizes ROS Measurement Artifacts with Fluorescent Dyes. *Front Microbiol*, 8, 459. doi:10.3389/fmicb.2017.00459
- Metzemaekers, M., Gouwy, M., & Proost, P. (2020). Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*, 17(5), 433-450. doi:10.1038/s41423-020-0412-0
- Mikhailovich, V., Heydarov, R., Zimenkov, D., & Chebotar, I. (2024). *Stenotrophomonas maltophilia* virulence: a current view. *Front Microbiol*, 15, 1385631. doi:10.3389/fmicb.2024.1385631
- Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett*, 586(5), 585-595. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.048
- Monteith, A. J., & Skaar, E. P. (2021). The impact of metal availability on immune function during infection. *Trends Endocrinol Metab*, 32(11), 916-928. doi:10.1016/j.tem.2021.08.004

- Mou, Q., & Leung, P. H. M. (2018). Differential expression of virulence genes in *Legionella pneumophila* growing in *Acanthamoeba* and human monocytes. *Virulence*, 9(1), 185-196. doi:10.1080/21505594.2017.1373925
- Najmuldeen, H., Alghamdi, R., Alghofaili, F., & Yesilkaya, H. (2019). Functional assessment of microbial superoxide dismutase isozymes suggests a differential role for each isozyme. *Free Radic Biol Med*, 134, 215-228. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.018
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 9613090. doi:10.1155/2019/9613090
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 373. doi:10.3389/fcimb.2017.00373
- Nugraha, D. K., Nishida, T., Tamaki, Y., Hiramatsu, Y., Yamaguchi, H., & Horiguchi, Y. (2023). Survival of *Bordetella bronchiseptica* in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiol Spectr*, 11(2), e0048723. doi:10.1128/spectrum.00487-23
- Ochoa-Sanchez, L. E., & Vinuesa, P. (2017). Evolutionary Genetic Analysis Uncovers Multiple Species with Distinct Habitat Preferences and Antibiotic Resistance Phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* Complex. *Front Microbiol*, 8, 1548. doi:10.3389/fmicb.2017.01548
- Pages, D., Rose, J., Conrod, S., Cuine, S., Carrier, P., Heulin, T., & Achouak, W. (2008). Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*, 3(2), e1539. doi:10.1371/journal.pone.0001539
- Pan, L., Luo, Y., Wang, J., Li, X., Tang, B., Yang, H., Hou, X., Liu, F., & Zou, X. (2022). Evolution and functional diversification of catalase genes in the green lineage. *BMC Genomics*, 23(1), 411. doi:10.1186/s12864-022-08621-6
- Pedron, T., Mulet, C., Dauga, C., Frangeul, L., Chervaux, C., Grompone, G., & Sansonetti, P. J. (2012). A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *mBio*, 3(3). doi:10.1128/mBio.00116-12
- Piacenza, L., Trujillo, M., & Radi, R. (2019). Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J Exp Med*, 216(3), 501-516. doi:10.1084/jem.20181886
- Pompilio, A., Ranalli, M., Piccirilli, A., Perilli, M., Vukovic, D., Savic, B., Krutova, M., Drevinek, P., Jonas, D., Fiscarelli, E. V., Tuccio Guarna Assanti, V., Tavio, M. M., Artilles, F., & Di Bonaventura, G. (2020). Biofilm Formation among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Has Clinical Relevance: The ANSELM Prospective Multicenter Study. *Microorganisms*, 9(1). doi:10.3390/microorganisms9010049
- Pompilio, A., Savini, V., Fiscarelli, E., Gherardi, G., & Di Bonaventura, G. (2020). Clonal Diversity, Biofilm Formation, and Antimicrobial Resistance among

- Stenotrophomonas maltophilia* Strains from Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients. *Antibiotics (Basel)*, 9(1). doi:10.3390/antibiotics9010015
- Porfirio-Sousa, A. L., Tice, A. K., Brown, M. W., & D, J. G. L. (2022). Phylogenetic reconstruction and evolution of the Rab GTPase gene family in Amoebozoa. *Small GTPases*, 13(1), 100-113. doi:10.1080/21541248.2021.1903794
- Purkan, P., Ihsanawati, I., Natalia, D., Syah, Y. M., Retnoningrum, D. S., & Siswanto, I. (2018). Molecular Analysis of katG Encoding Catalase-Peroxidase from Clinical Isolate of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Life*, 11(2), 160-167.
- Ramakrishnan, S., Muruganraj, T., Majumdar, R., & Sugumar, S. (2023). Study of Cadmium Metal Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Indian J Microbiol*, 63(1), 91-99. doi:10.1007/s12088-023-01066-9
- Rayamajhee, B., Willcox, M. D. P., Henriquez, F. L., Petsoglou, C., Subedi, D., & Carnt, N. (2022). *Acanthamoeba*, an environmental phagocyte enhancing survival and transmission of human pathogens. *Trends Parasitol*, 38(11), 975-990. doi:10.1016/j.pt.2022.08.007
- Rello, J., Kalwaje Eshwara, V., Lagunes, L., Alves, J., Wunderink, R. G., Conway-Morris, A., Rojas, J. N., Alp, E., & Zhang, Z. (2019). A global priority list of the TOP TEN resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38(2), 319-323. doi:10.1007/s10096-018-3428-y
- Remacle-Bonnet, M., Kaplanski, S., & Depieds, R. (1973). [Presence of a mitogenic factor in the soluble extracts of colonic tumors]. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*, 277(6), 599-601.
- Rivera, J., Valerdi-Negreiros, J. C., Vazquez-Enciso, D. M., Argueta-Zepeda, F. S., & Vinuesa, P. (2024). Phylogenomic, structural, and cell biological analyses reveal that *Stenotrophomonas maltophilia* replicates in acidified Rab7A-positive vacuoles of *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiol Spectr*, 12(3), e0298823. doi:10.1128/spectrum.02988-23
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*, 2017, 9042851. doi:10.1155/2017/9042851
- Salah, I. B., Ghigo, E., & Drancourt, M. (2009). Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*, 15(10), 894-905. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03011.x
- Sanguino-Jorquera, D. G., Rajal, V. B., Juarez, M. M., Poma, H. R., & Irazusta, V. P. (2022). *Acanthamoeba* and a bacterial endocytobiont isolated from recreational freshwaters. *Parasitol Res*, 121(12), 3693-3699. doi:10.1007/s00436-022-07651-z
- Schatzman, S. S., & Culotta, V. C. (2018). Chemical Warfare at the Microorganismal Level: A Closer Look at the Superoxide Dismutase Enzymes of Pathogens. *ACS Infect Dis*, 4(6), 893-903. doi:10.1021/acsinfecdis.8b00026

- Scheid, P. (2014). Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol Res*, 113(7), 2407-2414. doi:10.1007/s00436-014-3932-7
- Schroder, K. (2019). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Dosis facit venenum. *Exp Physiol*, 104(4), 447-452. doi:10.1113/EP087125
- Sharma, P., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2024). Biofertilizer and biocontrol properties of *Stenotrophomonas maltophilia* BCM emphasize its potential application for sustainable agriculture. *Front Plant Sci*, 15, 1364807. doi:10.3389/fpls.2024.1364807
- Sharma, P., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2025). *Stenotrophomonas maltophilia* promotes wheat growth by enhancing nutrient assimilation and rhizosphere microbiota modulation. *Front Bioeng Biotechnol*, 13, 1563670. doi:10.3389/fbioe.2025.1563670
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev*, 114(7), 3854-3918. doi:10.1021/cr4005296
- Simon, R., Priefer, U. B., & Pühler, A. J. B. T. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. 1, 784-791.
- Sobota, J. M., Gu, M., & Imlay, J. A. (2014). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide poison 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase, the first committed enzyme in the aromatic biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 196(11), 1980-1991. doi:10.1128/JB.01573-14
- Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*, 275(13), 3249-3277. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06488.x
- Takahashi, I., Hosomi, K., Nagatake, T., Toubou, H., Yamamoto, D., Hayashi, I., Kurashima, Y., Sato, S., Shibata, N., Goto, Y., Maruyama, F., Nakagawa, I., Kuwae, A., Abe, A., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2020). Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int Immunol*, 32(2), 133-141. doi:10.1093/intimm/dxz071
- Tidhar, A., Rushing, M. D., Kim, B., & Slauch, J. M. (2015). Periplasmic superoxide dismutase SodCI of *Salmonella* binds peptidoglycan to remain tethered within the periplasm. *Mol Microbiol*, 97(5), 832-843. doi:10.1111/mmi.13067
- Tondo, M. L., de Pedro-Jove, R., Vandecaveye, A., Piskulic, L., Orellano, E. G., & Valls, M. (2020). KatE From the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Is a Monofunctional Catalase Controlled by HrpG That Plays a Major Role in Bacterial Survival to Hydrogen Peroxide. *Front Plant Sci*, 11, 1156. doi:10.3389/fpls.2020.01156

- Trifonova, A., & Strateva, T. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* - a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infect Dis (Lond)*, 51(3), 168-178. doi:10.1080/23744235.2018.1531145
- Van Acker, H., & Coenye, T. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol*, 25(6), 456-466. doi:10.1016/j.tim.2016.12.008
- Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., & Blokesch, M. (2016). An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba menad*. *ISME J*, 10(4), 897-910. doi:10.1038/ismej.2015.165
- Van der Henst, C., Vanhove, A. S., Drebes Dorr, N. C., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Clerc, S., Scignari, T., Maclachlan, C., Knott, G., & Blokesch, M. (2018). Molecular insights into *Vibrio cholerae*'s intra-amoebal host-pathogen interactions. *Nat Commun*, 9(1), 3460. doi:10.1038/s41467-018-05976-x
- Vinuesa, P., Argueta-Zepeda, F. S., Valerdi-Negreros, J. C., Vazquez-Enciso, D. M., Osorio-Herrera, M. D., Gutierrez-Hernandez, D., Mendoza-Gomez, K., Rivera, J., & Ochoa-Sanchez, L. E. (2026). Complete genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18), a Mexican environmental multidrug- and amoeba-resistant strain. *Microbiol Resour Announc*, e0130425. doi:10.1128/mra.01304-25
- Vinuesa, P., Ochoa-Sanchez, L. E., & Contreras-Moreira, B. (2018). GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. *Front Microbiol*, 9, 771. doi:10.3389/fmicb.2018.00771
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 50(1), 1-26. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x
- Wan, B., Zhang, Q., Ni, J., Li, S., Wen, D., Li, J., Xiao, H., He, P., Ou, H. Y., Tao, J., Teng, Q., Lu, J., Wu, W., & Yao, Y. F. (2017). Type VI secretion system contributes to *Enterohemorrhagic Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathog*, 13(3), e1006246. doi:10.1371/journal.ppat.1006246
- Wang, Y., Branicky, R., Noe, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*, 217(6), 1915-1928. doi:10.1083/jcb.201708007
- Whittaker, J. W. (2012). Non-heme manganese catalase--the 'other' catalase. *Arch Biochem Biophys*, 525(2), 111-120. doi:10.1016/j.abb.2011.12.008
- Xu, X., Pan, M., & Jin, T. (2021). How Phagocytes Acquired the Capability of Hunting and Removing Pathogens From a Human Body: Lessons Learned From

- Chemotaxis and Phagocytosis of *Dictyostelium discoideum* (Review). *Front Cell Dev Biol*, 9, 724940. doi:10.3389/fcell.2021.724940
- Yuan, F., Yin, S., Xu, Y., Xiang, L., Wang, H., Li, Z., Fan, K., & Pan, G. (2021). The Richness and Diversity of Catalases in Bacteria. *Front Microbiol*, 12, 645477. doi:10.3389/fmicb.2021.645477
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 33(3), 337-349. doi:10.1016/s0891-5849(02)00905-x
- Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., Guo, C., & Wang, X. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Rep*, 27(1), 45-52. doi:10.1080/13510002.2022.2046423
- Zhang, M., Qin, Y., Huang, L., Yan, Q., Mao, L., Xu, X., Wang, S., Zhang, M., & Chen, L. (2019). The role of *sodA* and *sodB* in *Aeromonas hydrophila* resisting oxidative damage to survive in fish macrophages and escape for further infection. *Fish Shellfish Immunol*, 88, 489-495. doi:10.1016/j.fsi.2019.03.021
- Zhang, T., Wu, H., Ma, C., Yang, Y., Li, H., Yang, Z., Zhou, S., Shi, D., Chen, T., Yang, D., Li, J., & Jin, M. (2024). Emergence of colistin-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* with high virulence in natural aquatic environments. *Sci Total Environ*, 933, 173221. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.173221
- Ziegler, C. S., Bouchab, L., Tramier, M., Durand, D., Fieschi, F., Dupre-Crochet, S., Merola, F., Nusse, O., & Erard, M. (2019). Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 294(11), 3824-3836. doi:10.1074/jbc.RA118.006864

9. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ensamblaje y arquitectura funcional del complejo NADPH oxidasa NOX2.18	
Figura 2. Complejo NOXA_NEFF2.	20
Figura 3. Análisis filogenómico de superóxido dismutasas y catalasas en <i>Stenotrophomonas</i> y géneros relacionados.	29
Figura 4. Entorno genético de las cinco SODs codificadas en el genoma de <i>S. maltophilia</i> ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18).	31
Figura 5. Entorno genético de las tres KATs codificadas en el genoma de <i>S. maltophilia</i> ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18).	32
Figura 6. Modelo esquemático del estrés oxidativo generado durante la interacción entre <i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Sm18, y de los sistemas antioxidantes bacterianos implicados.	33
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>S. maltophilia</i> Sm18 (WT) bajo estrés oxidativo por MSB.	46
Figura 8. Cinética de crecimiento y tolerancia de <i>S. maltophilia</i> Sm18 frente a MSB en medio mínimo.	47
Figura 9. Cinética de crecimiento y tolerancia de <i>S. maltophilia</i> Sm18 frente a H ₂ O ₂ en medio mínimo.	49
Figura 10. Cinética de la expresión de fusiones transcripcionales en <i>S. maltophilia</i> Sm18 bajo condiciones de estrés oxidativo por MSB.	50
Figura 11. Cinética de expresión de las fusiones transcripcionales Sm18/ <i>sodC1C2</i> (C1C2) y Sm18/ <i>katN</i> (Kat) en <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Sm18 bajo estrés oxidativo inducido por MSB y H ₂ O ₂	54
Figura 12. Cinética de expresión de las fusiones transcripcionales Sm18/ <i>sodC1C2</i> (C1C2) y Sm18/ <i>katN</i> (Kat) en <i>S. maltophilia</i> Sm18 bajo variaciones de pH y estrés oxidativo.	56
Figura 13. Cinética de expresión de las fusiones transcripcionales de genes antioxidantes durante el co-cultivo de <i>S. maltophilia</i> Sm18 con <i>A. castellanii</i> Neff.	59
Figura 14. Replicación intracelular de las cepas mutantes por integración Sm18:: <i>VIMsodC2</i> y Sm18:: <i>VIMkatN</i> en co-cultivo con trofozoítos de <i>A. castellanii</i> Neff.	62
Figura 15. Expresión intracelular de <i>sodA2</i> en <i>S. maltophilia</i> Sm18 durante la interacción con <i>A. castellanii</i> Neff.	65

9.1 Figuras suplementarias

Figura S 1. Cinética de crecimiento de <i>S. maltophilia</i> Sm18 frente a concentraciones inhibitorias de H ₂ O ₂ en medio mínimo.	85
Figura S2. Mapa del vector reportero pSEVA337mSc3 (3649 pb) utilizado para fusiones transcripcionales.	86
Figura S3. Mapa del vector pEX18TcVIM_mScI (5629 pb).	87
Figura S4. Mapa del vector pEX18CmVIM_mScI (4959 pb).	88
Figura S5. Cinética de crecimiento (OD ₆₀₀) durante la expresión de fusiones transcripcionales en <i>S. maltophilia</i> Sm18 bajo condiciones de estrés oxidativo por MSB.	89
Figura S6. Cinética de crecimiento (OD ₆₀₀) de las fusiones transcripcionales Sm18/ <i>sodC1C2</i> (C1C2) y Sm18/ <i>katN</i> (Kat) en <i>S. maltophilia</i> Sm18 bajo estrés oxidativo inducido por MSB y H ₂ O ₂	90
Figura S7. Cinética de crecimiento (OD ₆₀₀) de las fusiones transcripcionales Sm18/ <i>sodC1C2</i> (C1C2) y Sm18/ <i>katN</i> (Kat) en <i>S. maltophilia</i> Sm18 bajo variaciones de pH y estrés oxidativo.	91

10.ÍNDICE DE TABLAS

Tabla S1. Cepas usadas y construidas en este trabajo.....	92
Tabla S2. Vectores utilizados y construidos en este trabajo	92
Tabla S3. Oligos utilizados.....	94
Tabla S4. Condiciones empleadas de PCR con la enzima ADN polimerasa Phusion para la amplificación de los genes de interés.....	94

11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

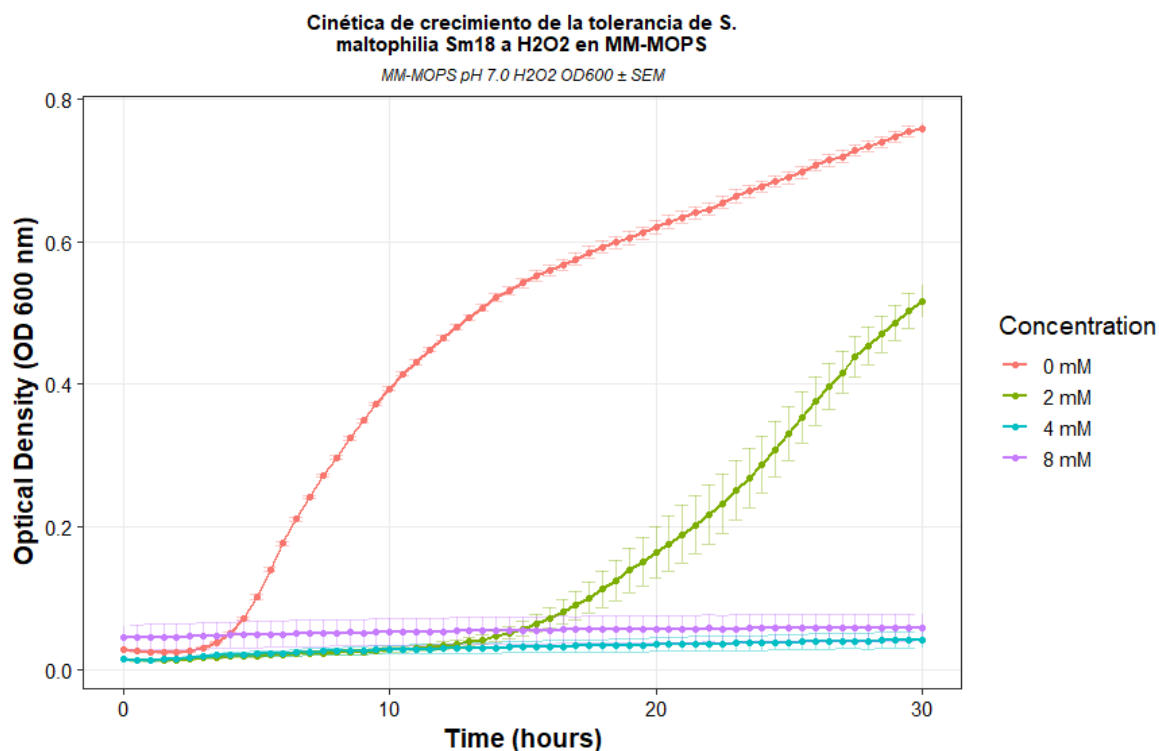


Figura S 1. Cinética de crecimiento de *S. maltophilia* Sm18 frente a concentraciones inhibitorias de H₂O₂ en medio mínimo. El rango inicial de tolerancia se evaluó en MM-MOPS con concentraciones letales de 4 y 8 mM de H₂O₂, que inhibieron por completo el desarrollo celular y provocaron una inhibición total del crecimiento bacteriano. A la dosis de 2 mM se observó un crecimiento tardío, con un marcado retraso en la fase lag, lo que estableció este valor como el límite superior no letal para los ensayos cinéticos posteriores. Las lecturas de densidad óptica (OD₆₀₀) se registraron en placas de 96 pozos cada 30 minutos a 30 °C utilizando un lector BioTek Epoch 2, presentándose las primeras 30 horas de seguimiento continuo. Los datos representan el promedio ± SEM obtenido a partir de n = 2 réplicas biológicas independientes (cada una con 6 réplicas técnicas), con el tiempo (Time (hours)) en el eje X y la densidad óptica (Optical Density (OD 600 nm)) en el eje Y.

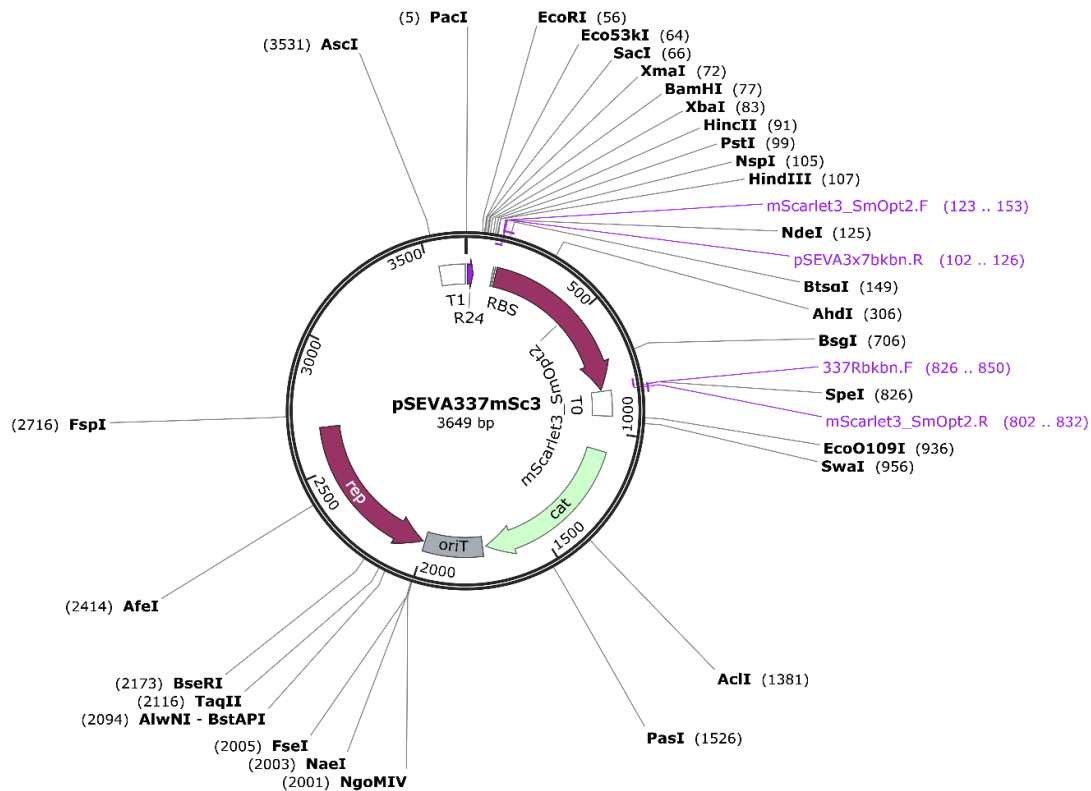


Figura S2. Mapa del vector reportero pSEVA337mSc3 (3649 pb) utilizado para fusiones transcripcionales. El mapa ilustra la arquitectura modular basada en el estándar SEVA (*Estandar European Vector Architecture*, por sus siglas en inglés). El vector consta de un replicón pBBR1 de amplio rango de hospedero y número de copias intermedio (*rep*, flecha guinda), un marcador de selección para clonafenicol (*cat*, flecha verde) y el origen de transferencia (*oriT*) para conjugación bacteriana. El casete reportero está compuesto por el gen de la proteína fluorescente roja mScarlet3 (mScarlet3_SmOpt2) precedido por una región de unión al ribosoma (RBS), el cual se encuentra flanqueado por los aisladores transcripcionales T1 y T0 para prevenir la expresión basal inespecífica del esqueleto plasmídico. Se señalan las posiciones en pares de bases de algunos sitios únicos de restricción empleados para verificar las fusiones del promotor de interés. Este vector se desarrolló a partir del esqueleto robusto pSEVA337 en el laboratorio de Ingeniería Genómica (CCG-UNAM).

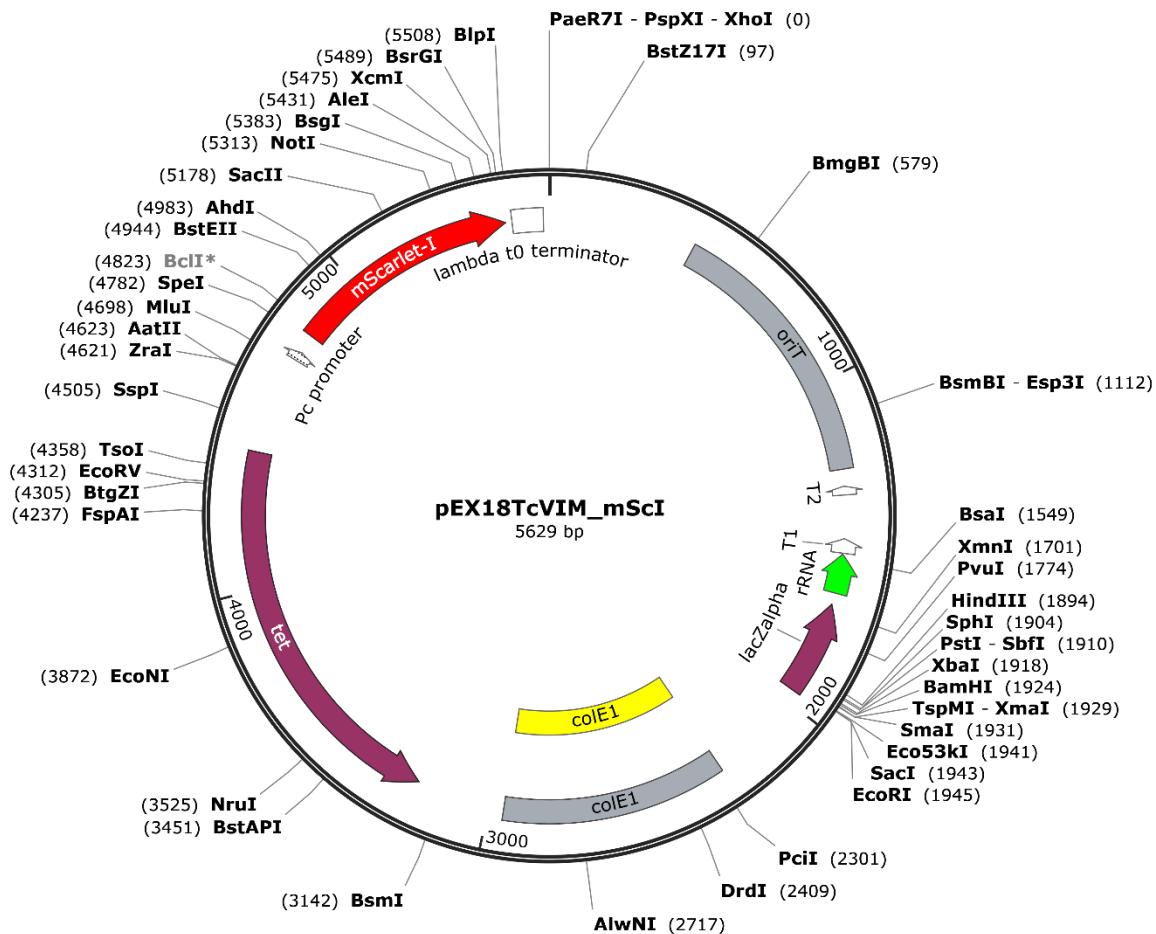


Figura S3. Mapa del vector pEX18TcVIM_mScI (5629 pb). Vector suicida utilizado para generar mutantes en el locus *sodC2* mediante integración plasmídica por recombinación homóloga. El mapa detalla los elementos genéticos del vector: el gen *tet*, que confiere resistencia a la tetraciclina como marcador de selección bacteriana; el origen de replicación *colE1*, de rango de hospedero estrecho, que le confiere su carácter suicida al impedir su replicación fuera de *E. coli*; y el origen de transferencia *oriT*, necesario para la movilización del plásmido por conjugación bacteriana. Asimismo, contiene el gen reportero de la proteína fluorescente roja mScarlet-I, cuya transcripción continua es dirigida por el promotor constitutivo Pc promoter y finalizada por el terminador lambda t0 para evitar interferencias transcripcionales con otras regiones. Finalmente, el vector contiene el fragmento *lacZalpha*, que aloja el sitio múltiple de clonación, para la verificación de fragmentos, y la región rRNA flanqueada por los terminadores T1 y T2 para prevenir el ruido transcripcional de fondo.

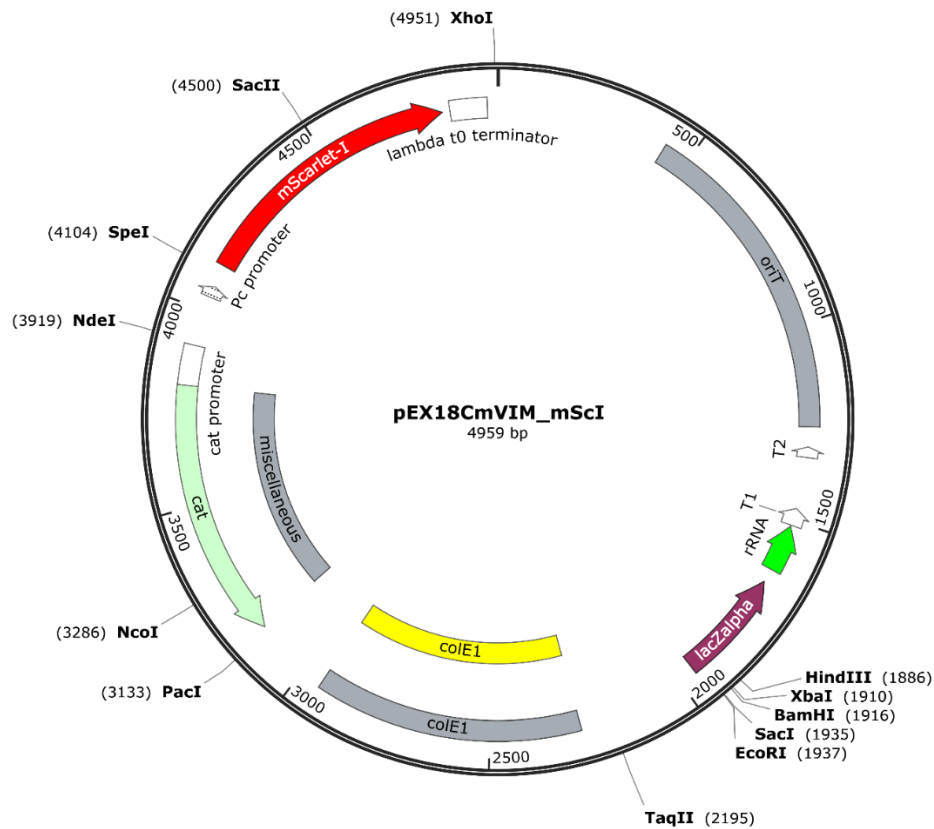


Figura S4. Mapa del vector pEX18CmVIM_mScI (4959 pb). Vector suicida utilizado de forma homóloga para generar mutantes en el locus *katN*. Esta construcción comparte la misma arquitectura molecular, elementos de control (*colE1*, *oriT*, *lacZalpha*, *rRNA*) y el casete *Pc::mScarlet-I-lambda t0* descritos en la Figura S3 anterior. La única diferencia radica en la sustitución del marcador de selección por el gen *cat* (resistencia a cloranfenicol), que permitió una mejor selección experimental. Se indican, además, las posiciones de los sitios únicos de restricción en pares de bases (pb).

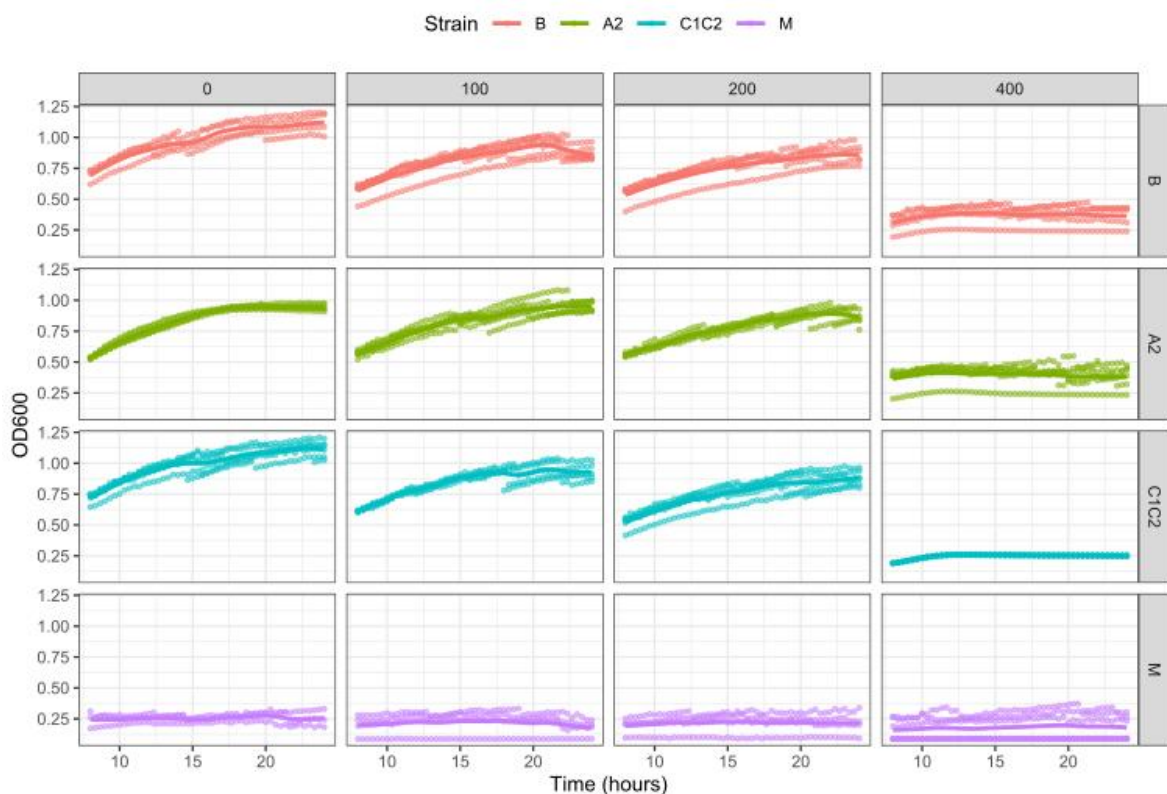


Figura S5. Cinética de crecimiento (OD₆₀₀) durante la expresión de fusiones transcripcionales en *S. maltophilia* Sm18 bajo condiciones de estrés oxidativo por MSB. Las fusiones transcripcionales Sm18/*sodB* (B), Sm18/*sodA2* (A2), y Sm18/*sodC1C2* (C1C2) fueron evaluadas en MM-MOPS (pH 7.0) suplementado con diferentes concentraciones de MSB (0, 100, 200 y 400 μM; MD en la figura), mostrando una inhibición evidente en la densidad óptica que aumenta conforme se incrementa la concentración del estresor, siendo más notoria a 400 μM en todas las construcciones. Como control negativo, se incluyó el medio sin inóculo (M), que mantuvo lecturas estables cercanas a la línea base. Las lecturas de OD₆₀₀ se realizaron cada 30 minutos durante 24 horas utilizando un lector de microplacas Synergy 2 a 30 °C. Cada fila de la cuadrícula representa una fusión transcripcional y cada columna una concentración distinta del estresor. Los datos son curvas representativas obtenidas a partir de un total de n = 4 réplicas biológicas independientes, con el tiempo (Time (hours)) en el eje X y la densidad óptica (OD₆₀₀) en el eje Y. Las variaciones o líneas paralelas que se observan en las curvas es ruido técnico generado por el lector de placas al agitar y medir las muestras, y no afectan el resultado del crecimiento.

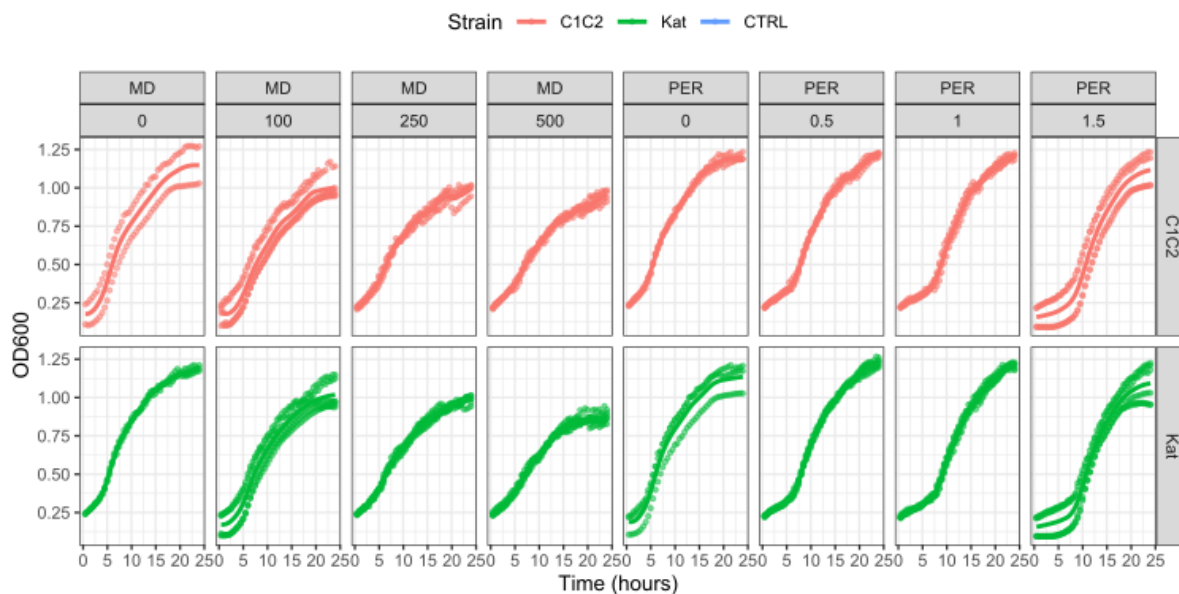


Figura S6. Cinética de crecimiento (OD600) de las fusiones transcripcionales Sm18/*sodC1C2* (C1C2) y Sm18/*katN* (Kat) en *S. maltophilia* Sm18 bajo estrés oxidativo inducido por MSB y H₂O₂. Las curvas muestran el perfil de crecimiento en MM-MOPS (pH 7.0) suplementado con concentraciones crecientes de MSB (0, 100, 250 y 500 μM; MD en la figura) o de H₂O₂ (0, 0.5, 1, 1.5 mM; PER en la figura). Se observa, de manera general, un retraso en la fase inicial de crecimiento y una disminución de la biomasa, dependiente de la concentración de ambos agentes estresantes, aunque menos evidente con el peróxido de hidrógeno. Las lecturas de OD₆₀₀ se realizaron cada 30 minutos durante 25 horas utilizando un lector de microplacas Synergy 2 a 30 °C. Cada fila de la cuadrícula representa una fusión transcripcional y cada columna una condición de estrés oxidativo. Los datos corresponden a las curvas obtenidas a partir de un total de n = 8 réplicas biológicas independientes, donde el eje X representa el tiempo (Time (hours)) y el eje Y la densidad óptica (OD₆₀₀). Las variaciones o líneas paralelas que se ven en las curvas es ruido técnico del lector de placas al agitar y medir las muestras, y no afectan el resultado del crecimiento.

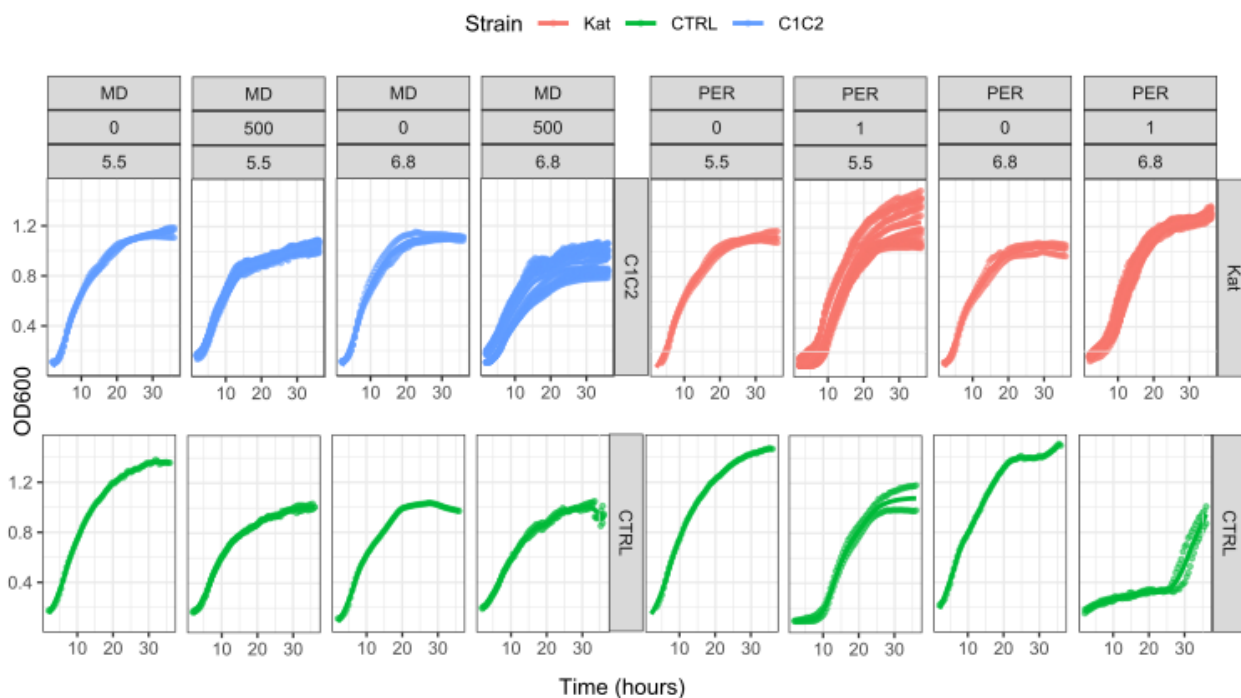


Figura S7. Cinética de crecimiento (OD600) de las fusiones transcripcionales Sm18/*sodC1C2* (C1C2) y Sm18/*katN* (Kat) en *S. maltophilia* Sm18 bajo variaciones de pH y estrés oxidativo. Las curvas muestran el perfil de crecimiento en MM-MES ajustado a pH 5.5 o 6.8, evaluados en ausencia o presencia de estrés por MSB (500 μ M) para la fusión *sodC1C2* (curvas azules) o H₂O₂ (1 mM) para *katN* (curvas rojas). Como control se incluyó la cepa con el plásmido vacío (CTRL; curvas verdes). Se observa que las variaciones de pH en combinación con los agentes antioxidantes modifican la densidad óptica alcanzada por los cultivos bacterianos. Las lecturas de OD₆₀₀ se realizaron cada 30 minutos durante aproximadamente 40 horas utilizando un lector de microplacas Synergy 2 a 30 °C. Cada columna representa una condición específica de estrés y pH, mientras que cada fila corresponde a las cepas evaluadas. Los datos obtenidos corresponden a las curvas obtenidas a partir de un total de n = 9 réplicas biológicas independientes, donde el eje X muestra el tiempo (Time (hours)) y el eje Y para la densidad óptica (OD₆₀₀). Las pequeñas variaciones o líneas paralelas que se ven en las curvas son solo ruido técnico del lector de placas que no afectan el resultado real del crecimiento.

Tabla S1. Cepas usadas y construidas en este trabajo.

Cepa	Datos de la cepa	Referencia/Fuente
DH5α	Cepa de clonación estándar de <i>E. coli</i> . F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i>	Colección de cepas de laboratorio
S17-1	Cepa donante conjugativa estándar de <i>E. coli</i> . <i>recA, thiE1, pro-82, endA, hadR17, RP4-2</i> (Km::Tn7, Tc::Mu1)	Simon <i>et al.</i> (1983)
Sm18	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa Sm18. Aislado ambiental de Cuernavaca, Morelos, México.	Ochoa-Sanchez and Vinuesa (2017)
Neff	<i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff. Aislado ambiental proveniente de EE.UU.	ATCC 30010
Sm18/337	Cepa Sm18 de <i>S. maltophilia</i> transformada con el vector de expresión vacío pSEVA337	Colección de cepas de laboratorio
Sm18/337-pr_sodA2	Cepa Sm18 de <i>S. maltophilia</i> transformada con el vector de expresión vacío pSEVA337-pr_sodA2	Este trabajo
Sm18/337-pr_sodB	Cepa Sm18 de <i>S. maltophilia</i> transformada con el vector de expresión vacío pSEVA337-pr_sodB	Este trabajo
Sm18/337-pr_sodC1C2	Cepa Sm18 de <i>S. maltophilia</i> transformada con el vector de expresión vacío pSEVA337-pr_sodC1C2	Este trabajo
Sm18/337-pr_katN	Cepa Sm18 de <i>S. maltophilia</i> transformada con el vector de expresión vacío pSEVA337-pr_katN	Este trabajo
Sm18::mTn7TC1_Pc_mScarlet-I	Cepa derivada de <i>S. maltophilia</i> Sm18 marcada mediante la integración cromosómica del minitransposón mTn7 que porta el cassette Pc-mScarlet-I.	(Rivera <i>et al.</i> , 2024)
Sm18VIMsodC2	Mutante por interrupción del gen <i>sodC2</i> de <i>S. maltophilia</i> Sm18	Este trabajo
Sm18VIMkatN	Mutante por interrupción del gen <i>katN</i> de <i>S. maltophilia</i> Sm18	Este trabajo

Tabla S2. Vectores utilizados y construidos en este trabajo

Nombre del plásmido	Características del plásmido	Referencia/Fuente
pSEVA337-mSc3	Vector SEVA con replicador pBBR (amplio rango de hospedero, número de copias intermedio), resistencia a Cm y reportero mScarlet-3 bajo control de promotor. 3649 pb	Laboratorio Vinuesa

pSEVA337mSc3-pr_ <i>sodA2</i>	pSEVA337 que porta el reportero mSc3 bajo el control del promotor <i>sodA2</i>	Este trabajo
pSEVA337mSc3-pr_ <i>sodB</i>	pSEVA337 que porta el reportero mSc3 bajo el control del promotor <i>sodB</i>	Este trabajo
pSEVA337mSc3-pr_ <i>sodC1C2</i>	pSEVA337 que porta el reportero mSc3 bajo el control del promotor <i>sodC1C2</i>	Este trabajo
pSEVA337mSc3-pr_ <i>katN</i>	pSEVA337 que porta el reportero mSc3 bajo el control del promotor <i>katN</i>	Este trabajo
pEX18Tc	Plásmido transmisible con oriT para mutagénesis dirigida en bacterias Gram negativas.	(Hmelo <i>et al.</i> , 2015; Huang & Wilks, 2017)
pEX18Cm	Plásmido transmisible con oriT para mutagénesis dirigida en bacterias Gram negativas, derivado de pEX18Tc.	Laboratorio Vinuesa
pEX18TcVIM_mSc-I	Vector suicida derivado de pEX18, con resistencia a Tc, que porta el gen reportero mScarlet-I bajo el control de un promotor constitutivo. No replica en <i>S. maltophilia</i> y se integra al cromosoma solo mediante recombinación homóloga, permitiendo la generación de mutantes por interrupción génica.	Laboratorio Vinuesa
pEX18CmVIM_mSc-I	Vector suicida derivado de pEX18, con resistencia a Cm, que porta el gen reportero mScarlet-I bajo el control de un promotor constitutivo. No replica en <i>S. maltophilia</i> y se integra al cromosoma solo mediante recombinación homóloga, permitiendo la generación de mutantes por interrupción génica.	Laboratorio Vinuesa
pEX18Tc_Sm18::VIM <i>sodC2</i>	Vector suicida pEX18TcVIM portador de un fragmento interno de <i>sodC2</i> para interrupción génica en <i>S. maltophilia</i> Sm18	Este trabajo
pEX18Cm_Sm18::VIM <i>katN</i>	Vector suicida pEX18CmVIM portador de un fragmento interno de <i>katN</i> para interrupción génica en <i>S. maltophilia</i> Sm18	Este trabajo

Tabla S3. Oligos utilizados.

Gen	Primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Enzimas de restricción	Referencia
<i>sodA2</i>	Sm18-pr_ <i>sodA2</i> .F	tgcatgaaatggttgacgacc	397	EcoR1-HF	Este trabajo
	Sm18-pr_ <i>sodA2</i> .R	gggtgtgatggattccatcgctc		HindIII-HF	Este trabajo
<i>sodB</i>	Sm18-pr_ <i>sodB</i> .F	agaaaccgcacatcgggtac	311	EcoR1-HF	Este trabajo
	Sm18-pr_ <i>sodB</i> .R	gtgcagctccagggtctgtg		HindIII-HF	Este trabajo
<i>sodC1C2</i>	Sm18-pr_ <i>sodC1C2</i> .F	tacccttaccgcgaagctgg	250	EcoR1-HF	Este trabajo
	Sm18-pr_ <i>sodC1C2</i> .R	cggcggagtaggttcggtc		HindIII-HF	Este trabajo
	Sm18_VIM-C2.F	ttgatccacacgtcgctg	444	EcoR1-HF	Este trabajo
	Sm18_VIM-C2.R	ttgatgttgggcatgtcgc		HindII-HF	Este trabajo
<i>katN</i>	Sm18-pr_ <i>katN</i> .F	tatccagcgcactggcgac	242	EcoR1-HF	Este trabajo
	Sm18-pr_ <i>katN</i> .R	ccacttcaacaagcgctcg		HindIII-HF	Este trabajo
	Sm18_VIM- <i>katN</i> .F	tcgccaccgaagagatcag	473	EcoR1-HF	Este trabajo
	Sm18_VIM- <i>katN</i> .R	catgtacagatcggatgaacg		HindIII-HF	Este trabajo

Tabla S4. Condiciones empleadas de PCR con la enzima ADN polimerasa Phusion para la amplificación de los genes de interés.

Gen	Temperatura de alineamiento Tm (°C)	Tiempo de extensión (s)	N° de ciclos
<i>sodA2</i>	69	12	34
<i>sodB</i>	62	10	
<i>sodC1C2</i>	71	10	
<i>katN</i>	62	10	
<i>VIMsodC2</i>	65	15	
<i>VIMkatN</i>	60	17	

Nota: Todos los programas incluyeron una desnaturalización inicial a 98 °C por 30 segundos, seguida por otra desnaturalización a 98°C por 10 segundos, mientras que la temperatura de extensión fue de 72 °C y la extensión final a 72 °C por 5 minutos. El tiempo de extensión se ajustó de acuerdo al protocolo de la ADN polimerasa Phusion donde se consideró una tasa de 1kb/min.