



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFFECTO DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE
CLORANFENICOL, TOBRAMICINA Y GENTAMICINA SOBRE EL
SISTEMA QUORUM SENSING DE *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

BRENDA VÁZQUEZ MONTAÑO

DIRECTOR DE TESIS:

ERICK JOSÉ LÓPEZ ARREDONDO



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO.....	7
Quorum sensing	7
Definición e importancia	7
Fenotipos de estudio de QS	8
Inhibidores de QS	9
Quorum sensing y enfermedades infecciosas.....	10
Importancia de las enfermedades infecciosas	10
Importancia del QS en la patogenicidad y virulencia bacteriana.....	11
Antibióticos	11
Clasificación.....	12
Aminoglucósidos	12
Cloranfenicol	14
Importancia de la concentración de los antibióticos	15
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIÓN	27
LITERATURA CITADA.....	28

ABREVIATURAS

AI	Autoinductor
AHL	Acil homoserin lactona
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
IQS	Inhibidores de quorum sensing
QS	Quorum sensing
CSI	Concentración subinhibitoria

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme tanto y no solo conocimientos, sino también las mejores experiencias de mi vida, así como a personas con las cuales agradezco haber coincidido.

A mi mamá y a mi papá, porque siempre han estado a mi lado para guiarme y corregirme, para quererme y cuidarme mejor que nadie. Por buscar darnos todo y lo mejor a mis hermanas y a mí. Por enseñarme a ser fuerte y recordarme que todo lo puedo lograr. Esto es por ustedes. Todo lo que soy es gracias a ustedes. Los quiero infinitamente.

A mis hermanas, por estar y hacer los días más ligeros con sus ocurrencias. Por escucharme, confiar en mí y porque son el mejor equipo y el lazo más fuerte que podré tener en la vida. Siempre estaré para ustedes.

A Erick López, por compartirme su conocimiento, su tiempo y guiarme en esta etapa, ser paciente, comprensible y siempre apoyarme y creer en mí hasta más de lo que yo creo en mí misma. Y, además, dejarme ser su amiga.

A la maestra Llaráí Gaviria, por confiar en mí y darme las primeras oportunidades. Por sus muy gratas conversaciones e historias y también por todo su cariño. Por su conocimiento, su guía y sobre todo por enseñarme que *“Saber te permite decidir”*.

Al Dr. Hugo Perales, por compartirme un poco de su amplio conocimiento, asesorarme en este proyecto y además mostrarme la gran calidad de ser humano que es.

Al Dr. Salvador Rodríguez por permitirme estar en su laboratorio y llevar a cabo este proyecto. Por su gran asesoría, su conocimiento y accesibilidad. Muchas gracias.

A la Dra. Martha Salcedo, por su tiempo y asesoría en este proyecto, así como compartirme su conocimiento desde el monográfico de señalización.

A mi Metz por ser mi mejor amiga, siempre estar ahí y apoyarme muchísimo. Por todos los momentos compartidos, los llantos, la pizza, las palabras, los abrazos, las chelitas y los cientos de miles de carcajadas. Por compartir la vida. Si me hubieran dicho que la chava tímida sentada a mi lado el primer día de la universidad se convertiría en mi cuarta hermana jamás lo hubiera creído. Gracias por todo y vamos por más.

A mi club de niñas, Silvia, Daniela, Selene y Samara y de nuevo Metzli, porque juntas lo podemos todo y entre nosotras nos apoyamos siempre. Por ser la familia que yo escogí y no solo acompañarme en los momentos divertidos, sino también escucharme, aconsejarme y quererme en todo momento. Por su confianza. Siempre juntas.

A Janelly, por ser un solecito. Por acompañarme y permitirme acompañarla en todo. Por tu apoyo, tu cariño y por ayudarnos siempre y no dejarnos solas. Nuestro lazo es más fuerte de lo que cualquiera pudiera pensar. Te quiero muchísimo.

También a Fanny, por las veces que tuvimos que lidiar con el semestre nosotras solas y con nuestros dilemas jaja. Porque siempre nos apoyamos y también echamos muy buenos chismes. Gracias por todo, señora.

A Abril, por ser tan linda y ser mi primera amiga en este grupo y compartir mucho más que solo las clases. A mi Brendi Esparza por ser tan divertida y sacarme muchas risas, pero principalmente por confiar en mí y dejarme acompañarte en momentos tan especiales. También a Clausi por los ricos cafés que hemos compartido, recuerda que cuentas conmigo siempre. A Miriam, Sopitas, por siempre contagiarme de su buena vibra. Eres una persona maravillosa. A Mel gracias por ser mi amiga y por escucharnos. Cada que me acuerdo de ti escucho tu risa. Gracias a todas.

A Aldito, por siempre mostrar que eres un tipazo y por ser tan objetivo cada que te pido un consejo. También por motivarme a cumplir con esto. A mi pa, el Jorge, por confiar en mí y considerarme tu amiga, no imaginas lo mucho que lo aprecio. Ambos son mis mejores amigos de la carrera, gracias por siempre hacerme reír, los adoro.

A mi buen amigo Tony, con quien me he divertido muchísimo, pero que también me apoya un montón. Tú también me has motivado en esta etapa. Estoy tan contenta de haber coincidido contigo y que también me compartieras amistades tan lindas como lo son Mafer, Lucero y Leo. Gracias por todo.

A Jimena y a Bere por no solo ser mis compañeras, sino también ser el equipo chido y volverse mis amigas, así como compartir muchos buenos momentos y apoyarme a concluir esta etapa.

A Oralia, por ser tan buena conmigo, apoyarme y echarme también muchas porras. Y a Luz por también ser parte de eso y por las horas de té.

RESUMEN

El sistema de *quorum sensing* es de gran importancia biológica debido a que regula la expresión genética de diversos procesos, entre ellos, la producción de factores de virulencia, por lo que la inhibición de este sistema podría funcionar como coadyuvante en tratamiento de infecciones bacterianas. Algunos antibióticos, como la azitromicina y el ciprofloxacino en concentraciones subinhibitorias, han mostrado tener efecto inhibitor sobre la regulación de este sistema. Nos preguntamos si los antibióticos cloranfenicol, tobramicina y gentamicina tendrían un efecto similar sobre la regulación de este sistema. Por lo anterior, en este estudio evaluamos el efecto de 3 concentraciones subinhibitorias de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina sobre la actividad proteolítica, como fenotipo regulado por el sistema de QS de *Pseudomonas aeruginosa*.

Obtuvimos que gentamicina presentó una mayor inhibición de la actividad proteolítica en todas sus concentraciones, mientras que tobramicina inhibió esta actividad en las concentraciones de $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$ de CMI, y promovió la actividad en la concentración de $\frac{1}{2}$ de la CMI. Adicionalmente, agrupamos a los antibióticos para obtener un rango amplio de concentraciones y se obtuvo que los aminoglucósidos tienen una respuesta no-monotónica trifásica. Esto da paso a seguir con estudios que corroboren los tipos de respuestas de los antibióticos en diferentes concentraciones, como alternativa en el control de la patogenicidad bacteriana. Por otro lado, *P. aeruginosa* mostro resistencia al cloranfenicol.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas representan un grave problema de salud a nivel mundial que cuesta 55 billones de dólares anualmente sólo en los Estados Unidos de América (Smith and Coast 2019). El daño causado por enfermedades microbianas es producido por diversos factores de virulencia como la movilidad, la producción de toxinas y la formación de biopelículas (Josenhans and Suerbaum 2002; Rutherford *et al.* 2012; Yousefi *et al.* 2016). Estos factores de virulencia son regulados por el sistema de QS (Smith, Bu and Suga 2003; Gupta, Setia and Harjai 2011), por lo tanto, la inhibición de este sistema presenta una oportunidad en el desarrollo de nuevas terapias.

Se han reportado múltiples compuestos con la capacidad de inhibir QS, entre ellos los aceites esenciales (Khan *et al.* 2009; Husain *et al.* 2015), hormonas (Sperandio *et al.* 2003), aminoácidos no proteínogénicos (Keshavan *et al.* 2005), y antibióticos (Skindersoe *et al.* 2008b). Estos últimos son compuestos prometedores ya que han pasado pruebas clínicas y su uso es relativamente seguro. Las diferentes familias de antibióticos en concentraciones subinhibitorias han mostrado inhibir el QS en *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenems (El-Mowafy *et al.* 2017), quinolonas (Gupta *et al.* 2016), aminoglucósidos (Bahari *et al.* 2017) y macrólidos (Bala, Kumar and Harjai 2011). Sin embargo, en *Chromobacterium violaceum*, las penicilinas (Deryabin and Inchagova 2017) y tetraciclinas (Wang *et al.* 2013) han presentado un efecto promotor. Por lo que nos preguntamos cuál es el efecto de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina sobre el sistema de QS en *P. aeruginosa*.

Para estudiar el sistema de QS utilizamos el modelo de producción de proteasas en *P. aeruginosa*. La producción de proteasas es regulada por el sistema QS, por lo que ha sido utilizada en múltiples ocasiones como método de estudio de este sistema. Este modelo se basa en la detección de la actividad proteolítica de proteasas sobre caseína de leche en agar. Este modelo se utilizó para determinar el efecto de concentraciones subinhibitorias de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina sobre el sistema de QS de *P. aeruginosa*.

MARCO TEÓRICO

Quorum sensing

Definición e importancia

Muchas especies de bacterias y algunos hongos pueden comunicarse a través de un sistema llamado *Quorum Sensing* (QS). El QS es un mecanismo que regula la expresión genética en respuesta a la densidad poblacional celular, basada en la producción y detección de moléculas autoinducoras (AI) (Miller & Bassler 2001; Rutherford *et al.*, 2012). Cuando la densidad poblacional aumenta y la concentración del AI llega a un umbral, se activa un factor transcriptor positivo que se encarga de la regulación de diversos genes.

La regulación genética por QS controla algunas de las actividades fisiológicas bacterianas. Entre ellas está la conjugación (Fuqua and Winans 1996) producción de exoenzimas (Pirhonen *et al.* 1993), bioluminiscencia (Lilley and Bassler 2000), producción de factores de virulencia (Skindersoe *et al.* 2008a) y movilidad (Weiss *et al.* 2008).

Los sistemas QS son diferentes entre bacterias gram-positivas y gram-negativas. Las bacterias gram-negativas poseen un sistema de tres componentes (Hentzer and Givskov 2003): un AI de tipo lactona *N*-acil homoserina LAH), una sintasa de tipo LuxI y un receptor de señal tipo LuxR. El AI funciona como molécula de señalización entre las especies gram-negativas, el cual es sintetizado a un nivel basal bajo por la sintasa LuxI y es difundido fuera de la bacteria. Al aumentar la población celular bacteriana se produce un umbral en la concentración del AI que interactúa con el receptor de señal LuxR, activando el factor de transcripción que regula la expresión de genes controlados por QS (Figura 1).

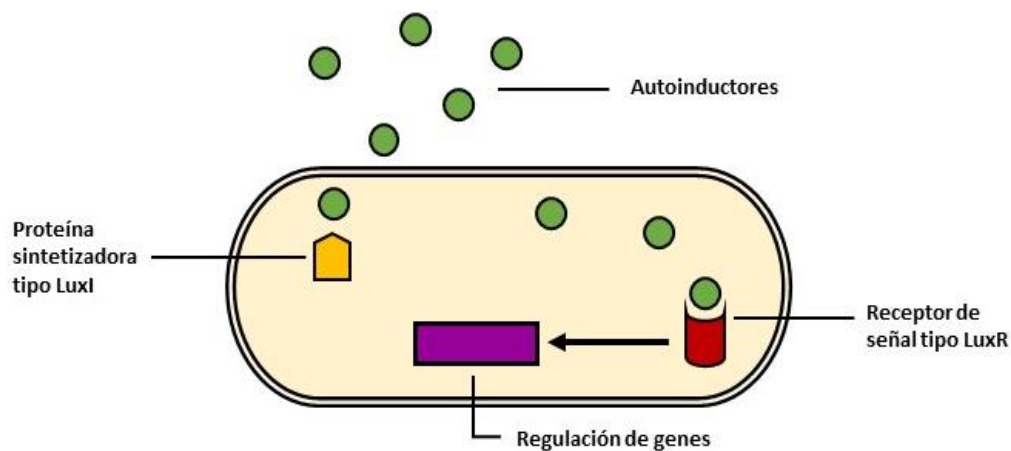


Figura 1. Sistema de QS en bacterias gram-negativas

En bacterias gram-positivas el sistema de QS está conformado por dos componentes (Waters and Bassler 2005): oligopéptidos como molécula de señalización, y proteínas de dos componentes de histidina quinasa como receptores de la señal (Figura 2). Las bacterias secretan oligopéptidos a través de una proteína exportadora ABC, al llegar a la concentración umbral éstos son reconocidos por las proteínas quinastas de dos componentes unidas a la membrana citoplasmática, iniciando una cascada de fosforilación que activa al factor de transcripción que se encarga de regular los genes controlados por QS.

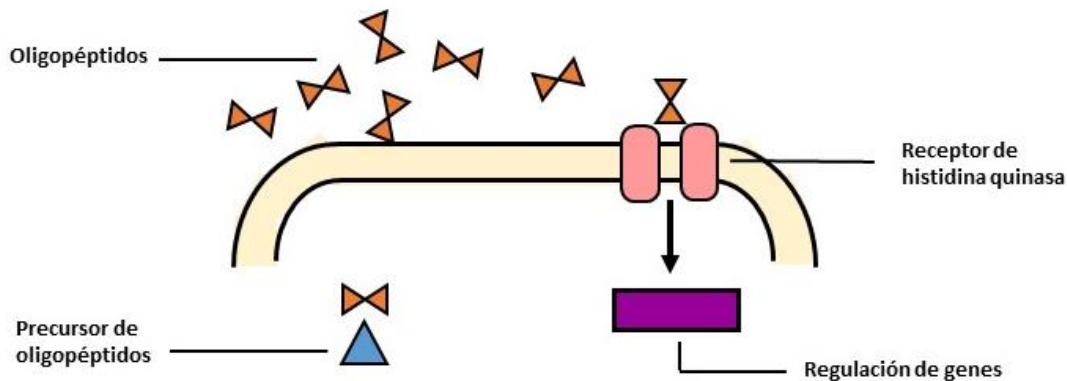


Figura 2. Sistema de QS en bacterias gram-positivas.

Además, algunas bacterias presentan un circuito híbrido que posee componentes de los sistemas QS gram-positivos y gram-negativos. Por ejemplo, *Vibrio harvery* utiliza el autoinductor AI-1 para comunicarse con bacterias gram-negativas y a su vez, posee un segundo autoinductor llamado AI-2, que permite la comunicación con especies de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Bassler, Greenberg and Stevens 1997).

Fenotipos de estudio de QS

El sistema de QS puede ser estudiado utilizando métodos de estudio directos o indirectos. De manera directa se estudia el sistema cuantificando la concentración del AI (Miller 1972). Mientras que de manera indirecta se estudia alguno de los fenotipos regulados por el sistema QS, por ejemplo, cuantificando la producción de toxinas (Skindersoe *et al.* 2008a) o bioluminiscencia (Schaefer *et al.* 1996).

En la Tabla 1 se mencionan los principales fenotipos y organismos utilizados como modelos para estudiar los sistemas de QS.

Tabla 1. Principales fenotipos y organismos de estudio de los sistemas de QS

Fenotipo	Modelo	Referencia
Producción de violaceína	<i>C. violaceum</i>	(McClellan <i>et al.</i> 1997)
Bioluminiscencia	<i>V. fischeri</i> <i>V. harveyi</i>	(Schaefer <i>et al.</i> 1996) Mariscal 2003
Movilidad por <i>swarming</i> y <i>twitching</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. liquefaciens</i> <i>B. cepacia</i> H111 <i>A. baumannii</i>	Inoue y otros, 2008 (Rasmussen <i>et al.</i> 2000) (Huber <i>et al.</i> 2001) (Saroj and Rather 2013)
Producción de toxinas	<i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	(Sifri <i>et al.</i> 2002) (Qazi <i>et al.</i> 2006) (Sokol, Ohman and Iglewski 1979)

Inhibidores de QS

Existen diversas estrategias que algunos organismos han desarrollado para interferir en el sistema QS como mecanismo de defensa contra los competidores. Los inhibidores de QS (IQS) pueden actuar de 5 maneras diferentes sobre el AI: 1) inhibir su síntesis; 2) degradarlo enzimáticamente; 3) competir contra el para unirse a los sitios receptores; 4) interferir en su unión con los promotores de genes; y 5) eliminación (Dong, Wang and Zhang 2007).

La naturaleza química de los IQS es muy diversa. Algunos de estos son enzimas como lactonasas, oxidoreductasas, acilasas, lactonasas similares a fosfotriesterasa, y péptidos cíclicos (Dong *et al.* 2000; Fetzner 2015). Por otro lado, existen análogos naturales y sintéticos que pueden competir con el AI al ser similares en su estructura química, o interferir en la síntesis y reconocimiento de los AI nativos (Khan *et al.* 2009).

Los inhibidores naturales de QS son importantes en la ecología de las bacterias, ya que median interacciones con otros organismos. Por ejemplo, las furanonas halogenadas presentes en el alga *Delisea pulchra* interfieren en la movilidad por *swarming* controlada por el sistema QS de *Serratia liquefaciens* (Rasmussen *et al.* 2000). El extracto de la planta *Combretum albiflorum* contiene flavonoides que reducen los factores de virulencia regulados por el sistema QS de *P. aeruginosa* (Vandeputte *et al.* 2010). Por otro lado, el ácido salicílico extraído de la planta *Arabidopsis thaliana* mostró una reducción en la formación de biopelículas y la producción de pio Cianina, proteasa y elastasa en *P. aeruginosa* (Prithiviraj *et al.* 2005). Mientras que la bacteria marina *Halobacillus salinus*

produce dos metabolitos de Feniletilamina que inhiben la producción de bioluminiscencia en *V. harveryi* (Teasdale *et al.* 2009).

También existen inhibidores sintéticos de QS, que son producidos por modificaciones químicas en el AI. Algunas de las alteraciones más comunes a los AI son sobre la cadena lateral del acilo y/o alteraciones en el anillo de lactona (Kalia and Purohit 2011). Por ejemplo, la producción de bioluminiscencia por *V. fischeri* fue inhibida por la presencia del AI con varias sustituciones en el C4 de la cadena de acilo de 3OC6HL o C6HSL (Reverchon *et al.* 2002).

Mientras que el análogo del AI 3-OC12HSL, denominado 2-oxociclohexil-3-oxododecanamida mostró una reducción en la producción de pirocianina, elastasa y de la formación de biopelículas por *P. aeruginosa* (Smith, Bu and Suga 2003). También existen moléculas sintéticas similares a AI con la capacidad de inhibir el QS como algunos antibióticos (Bahari *et al.* 2017).

Quorum sensing y enfermedades infecciosas

Importancia de las enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son producidas por la presencia y crecimiento de organismos capaces de causar daño al hospedero, comúnmente llamados patógenos. Entre los organismos patógenos responsables de estas infecciones se encuentran bacterias, hongos, protozoos y virus. A nivel mundial las enfermedades infecciosas representan un grave problema de salud, siendo una de las 20 primeras causas de muerte (OMS, 2014), así como son responsables de generar un gasto de 55 billones de dólares anualmente, tan solo en Estados Unidos (Smith and Coast 2019). En México, hasta el año 2014, estas enfermedades han sido la principal causa de morbilidad y mortalidad ocupando los tres primeros sitios las infecciones respiratorias agudas, las infecciones intestinales y las infecciones de vías urinarias (Soto-Estrada, Moreno-Altamirano and Pahua Díaz 2016).

Entre las infecciones más agudas se encuentra las infecciones nosocomiales, las cuales son adquiridas tras haber recibido atención médica dentro de hospitales y que estaban ausentes antes de ingresar (Khan, Baig and Mehboob 2017). Se estima que afectan al 15% de los pacientes hospitalizados a nivel mundial, incrementando la tasa de mortalidad y las pérdidas financieras (Sydnor and Perl 2011). En México, se calcula que 450.000 casos de infecciones nosocomiales causan 32 muertes por cada 100.000 habitantes por año (OMS, 2020).

Importancia del QS en la patogenicidad y virulencia bacteriana

La patogenicidad es la capacidad que tiene un microorganismo de causar daño o enfermedad en un huésped susceptible. La cantidad de daño generado por la relación patógeno-hospedero resulta de factores microbianos y/o de la respuesta del hospedero, la cual se denomina virulencia y está relacionada con el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad (Pirofski and Casadevall 2012)

El proceso por el cual un patógeno causa una enfermedad se divide en 4 pasos (Balloux and van Dorp 2017), de los cuales 3 pueden ser regulados por QS, lo que resalta su importancia en las enfermedades bacterianas. El primero de estos es la exposición, que consiste en el contacto directo del patógeno con el hospedero. El siguiente paso es la adhesión al tejido del hospedero, la cual depende de adhesinas que son reguladas por QS, como ocurre en *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* (Vuong *et al.* 2000; Labbate *et al.* 2007). Éste es seguido de la invasión, donde el microorganismo evade el sistema inmune del hospedero y penetra los tejidos, por lo que utiliza mecanismos regulados por QS como proteasas y mecanismos de movilidad como *swarming* y *twitching* (Huber *et al.* 2001; Patriquin *et al.* 2008). Finalmente se lleva a cabo la infección, donde el daño que sufre el hospedero es causado por la producción de diversas toxinas reguladas por QS (Gupta, Chhibber and Harjai 2016).

Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas que tienen un efecto antagónico sobre el crecimiento de microorganismos (Waksman 1961). En el entorno natural, son utilizados por los microorganismos tanto como para la supervivencia, como ventaja competitiva frente a otros (Davies 1990) y durante varias décadas han tenido un papel muy importante en el tratamiento contra infecciones bacterianas.

Se han propuesto diversas teorías del papel de los antibióticos en la naturaleza, como que actúan como armas químicas para inhibir el crecimiento de competidores, ya sea de manera defensiva o depredadora, así como que pueden participar en la señalización con otras bacterias u otros (Andersson y Hughes, 2014).

Clasificación

Los antibióticos pueden clasificarse de diferentes maneras. Una de ellas es basándose en el efecto que tendrán sobre la bacteria. Aquellos que inducen la muerte celular se conocen como bactericidas, mientras que aquellos que sólo inhiben el crecimiento celular se denominan bacteriostáticos (Kohanski, Dwyer and Collins 2010). También pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química, mecanismo de acción y espectro de acción. La Tabla 2 muestra una clasificación de los antibióticos considerando el mecanismo y espectro de acción y su blanco.

Tabla 2. Tipos y mecanismo de acción de antibióticos		
Mecanismo	Antibiótico	Blanco
Inhibición de la síntesis de ADN	Fluoroquinolonas	Topoisomerasa II (DNA girasa), topoisomerasa IV
	Sulfamida	Síntesis de ácido tetrahidrofólico.
Inhibición de la síntesis de ARN	Rifamicinas	RNA polimerasa dependiente de DNA
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactámicos	Proteínas de unión a penicilina
	Glicopéptidos	Unidades de peptidoglicano terminal D-Ala-D-Ala dipéptido
	Lipopéptidos	Lipopolisacárido en la membrana externa
Inhibición de la síntesis de proteínas	Aminoglucósidos	Ribosoma 30S
	Macrólidos	Ribosoma 50S
	Anfenicoles	Ribosoma 50S
	Tetraciclinas	Ribosoma 30S

Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son una clase de antibióticos bactericidas utilizados ampliamente en el tratamiento por enfermedades bacterianas. Presentan mayor potencia contra bacterias de la familia Enterobacteriaceae, y también han mostrado eficacia contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Forge y Schacht, 2000)

Su estructura central presenta 5 o 6 grupos amino o azúcar conectados por enlaces glucosídicos a un aminociclitol, comúnmente 2-desoxistreptamina (Mingeot-Leclercq, Glupczynski

and Tulkens 1999; Krause et al. 2016). La presencia de múltiples grupos amino e hidroxilo los hace de naturaleza hidrófila, bastante polares, básicos y solubles en agua (Jadhav *et al.* 2019).

Los aminoglucósidos se clasifican en 4 subclases basadas en sustituciones en el anillo de desoxitreptamina (Magnet and Blanchard 2005; Wachino and Arakawa 2012): 1) sin desoxitreptamina, como estreptomicina; 2) un anillo monosustituido, como apramicina; 3) un anillo 4,5-disustituido, como neomicina; y 4) un anillo de 4,6-disustituido, como amikacina, gentamicina y tobramicina (Figura 3).

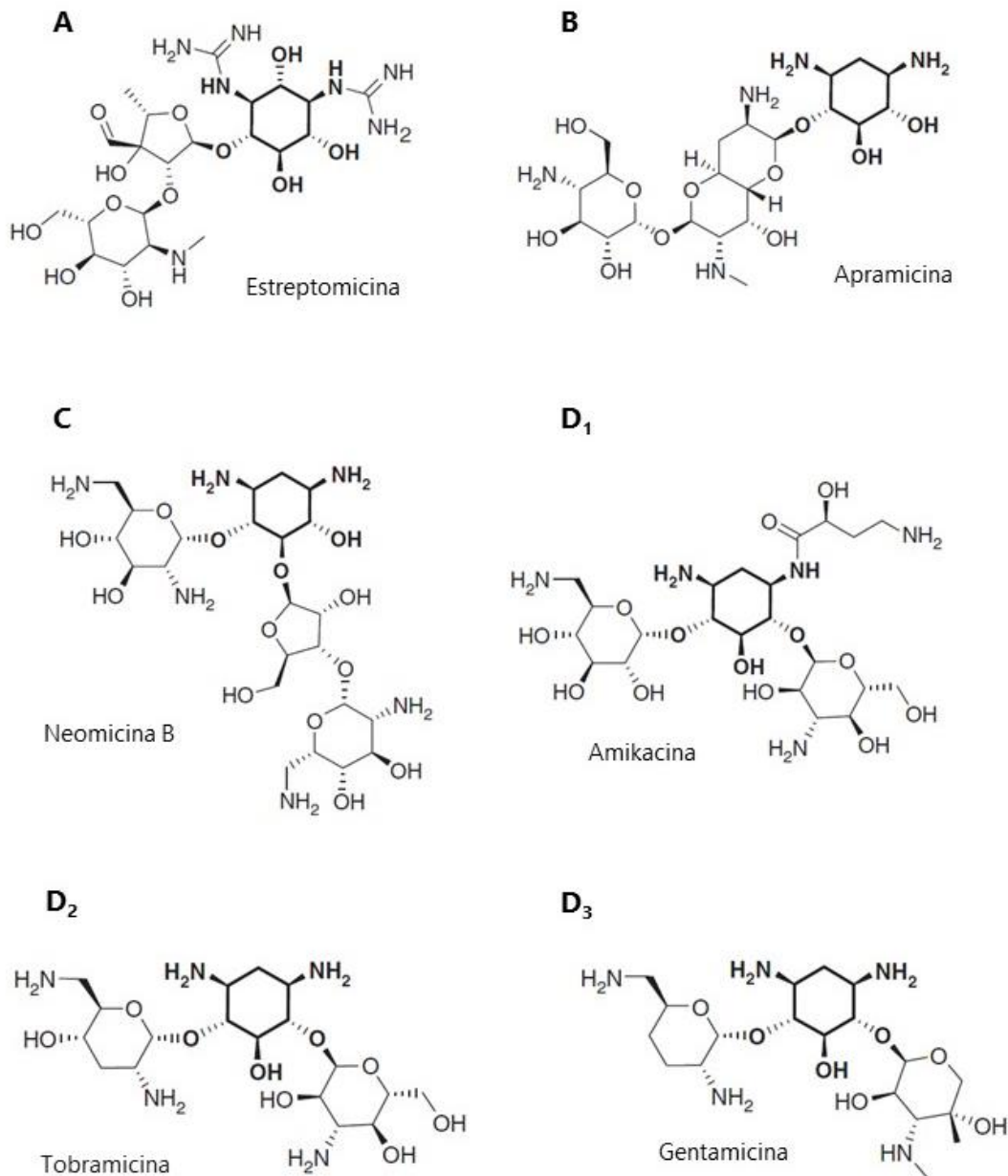


Figura 3. Estructura química de las subclases de aminoglucósidos. **A.** sin desoxitreptamina; **B.** anillo monosustituido; **C.** anillo 4,5-disustituido; y **D.** anillo de 4,6-disustituido. Modificado de Krause *et al.*, 2016.

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos consiste en inhibir la síntesis de proteínas. Estos antibióticos se unen con gran afinidad al sitio A en el ARN ribosómico 16 S del ribosoma 30 S (Kotra, Haddad and Mobashery 2000), provocando una codificación errónea en la traducción. Las proteínas mal traducidas se insertan y causan daño en la membrana citoplasmática, facilitando una rápida adsorción de aminoglucósidos en el citoplasma que aumenta la inhibición de síntesis de proteínas y acelera la muerte celular (Ramirez and Tolmasky 2010).

Cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que debido a la toxicidad que presenta es utilizado como antibiótico sistémico por su efectividad contra infecciones que ha sido utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, debido a que ha mostrado ser tóxico dejó de ser en primera que presenta toxicidad no se utiliza en primera elección.

Su estructura está conformada por un grupo p-nitrofenilo y un sustituyente de N-dicloroacetilo unido a un 1,3-propanodiol con dos centros quirales (Shaw, 1991) (Figura 4).

El mecanismo de acción del cloranfenicol consiste en inhibir la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50 S, específicamente al centro de peptidil transferasa, en el ribosoma 70 S (Wareham y Wilson, 2002). Impide el ensamblaje de los aminoacil-ARNt que transportan los aminoácidos al ribosoma, inhibiendo la formación del enlace peptídico (Schwarz et al, 2004).

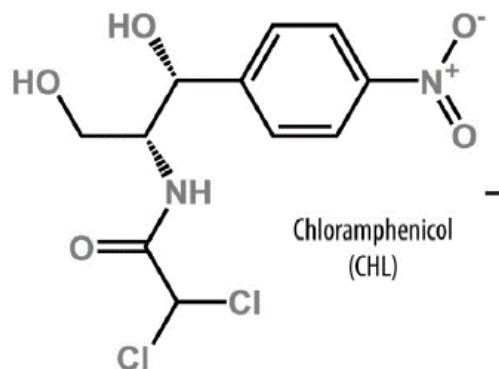


Figura 4. Estructura química del cloranfenicol. (Tomado de Tereshchenkov *et al*, 2018).

Importancia de la concentración de los antibióticos

La concentración de los antibióticos juega un papel importante en las bacterias. Esto se debe a que la probabilidad de que un antibiótico interactúe con su blanco es directamente proporcional a su concentración. Las concentraciones de antibióticos usualmente son clasificadas de acuerdo con su efecto sobre la viabilidad y tasa de reproducción de las bacterias. La clasificación más común es en Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB). La CMI es la concentración mínima que inhibe el crecimiento de bacterias, mientras que la CMB es la concentración mínima que elimina a más del 99.9% de bacterias.

También es posible estudiar el efecto de un rango de concentraciones. Dentro de este rango encontramos a la CMI y CMB que inhiben el crecimiento bacteriano, sin embargo, también hay Concentraciones Subinhibitorias (CSI) capaces de promover su crecimiento, probablemente porque los antibióticos en concentraciones bajas tienen funciones de señalización en bacterias (Goh *et al.* 2002; Davies, Spiegelman and Yim 2006). Este tipo de respuesta bacteriana no lineal es conocida como no-monotónica (Conolly and Lutz 2004) y es característica de múltiples antibióticos (Deng *et al.* 2012; Mathieu *et al.* 2016)

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Qué efecto tendrán las concentraciones subinhibitorias de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina sobre el sistema quorum sensing?

HIPÓTESIS

Si las CSI de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina inhiben la producción de proteasas regulada por QS en *P. aeruginosa*, entonces existirá una reducción en halos de degradación de proteólisis.

OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar el efecto de concentraciones subinhibitorias de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina sobre el sistema QS de *P. aeruginosa*.

PARTICULARES

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina para *P. aeruginosa*
- Determinar el efecto inhibitorio de las CSI de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina sobre la actividad proteolítica de *P. aeruginosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y mantenimiento de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa PAO1 fue amablemente proporcionada por el laboratorio de Osmorregulación de la UMF de la FES Iztacala, UNAM. Esta se mantuvo en placas de agar nutritivo a 32 °C entre los experimentos.

Diseño experimental

Para determinar el efecto inhibitorio de las CSI de antibióticos sobre el sistema QS de *P. aeruginosa* se evaluó la actividad proteolítica. El diseño experimental consistió en tres grupos: cloranfenicol, tobramicina y gentamicina y cada grupo estaba conformado por 5 subgrupos con 0.5, 0.25 y 0.125 de la CMI de los antibióticos, ácido salicílico 5 mM como control positivo (Gupta, Chhibber and Harjai 2016) y agua como control negativo. Se realizaron 7 repeticiones de cada tratamiento.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de la CMI de cloranfenicol, tobramicina y gentamicina se realizó por el método de microdiluciones en agar. Se realizaron diluciones seriadas en agar nutritivo, preparando una serie de 10 placas con agar nutritivo adicionadas por separado con una solución stock de 3 mg/ml de tobramicina, 5 mg/ml de gentamicina y 5 mg/ml de cloranfenicol en un rango de 0 - 5 µg/ml, 0 - 0.50 µg/ml y 0 - 70 µg/m, respectivamente (Tabla 3). Se consideró como CMI a la concentración más baja de antibiótico que inhibió el crecimiento de la bacteria en el agar. Tobramicina Opko Cloranfenicol Son's frasco con 15 ml

Antibiótico	Sol. stock	Diluciones (µg/ml)									
Tobramicina	5	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Gentamicina	3	0	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Cloranfenicol	5	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90

Tabla 3. Rango de concentraciones de antibióticos

Evaluación del efecto de los antibióticos sobre el sistema de QS

Para determinar el efecto CSI de los antibióticos utilizamos el método propuesto por Pailin y colaboradores en 2001 (Pailin *et al.* 2001) basado en el tamaño del halo de proteólisis en cajas de agar de leche. Se utilizaron cajas de agar leche (leche en polvo 72 g/L, agar 25 g/L, glicina 20g/L). El agar y la leche fueron esterilizados por separado. Se mezcló la leche y el agar y se vertió la mezcla en cajas Petri y se les adicionó por separado 0.5, 0.25 y 0.125 de la CMI de tobramicina, gentamicina y cloranfenicol.

Las placas fueron inoculadas con 5µL de *P. aeruginosa* PAO1 que contenían 1×10^5 UFC/µL. El inóculo se preparó centrifugando 500 µl de cultivo de toda la noche de *P. aeruginosa* PAO1 a 8,000 rpm por 5 minutos y la pastilla fue resuspendida en 200 µl de caldo nutritivo. Una vez inoculadas las placas, fueron incubadas a 27 °C durante 24 h y finalmente fueron fotografiadas para la posterior medición del diámetro de los halos con ImageJ versión 1.52a.

Análisis de datos

La normalidad de los datos fue revisada con una prueba de Shapiro-Wilk, la prueba resultó positiva, por lo que los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor, seguido de una prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto de los antibióticos sobre el sistema QS se obtuvieron las CMI y posteriormente se determinaron sus CSI. La CMI de gentamicina fue 0.3 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para tobramicina fue de 2 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, *P. aeruginosa* presentó una gran resistencia al cloranfenicol, por lo que no fue posible determinar su CMI y, por lo tanto, su efecto sobre el sistema QS.

Para obtener un rango amplio en las CSI se tomó $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$ de la CMI de gentamicina y tobramicina (Tabla 4)

	Gentamicina ($\mu\text{g/ml}$)	Tobramicina ($\mu\text{g/ml}$)
1/2	0.15	1
1/4	0.075	0.5
1/8	0.037	0.25

Tabla 4. Concentraciones subinhibitorias (CSI) de gentamicina y tobramicina.

La búsqueda de inhibidores del sistema de QS es de suma importancia ya que estos pueden ser usados para controlar la virulencia de bacterias. Encontramos que los antibióticos probados inhiben el sistema QS de *P. aeruginosa*, donde gentamicina muestra una mayor reducción en los halos de inhibición de proteasas en las concentraciones probadas (Figura 6), similar al ácido salicílico (Figura 5). Mientras que en tobramicina se observa una menor reducción en la inhibición de proteasas en comparación con el ácido salicílico (Figura 7).

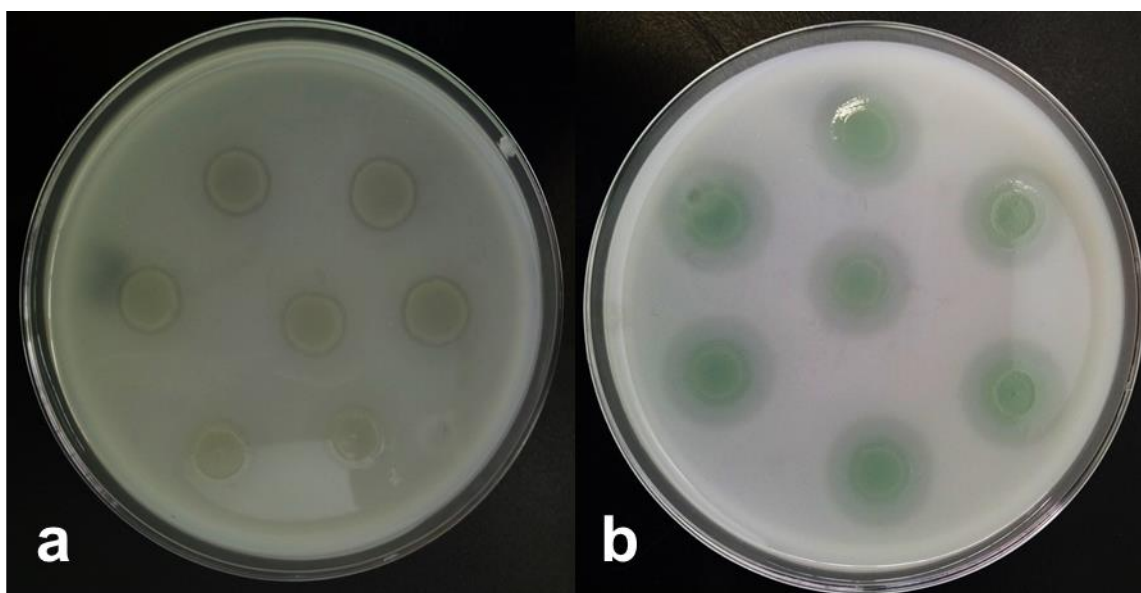


Figura 5. Control positivo y negativo.
a. Ácido salicílico 5 mM; b. Agua destilada

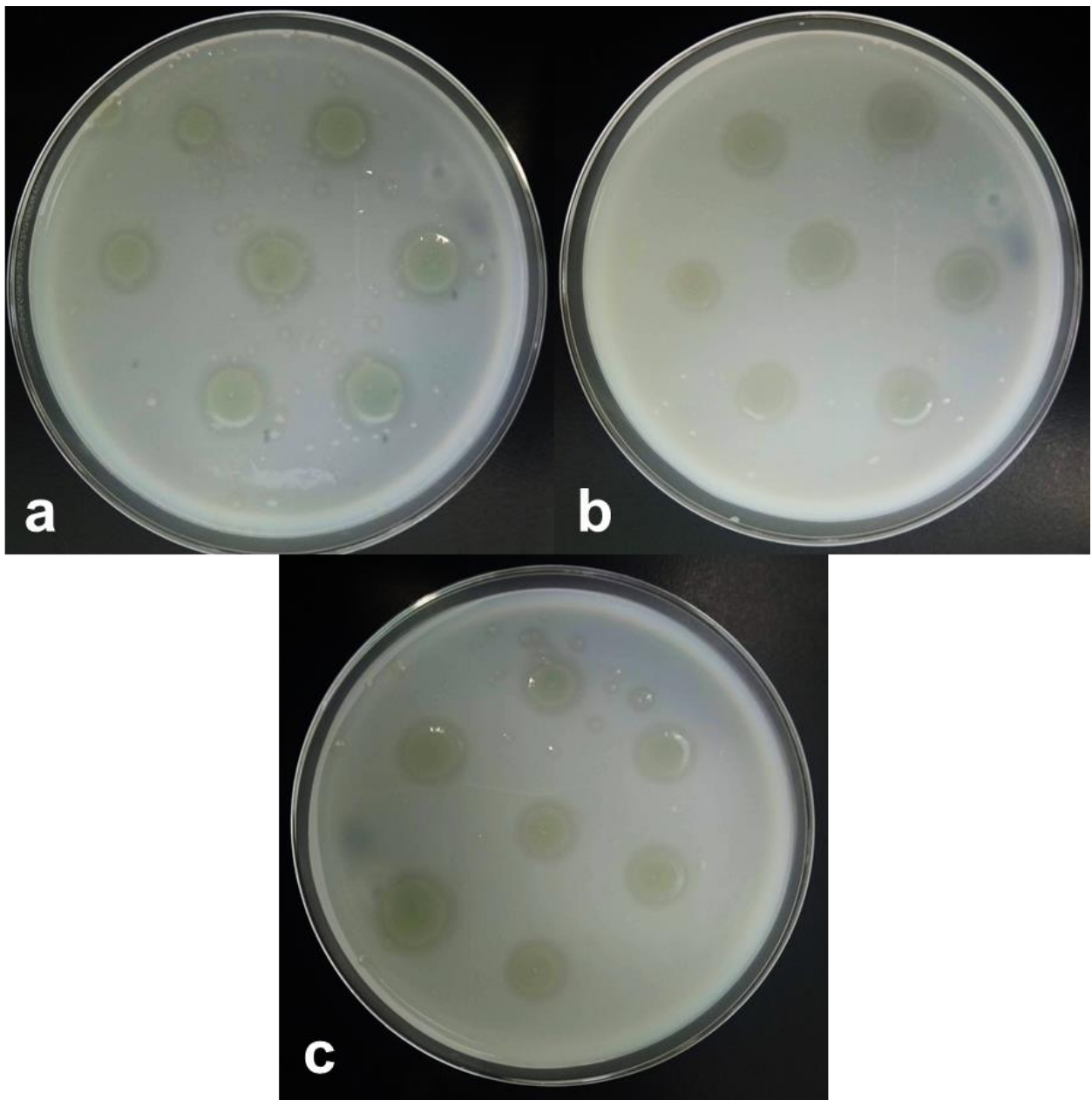


Figura 6. Actividad proteolítica de *P. aeruginosa* en las CSI de gentamicina.
a. 0.150 µg/ml; b. 0.075 µg/ml; c. 0.037 µg/ml

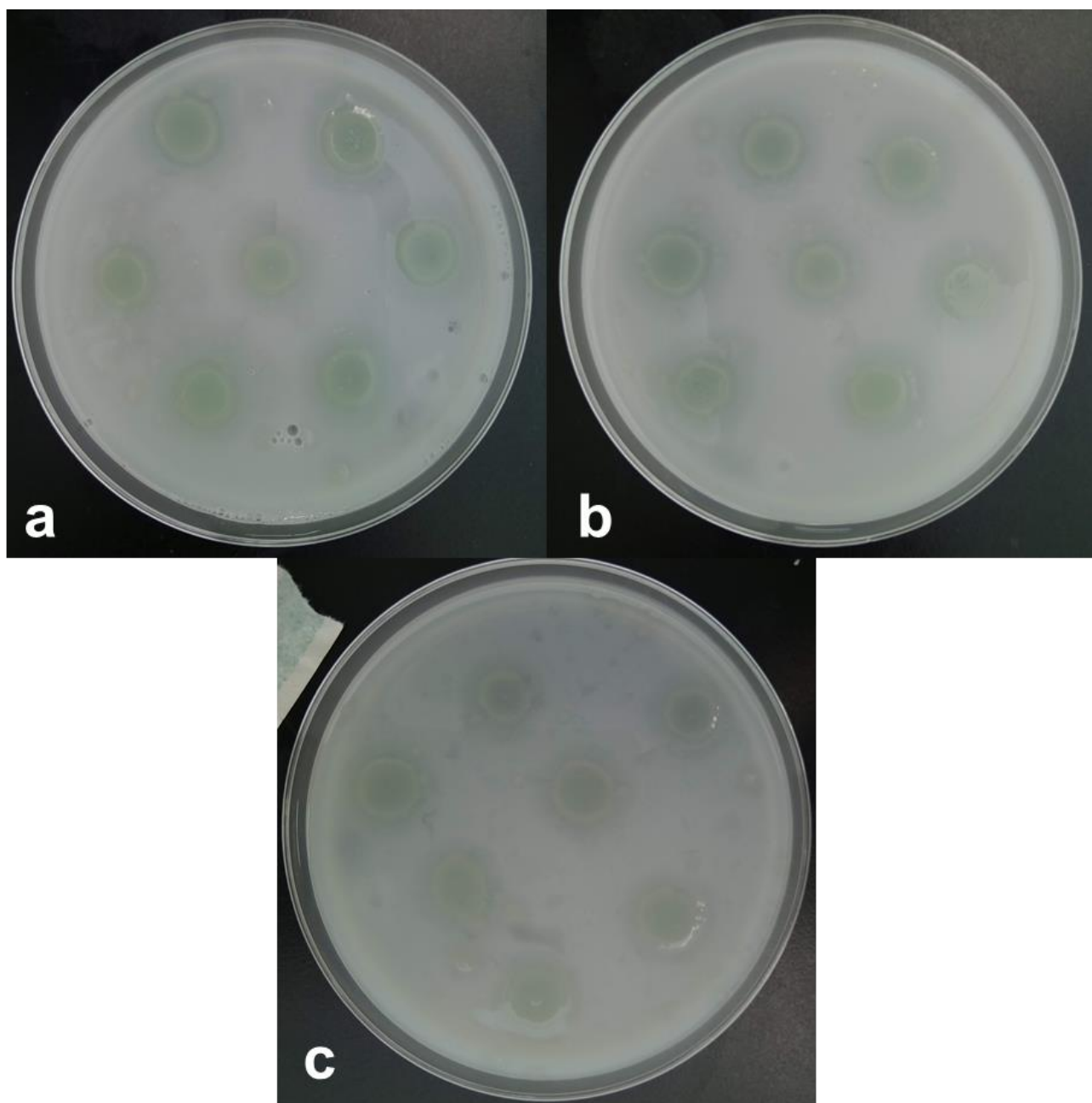


Figura 7. Actividad proteolítica de *P. aeruginosa* en las CSI de tobramicina.
a. 1 µg/ml; b. 0.5µg/ml; c. 0.25 µg/ml

Gentamicina causó la mayor inhibición de la actividad proteolítica de los antibióticos probados, este inhibió el 70%, 83%, y 72% (n=7, P=<0.001) de la actividad en las concentraciones de 0.15, 0.075 y 0.037 µg/ml, respectivamente. Lo anterior muestra que gentamicina tiene una actividad inhibitoria en las concentraciones estudiadas y una eficiencia similar al ácido salicílico, el cual inhibió el 88% de la actividad proteolítica (Figura 8).

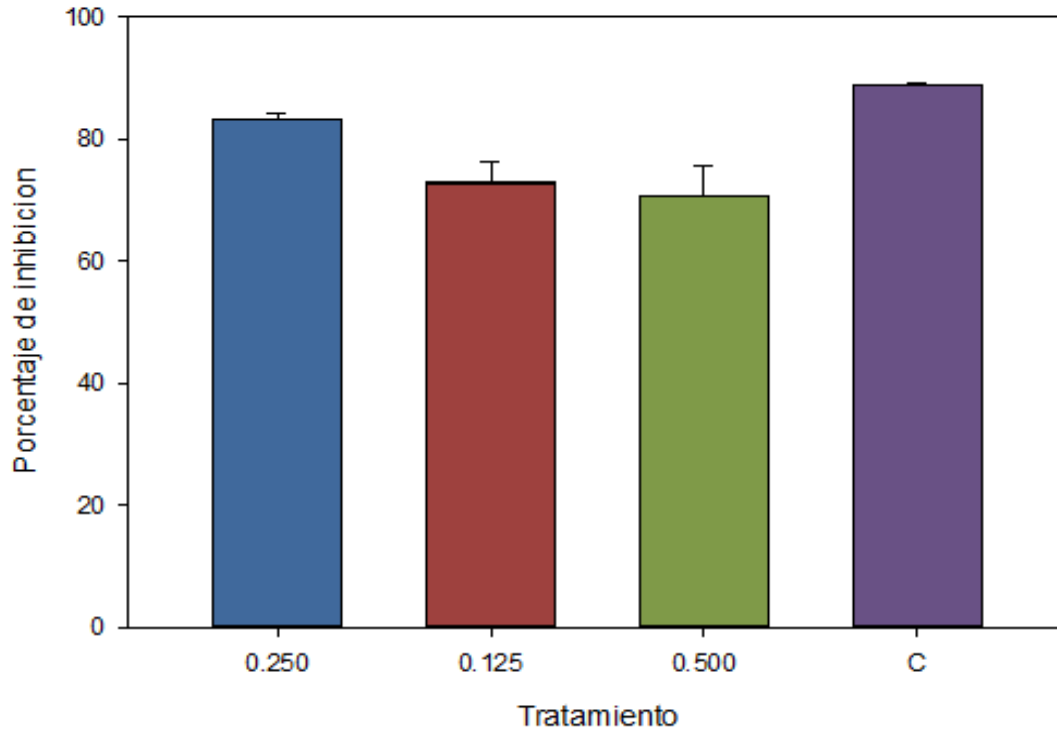


Figura 8. Inhibición de la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* por gentamicina.

La inhibición de la actividad proteolítica por las diferentes concentraciones de gentamicina concuerda con lo observado en estudios similares en *P. aeruginosa* donde se ha utilizado azitromicina (Tateda et al. 2001; Bala, Kumar and Harjai 2011) y polimixina (Cummins et al. 2009) para inhibir el sistema de QS. Algunas otras sustancias con propiedades antibacteriana como las antraquinonas (Coenye et al. 2007) y el carvacrol en concentraciones subinhibitorias también causan inhibición del sistema QS (Burt et al. 2014).

A diferencia de gentamicina, tobramicina presentó un efecto altamente dependiente de su concentración, causando una inhibición del 51% y 6% ($n=7$, $P < 0.001$) de la actividad proteolítica en las concentraciones de 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Además, encontramos un efecto promotor del 6% ($n=7$, $P < 0.001$) de la actividad proteolítica en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9).

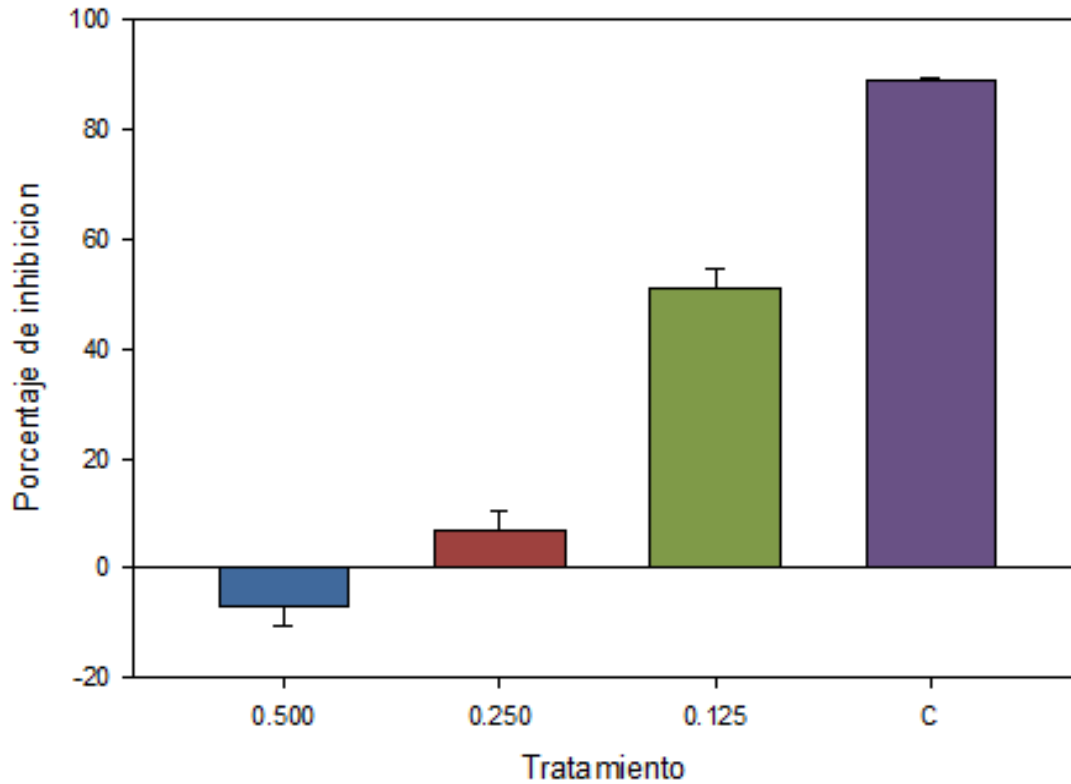


Figura 9. Inhibición y promoción de la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* por tobramicina.

Lo anterior sugiere que *P. aeruginosa* presenta una respuesta no-monotónica a la tobramicina. Para analizar esto, realizamos una correlación entre la concentración absoluta de tobramicina y su actividad inhibitoria, encontrando una relación inversamente proporcional a la concentración del antibiótico ($R = 0.785$, $n = 21$) (Figura 10). Esto contradice lo observado para tobramicina, donde se mostró que la inhibición del sistema de QS fue directamente proporcional a su concentración (Garske et al. 2004). No obstante, en el estudio antes mencionado utilizaron concentraciones dos órdenes de magnitud más elevadas que en nuestro estudio.

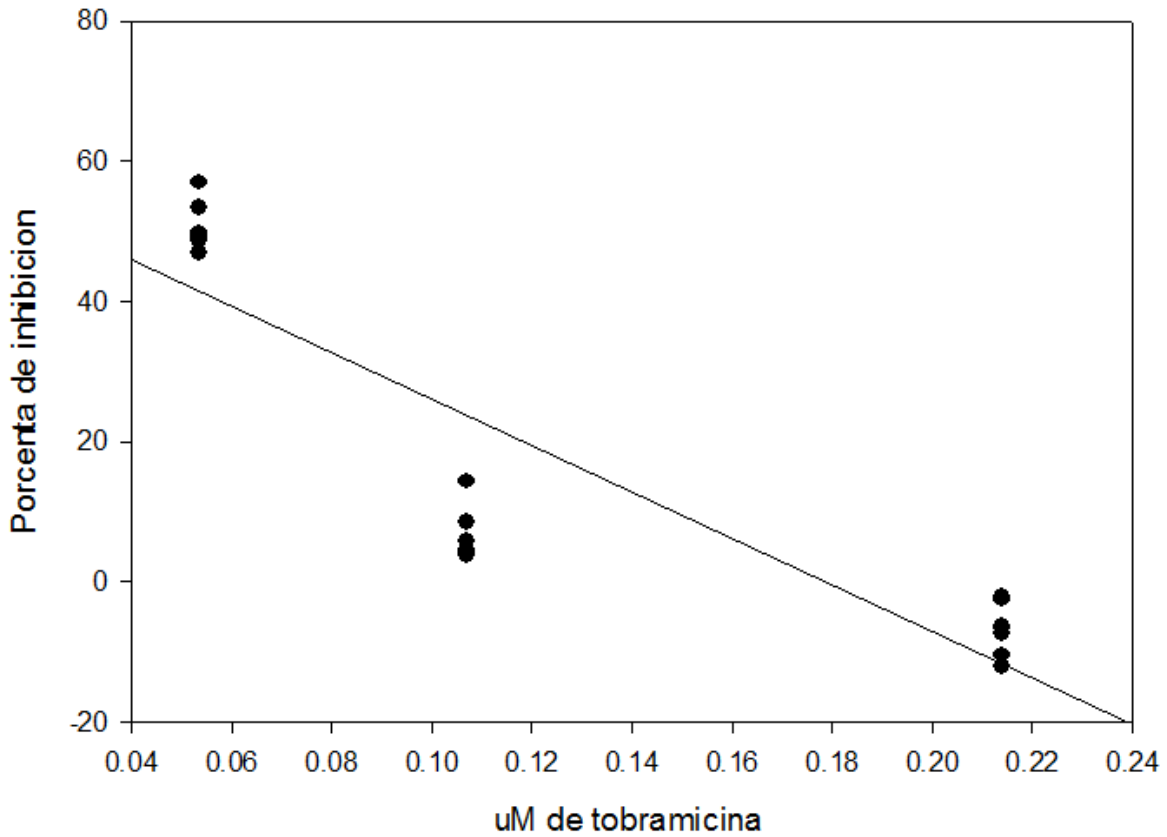


Figura 10. Correlación entre la concentración absoluta y la actividad inhibitoria de tobramicina.

Tobramicina y gentamicina pertenecen al grupo de antibióticos aminoglucósidos, por lo que son similares químicamente y comparten un mismo mecanismo de acción. Sin embargo, el efecto de ambos antibióticos es muy diferente. Nos preguntamos si estas respuestas se relacionan con la concentración absoluta de antibiótico por lo que realizamos una regresión entre la concentración absoluta y el porcentaje de inhibición del sistema de QS (Figura 11). Encontramos una relación entre la concentración absoluta de antibióticos y la actividad proteolítica al obtener un rango más amplio de concentraciones agrupando ambos antibióticos.

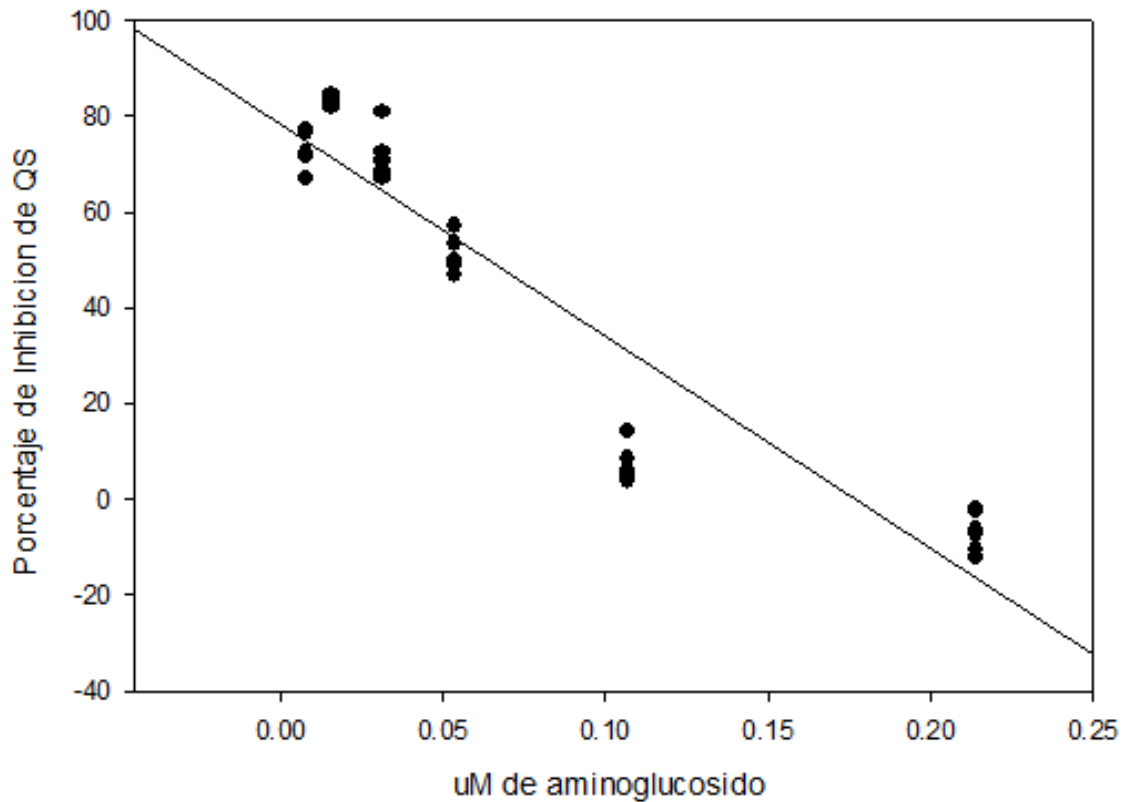


Figura 11. Correlación entre la concentración y la actividad inhibitoria de aminoglucósidos.

Al observar la relación entre la actividad absoluta y la actividad proteolítica podemos sugerir que *P. aeruginosa* presenta una respuesta no-monotónica de tres fases a los aminoglucósidos ($R = 0.785$, $n = 21$). La primera fase se presenta en concentraciones muy bajas de aminoglucósidos, mostrando una respuesta inhibitoria de la actividad proteolítica; la segunda fase ocurre en concentraciones bajas, causando una respuesta promotora de la actividad proteolítica; mientras que la tercera fase presente en concentraciones altas causa inhibición del crecimiento bacteriano.

Respuestas no-monotónicas similares a las observadas en este estudio han sido descritas en múltiples ocasiones. Por ejemplo, *Escherichia coli* presenta una respuesta de este tipo a ampicilina (Mathieu et al. 2016) y tetraciclina (Migliore, Rotini and Thaller 2013), así como *Photobacterium* a las sulfonamidas (Deng et al. 2012). A diferencia de estos estudios donde la respuesta no-monotónica es de dos fases, nuestro trabajo muestra la existencia de una respuesta de tres fases. No obstante, este tipo de respuestas son observadas utilizando rangos amplios de concentraciones, por lo que para confirmar esto, es necesario realizar un nuevo diseño experimental para extender el rango de concentraciones de ambos antibióticos.

CONCLUSIÓN

Encontramos una respuesta no monotónica en los aminoglucósidos estudiados, tobramicina y gentamicina, dentro de esta respuesta encontramos CSI en las que el antibiótico presenta una alta capacidad inhibitoria del sistema de QS de *P. aeruginosa*, esto muestra que estos aminoglucósidos tienen un alto potencial para ser usados como inhibidores del sistema QS

LITERATURA CITADA

Andersson D and Hughes D, Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. 2014;12:465-478.

Bahari S, Zeighami H, Mirshahabi H *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;10:21–8.

Bala A, Kumar R, Harjai K. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *J Med Microbiol* 2011;60:300–6.

Balloux F, van Dorp L. Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? *BMC Biol* 2017;15:4–9.

Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 1997;179:4043–5.

Burt SA, Ojo-Fakunle VTA, Woertman J *et al.* The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One* 2014;9:1–6.

Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:91–7.

Coenye T, Honraet K, Rigole P *et al.* In vitro inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1541–4.

Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 2004;77:151–7.

Cummins J, Reen FJ, Baysse C *et al.* Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the *pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2009;155:2826–37.

Davies J. What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Mol Microbiol* 1990;4:1227–32.

Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:445–53.

Deng Z, Lin Z, Zou X *et al.* Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: A case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum*. *Environ Sci Technol*

2012;**46**:7746–54.

Deryabin DG, Inchagova KS. Subinhibitory concentrations of the penicillin antibiotics induce quorum-dependent violacein synthesis in *Chromobacterium violaceum*. *Microbiology* 2017;**86**:463–8.

Dong YH, Wang LH, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2007;**362**:1201–11.

Dong YH, Xu JL, Li XZ *et al.* AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:3526–31.

El-Mowafy SA, Abd El Galil KH, Habib ESE *et al.* Quorum sensing inhibitory activity of sub-inhibitory concentrations of β -lactams. *Afr Health Sci* 2017;**17**:199–207.

Fetzner S. Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol* 2015;**201**:2–14.

Fuqua C, Winans SC. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol* 1996;**178**:435–40.

Forge A y Schacht J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol Neurootol* 2000;5:3–22

Garske LA, Beatson SA, Leech AJ *et al.* Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology* 2004;**36**:571–5.

Goh E-B, Yim G, Tsui W *et al.* Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci* 2002;**99**:17025–30.

Gupta P, Chhibber S, Harjai K. Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian J Med Res* 2016;**143**:643–51.

Gupta RK, Setia S, Harjai K. Expression of Quorum Sensing and Virulence Factors Are Interlinked in *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro Approach. *Am J Biomed Sci* 2011;**3**:116–25.

Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003;**112**:1300–7.

Huber B, Riedel K, Hentzer M *et al.* The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 2001;**147**:2517–28.

Husain FM, Ahmad I, Khan MS *et al.* Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* 2015;**6**:1–12.

Inoue T, Shingaki R, Fukui K. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-

chain fattyacids. *FEMS Microbiol Lett* 2088;281:81–86

Jadhav RW, Kobaisi M Al, Jones LA *et al.* The Supramolecular Self-Assembly of Aminoglycoside Antibiotics and their Applications. *ChemistryOpen* 2019;**8**:1154–66.

Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002;**291**:605–14.

Kalia VC, Purohit HJ. Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. *Crit Rev Microbiol* 2011;**37**:121–40.

Keshavan ND, Chowdhary PK, Haines DC *et al.* L-canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2005;**187**:8427–36.

Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017;**7**:478–82.

Khan MSA, Zahin M, Hasan S *et al.* Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett Appl Microbiol* 2009;**49**:354–60.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:423–35.

Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides : Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance Downloaded from <http://aac.asm.org/> on March 26 , 2013 by NATIONAL CENTRE FOR BIOLOGICAL SCIENCES Aminoglycosides : Perspectives on Mechanisms of Ac. 2000;**44**, DOI: 10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000.Updated.

Krause KM, Serio AW, Kane TR *et al.* Aminoglycosides : An Overview. 2016.

Labbate M, Zhu H, Thung L *et al.* Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* 2007;**189**:2702–11.

Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2014;**6**:26–41.

Lilley BN, Bassler BL. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54. *Mol Microbiol* 2000;**36**:940–54.

Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005;**105**:477–97.

Mathieu A, Fleurier S, Frénoy A *et al.* Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response

in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics. *Cell Rep* 2016;**17**:46–57.

Mariscal A, Peinado M, Carnero-Varo M, Fernández-Crehuet J. Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio harveyi*. *Chemosphere* 2003;50:349–354

McClellan KH, Winson MK, Fish L *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 1997;**143**:3703–11.

Migliore L, Rotini A, Thaller MC. Low doses of tetracycline trigger the *E. coli* growth: A case of hormetic response. *Dose-Response* 2013;**11**:550–7.

Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 2001;55:165-199.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;**43**:727–37.

Pailin T, Kang DH, Schmidt K *et al.* Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett Appl Microbiol* 2001;**33**:45–9.

Patriquin GM, Banin E, Gilmour C *et al.* Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2008;**190**:662–71.

Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R *et al.* A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J* 1993;**12**:2467–76.

Pirofski L, Casadevall A. Q and A What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biol* 2012;**10**:2–4.

Prithiviraj B, Bais HP, Weir T *et al.* Down Regulation of Virulence Factors of. *Society* 2005;**73**:5319–28.

Qazi S, Qazi S, Cockayne A *et al.* Lactones Antagonize Virulence Gene Expression and Quorum Sensing in. *Society* 2006;**74**:910–9.

Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010;**13**:151–71.

Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB *et al.* How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* 2000;**146**:3237–44.

Reverchon S, Chantegrel B, Deshayes C *et al.* New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorganic Med Chem Lett* 2002;**12**:1153–7.

Rutherford ST, Bassler BL, Hayes CS *et al.* Bacterial Quorum Sensing : Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;1–26.

Saroj SD, Rather PN. Streptomycin Inhibits Quorum Sensing in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;**57**:1926–9.

Schaefer AL, Hanzelka BL, Eberhard A *et al.* Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol* 1996;**178**:2897–901.

Sifri CD, Mylonakis E, Singh K V *et al.* Virulence Effect of. *Society* 2002;**70**:5647–50.

Shaw W V. Chloramphenicol Acetyl Transferase. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem* 1991;20:363-86

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* 2004;28:519–542

Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R *et al.* Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008a;**52**:3648–63.

Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R *et al.* Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008b;**52**:3648–63.

Smith KM, Bu Y, Suga H. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Curr Biol* 2003;**13**:546–53.

Smith R, Coast J. Antimicrobial resistance : resistance : the true the cost true cost. 2019;**346**:20–2.

Sokol PA, Ohman DE, Iglewski BH. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1979;**9**:538–40.

Soto-Estrada G, Moreno-Altamirano L, Pahua Díaz D. Epidemiological overview of Mexico's leading causes of morbidity and mortality. *Rev la Fac Med la UNAM* 2016;**59**:8–22.

Sperandio V, Torres AG, Jarvis B *et al.* Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:8951–6.

Sydnor ERM, Perl TM. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev* 2011;**24**:141–73.

Tateda K, Comte R, Pechere JC *et al.* Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**:1930–3.

Teasdale ME, Liu J, Wallace J *et al.* Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus*

salinus that Inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:567–72.

Tereshchenkov A, Dobosz-Bartoszek M, Osterman A, Marks J, Sergeeva M, Kasatsky P, Komarova E, Stavrianidi, A, Rodin i, Konevega A, Sergiev P, Sumbatyan n, Mankin A, Bogdanov A, Polikanov, Y. Binding and Action of Amino Acid Analogs of Chloramphenicol upon the Bacterial Ribosome. *Journal of Molecular Biology* 2018. 430;16: 842-852

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;**33**:378–455.

Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rajaonson S *et al.* Identification of catechin as one of the flavonoids from combretum albiflorum bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in pseudomonas aeruginosa PAQ1. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:243–53.

Vuong C, Saenz HL, Götz F *et al.* Impact of the agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in Staphylococcus aureus . *J Infect Dis* 2000;**182**:1688–93.

Wachino JI, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resist Updat* 2012;**15**:133–48.

Waksman SA. The Role of Antibiotics in Nature. *Perspect Biol Med* 1961;**4**:271–87.

Wang W, Yu W, Liu Z *et al.* Antibiotics at subinhibitory concentrations improve the quorum sensing behavior of Chromobacterium violaceum . *FEMS Microbiol Lett* 2013;**341**:37–44.

Wareham D, Wilson P. Chloramphenicol in the 21st century. *Hospital Medicine* 2002;633:157-161.

Waters CM, Bassler BL. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;**21**:319–46.

Weiss LE, Badalamenti JP, Weaver LJ *et al.* Engineering motility as a phenotypic response to LuxI/R-dependent quorum sensing in Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng* 2008;**100**:1251–5.

Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F *et al.* Characterization of Staphylococcus aureus biofilm formation in urinary tract infection. *Iran J Public Health* 2016;**45**:485–93.