



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

EFFECTO DE UNOS DERIVADOS DE FURANONAS Y PIRROLIDONAS SOBRE
EL SISTEMA DE PERCEPCIÓN DE QUÓRUM DE *Pseudomonas aeruginosa*.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
NELLY ARACELI ABURTO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MEXICO, ENERO 2024



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.

DEDICATORIA.

A mis padres porque gracias a su amor, dedicación y confianza yo pude cumplir este sueño. Gracias por todos sus esfuerzos para que yo pudiera seguir estudiando.

A mi hermano que siempre ha estado conmigo y con sus locuras alegra mis días.
Por hacerme reír hasta en los malos momentos.

EN MEMORIA.

En recuerdo a mi amado padre, como un tributo a todo tu amor, cuidado y dedicación. Aunque ya no estes conmigo, tu amor incondicional y consejos siguen guiándome en este camino. Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres, Silvia y Efrén, por su amor y confianza en mí. También a mi hermano Jesús por su apoyo constante. Y por darme ánimos para no rendirme en los momentos difíciles que pasamos.

A mi asesor, el Dr. Mariano Martínez por todo su apoyo, comprensión y paciencia para guiarme en este trabajo. Y también por brindarme parte de su tiempo y un lugar dentro de su laboratorio.

A la Dra. Gloria Soberón por brindarme espacio en su laboratorio y todo el apoyo. A los miembros de su laboratorio por el tiempo compartido, especialmente a Abi por su apoyo y enseñanza.

Al Dr. Rodolfo García por su atención, apoyo y el espacio en su laboratorio para realizar los experimentos. A los miembros de su laboratorio por todo el tiempo compartido, en especial a Bere y a Pau por sus consejos.

A todos mis compañeros de laboratorio: Víctor, Delia, Javier, Lidia, David, Sonia por su amistad y enseñanzas.

A mi amiga Abigail por siempre estar conmigo, por todos los momentos felices y por aguantarme en mis peores momentos.

A mi amigo Christian por todos los buenos momentos que hemos compartido.

A la UNAM y al Posgrado de Ciencias Biomédicas por permitirme crecer académicamente.

AL CONAHCYT por el apoyo económico brindado en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS.

A la Dra. Toshiko Takahashi Iñiguez por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Abigail González Valdez por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

CONTENIDO.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
INTRODUCCION.....	9
1. ANTECEDENTES.....	10
1.1 Resistencia a antibióticos.....	10
1.2 Resistencia intrínseca y adquirida.....	11
1.3 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	12
1.3.1 Baja permeabilidad del antibiótico.....	13
1.3.2 Inactivación del antibiótico.....	14
1.3.3 Bombas de eflujo.....	14
1.3.4 Modificación del blanco.....	15
1.4 Clasificación de la resistencia.....	16
1.5 Uso de fármacos en la agricultura y ganadería.....	17
1.6 Panorama mundial sobre fármaco-resistencia.....	17
1.7 Panorama de la fármaco-resistencia en México.....	20
1.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.9. Factores de virulencia.....	23
1.9.1. Lipopolisácaridos.....	23
1.9.2. Alginato.....	24
1.9.3. Elastasa (LasB).....	25
1.9.4. Proteasa alcalina.....	25
1.9.5. Pioverdina.....	26
1.9.6. Piocianina.....	27
1.9.7. Acido cianhídrico (HCN).....	28
1.9.8. Ramnolípidos (RL).....	28
1.10. Biopelícula en <i>P. aeruginosa</i>	29
1.11. Movimiento tipo enjambre (swarming).....	31
1.12. Sistema de secreción tipo III (SST3).....	32
1.13. Sistema de percepción de quorum (SPQ).....	35
1.14. SPQ en <i>P. aeruginosa</i>	38
1.15. Nuevas alternativas de tratamiento.....	39

1.15.1. Compuestos anti-SPQ.....	41
1.15.1.1. Degradación del autoinductor.	42
1.15.1.2. Inhibición del regulador transcripcional.	43
1.15.1.3. Análogos de AHL de origen natural.	44
1.15.1.4. Furanonas sintéticas.....	47
2. JUSTIFICACIÓN.....	48
3. HIPOTESIS.....	49
4. OBJETIVOS.....	50
4.1 Objetivo general.....	50
4.2 Objetivos particulares.....	50
5. MATERIALES Y METODOS.....	50
5.1 Cepas y compuestos.....	50
5.2 Síntesis de compuestos serie C.....	51
5.3 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en presencia de las furanonas y pirrolidonas.	52
5.4 Efecto de las furanonas y pirrolidonas en la producción de piocianina.	52
5.5 Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la formación de biopelícula. .52	
5.6 Efecto de las furanonas y pirrolidonas en el movimiento tipo swarming.	53
5.7 Regulación de los genes involucrados en QS por las furanonas y pirrolidonas.....	53
5.8 Análisis estadísticos.....	53
6. RESULTADOS.....	53
6.1 Síntesis de compuestos de la serie C.....	53
6.2 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en presencia de las furanonas y pirrolidonas.	55
6.3 Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la producción de piocianina. 56	
6.4 Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la formación de biopelícula. .57	
6.5 Efecto de las furanonas y pirrolidonas en la movilidad tipo <i>swarming</i>	59
6.6 Efecto de furanonas sobre los reguladores del SPQ.	60
7. DISCUSION.....	61
8. CONCLUSIONES.....	64
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. BIBLIOGRAFIA.....	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ABC	Casete de unión al ATP
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADPRT	Adenosin difosfato ribosyl transferase
AHL	Acil homoserine lactone
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CDC	Centro de control de enfermedades
cGMP	Guanosin monofosfato cíclico
cUMP	Uracil monofosfato cíclico
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPS	Dihidropteroato sintetasa
EE. UU	Estados Unidos
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESBL	Beta lactamasa de amplio espectro
HCN	Ácido cianhídrico
HDMF	4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona
IFN- γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL2	Interleucina 2
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
JNK	Cinasa Jun N-terminal
LPS	Lipopolisacáridos
MATE	Extrusión de compuestos multifármaco y tóxicos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MFR	Multi fármaco resistente
MFS	Superfamilia facilitador principal

ncRNA	Ácido ribonucleico no codificante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFR	Pan fármaco resistente
PUCRA	Plan Universitario de control de la resistencia antimicrobiana
PUP	Proteínas de unión a la penicilina
RL	Ramnolípidos
RND	Resistencia nodulación división celular
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SMR	Familia de fármaco resistencia
SPNR	Sintetasas de péptido no ribosomales
SPQ	Sistema de percepción de quórum
SST3	Sistema de secreción tipo 3
TGF-B	Factor de crecimiento transformante beta
TLR5	Receptor tipo Toll 5
TNF- α	Factor alfa de necrosis tumoral
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UE	Unión Europea
XFR	Extensivamente fármaco resistente

RESUMEN.

Las infecciones causadas por organismos fármaco-resistentes son un problema de salud pública mundial debido a que tienen mayores tasas de mortalidad y morbilidad. Por esta razón, la OMS ha solicitado el desarrollo de nuevos antibióticos o alternativas para el tratamiento de estas infecciones. *P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista que causa infecciones nosocomiales y de difícil erradicación por su elevada tasa de resistencia. Esta bacteria tiene un sistema conocido como sistema de percepción de quorum (SPQ), por el cual produce compuestos como piocianina, biopelícula o swarming que definen diversos fenotipos que permiten la invasión y el daño de las células del hospedero. Se ha demostrado que inhibir el SPQ de las bacterias disminuye la virulencia y puede ayudar a la eliminación de la infección sin someter a las bacterias a una presión de selección, por lo que, no se seleccionarían cepas resistentes. En este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria del SPQ de 9 furanonas (grupos A y B) y 7 pirrolidonas (grupo C) en dos cepas de *P. aeruginosa* PA14 (referencia) e INP64 (aislado clínico fármaco resistente) midiendo la producción de piocianina, formación de biopelícula y movimiento tipo swarming, además, se determinó el posible blanco molecular. Los resultados indican que las furanonas del grupo A disminuyen la producción de piocianina, formación de biopelícula y el movimiento de swarming tanto en la cepa de referencia PA14 como en el aislado clínico INP64 mientras que solo dos compuestos de los otros dos grupos B2, B6, C1 y C7 disminuyen la formación de biopelícula en solo una de las cepas. Estos hallazgos muestran que las furanonas del tipo A son inhibitoras de SPQ de *P. aeruginosa*.

INTRODUCCION.

El aumento de las infecciones causadas por organismos fármaco-resistentes son un problema de salud pública mundial debido a que tienen mayores tasas de mortalidad y morbilidad. Por esta razón, la OMS ha solicitado el desarrollo de nuevos antibióticos o alternativas para el tratamiento de estas bacterias entre las que destaca *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria oportunista causa infecciones nosocomiales y tiene una elevada tasa de resistencia a antibióticos por lo que es difícil su erradicación. En México se ha reportado que esta bacteria tiene alta prevalencia en infecciones nosocomiales y presenta resistencia a 4 de los 6 antibióticos de primera línea (Garza-González et al., 2019; Miranda-Novales et al., 2020).

El desarrollo de nuevos antibióticos nos daría una solución temporal debido a que las bacterias se adaptaran para resistir la presencia de los mismos. Por esta razón, es importante encontrar nuevas alternativas de tratamiento que no inhiban el crecimiento bacteriano para evitar la presión de selección y la aparición de resistencia. Una de estas alternativas son los tratamientos anti-virulencia que inhiben el sistema de percepción de quorum (SPQ), responsable de la producción o formación de fenotipos relacionados con la virulencia, sin afectar el crecimiento bacteriano. Hay varios estudios que demuestran que inhibir el SPQ y disminuir la virulencia aumenta la sobrevivencia de hospedero y puede ayudar a la eliminación de la infección (Gupta et al., 2015; Wu et al., 2004).

Se ha demostrado ampliamente que la furanona bromada C-30 es capaz de inhibir el SPQ en *P. aeruginosa*, sin embargo, algunas cepas no son susceptibles a su acción y aún se desconocen los mecanismos (García-Contreras et al., 2013). Por esta razón, en este trabajo se evaluaron nuevas estructuras de furanonas agrupadas en tres series (A, B y C) sobre el SPQ de dos cepas de *P. aeruginosa* PA14 e INP64.

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *P. aeruginosa*: la cepa tipo PA14 y un aislado clínico farmacoresistente INP64. Estas dos cepas fueron crecidas en medio

LB con la presencia de furanonas (grupos A y B) y pirrolidonas (grupo C). Los factores de virulencia evaluados fueron la producción de piocianina, la formación de biopelícula y el movimiento tipo swarming. Además, se determinó el posible blanco molecular de los compuestos evaluados mediante la actividad del reportero B-gal.

Los resultados mostraron que las 3 furanonas del grupo A inhiben a una concentración de 100 μM los tres factores de virulencia probados, mientras que las furanonas B2 y B6 disminuyen la formación de biopelícula en ambas cepas a 500 μM aunque aumentan la producción de piocianina en la cepa INP64. Por otro lado, las pirrolidonas C1 y C7 disminuyen la producción de piocianina en la cepa PA14, mientras que la C5 disminuye la formación de biopelícula en ambas cepas a 500 μM . El posible blanco molecular de las furanonas A2 y A3 es RhIR y PqsR, ya que disminuyen la expresión de los genes *rhIA*, *pqsA* y *phz*.

Las furanonas del grupo A son las más efectivas en la interrupción del SPQ de *P. aeruginosa* porque disminuyen la producción de piocianina, formación de biopelícula y swarming en la cepa de referencia PA14 y en el aislado clínico INP64.

1. ANTECEDENTES.

1.1 Resistencia a antibióticos.

Hay dos fenómenos por los cuales una bacteria puede sobrevivir en presencia de un antibiótico: uno de ellos es la persistencia y otro la resistencia. La persistencia es un fenómeno que se da cuando algunas bacterias no son susceptibles a los antibióticos debido a que permanecen en estados metabólicos muy bajos o inactivos (dormante). Sin embargo, esas bacterias dormantes no tienen genes de resistencia por lo que la siguiente generación no será resistente (Reygaert, 2018).

En cambio, la resistencia a antibióticos o fármaco-resistencia es la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia de los fármacos utilizados para eliminarlo, a diferencia de la persistencia, todos los mecanismos de resistencia se encuentran codificados en genes por lo que la siguiente generación bacteriana será resistente (Figura 1) (Reygaert, 2018).

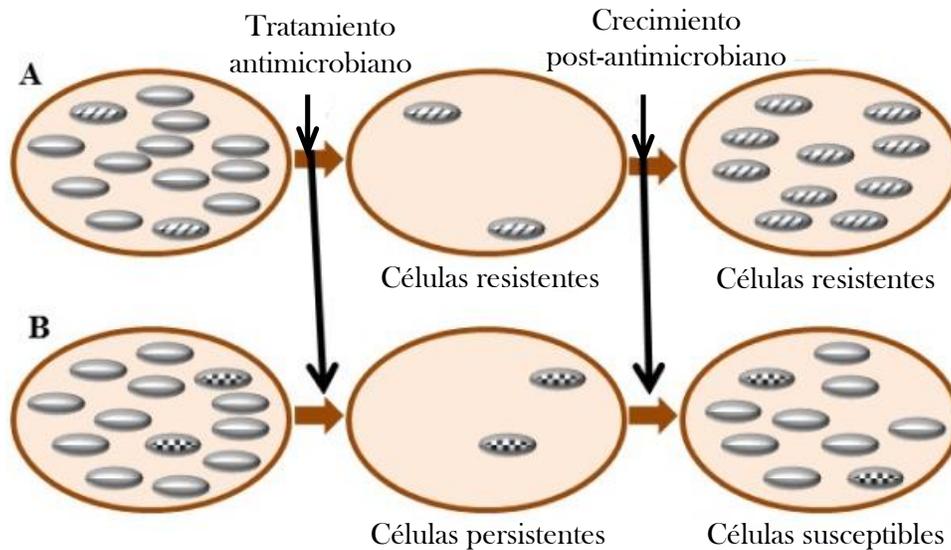


Figura 1. Diferencia entre persistencia y resistencia. La población bacteriana es sometida a un tratamiento antimicrobiano en A) las células resistentes sobreviven al tratamiento y heredan esa resistencia a la población nueva, mientras que en B) las células que sobrevivieron al tratamiento siguen siendo susceptibles. Fuente: (Reygaert, 2018).

La fármaco-resistencia es una amenaza grave a la salud pública debido a que las infecciones causadas por microorganismos resistentes son más difíciles de erradicar y aumentan la probabilidad de muerte del paciente. Además, generan aumento en los costos y estancias hospitalarias (CDC, 2019).

1.2 Resistencia intrínseca y adquirida.

Las bacterias no responden de manera uniforme a la exposición de antibióticos, hay ciertos grupos bacterianos que pueden presentar resistencia de manera intrínseca o adquirirla a través de ciertos procesos (Reygaert, 2018).

La resistencia intrínseca es una característica que está presente naturalmente en la bacteria, se expresa independiente a la presencia del antibiótico y no se relaciona con la transferencia horizontal de genes. Algunos de estos mecanismos son la baja permeabilidad de la membrana externa y las bombas de eflujo que pueden ser inducidas por la presencia del antibiótico (Pérez-Gracia, 2021).

La resistencia puede ser adquirida a través de mutaciones en el material genético, así como, por transferencia horizontal de genes. La transferencia horizontal es el movimiento de material genético entre organismos y ocurre por tres vías: transformación, transducción y conjugación (Chavez-Jacobo, 2020). Estos genes adquiridos después pueden ser heredados a la descendencia por transferencia vertical (Figura 2).

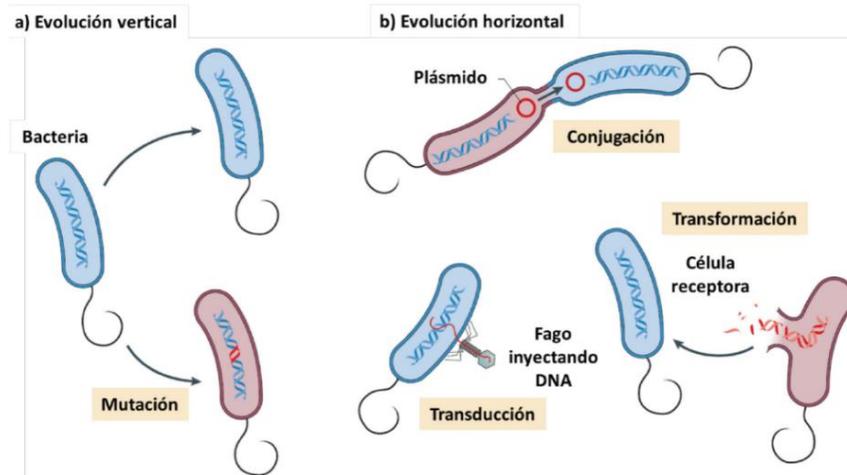


Figura 2. Vías de adquisición de genes de resistencia bacteriana. En la imagen izquierda se observa la transferencia vertical de los genes y en la derecha se observan los tres mecanismos de transferencia horizontal de genes: la conjugación, transformación y transducción. Las células rojas son donadoras y las células azules receptoras. Fuente (Chavez-Jacobo, 2020).

1.3 Mecanismos de resistencia bacteriana.

La resistencia bacteriana puede ser natural o adquirida. Hay características intrínsecas de las bacterias que les confieren resistencia natural mientras que hay características que se adquieren de genes exógenos de resistencia. Los mecanismos de resistencia bacteriana pueden ser de cuatro tipos: baja permeabilidad del antibiótico, bombas de eflujo, inactivación del antibiótico y modificación del blanco (Figura 3).

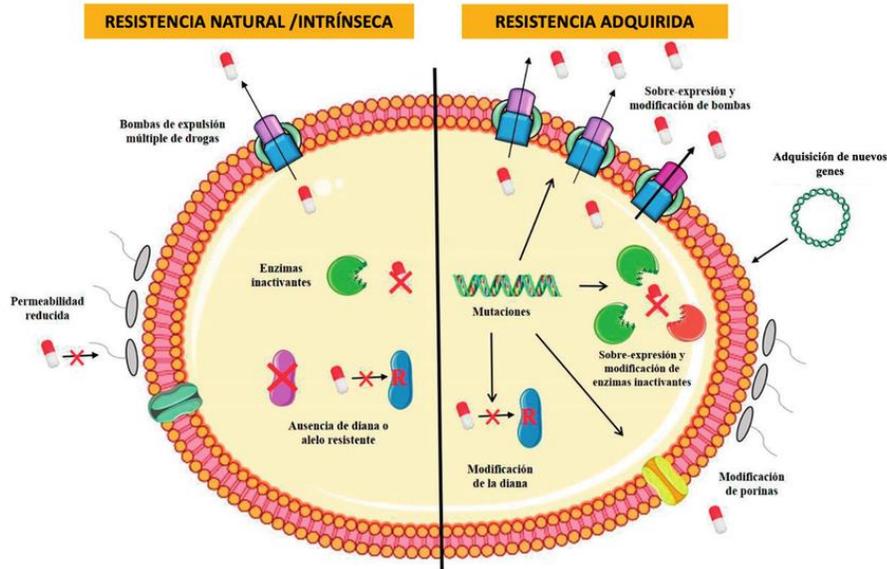


Figura 3. Principales mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida. De lado izquierdo se esquematizan las características que presentan las bacterias de forma natural y les brindan resistencia. De lado derecho se observan los mecanismos adquiridos a través de ADN exógeno o mutaciones. Tomada de (Pérez-Gracia, 2021).

1.3.1 Baja permeabilidad del antibiótico.

Los antibióticos deben penetrar al interior de la bacteria para llegar a su blanco y llevar a cabo su acción (Lambert, 2002). Para poder entrar deben atravesar la membrana externa de bacterias Gram-negativas o la pared celular de Gram-positivas.

La membrana externa es una bicapa de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) que actúa como barrera selectiva ante la entrada o salida de diversos compuestos, entre ellos, los antibióticos (Reygaert, 2018). La membrana tiene proteínas que atraviesan la membrana y actúan como canales, llamadas porinas. Estas porinas pueden limitar la entrada de antibióticos de dos maneras: disminuir la cantidad de porinas o modificar su selectividad (Pérez-Gracia, 2021).

La pared celular es una capa gruesa compuesta por péptidoglicanos y en algunas bacterias puede tener estructuras como ácidos micólicos que restringen la entrada a moléculas polares, como los aminoglucósidos (Lambert, 2002).

1.3.2 Inactivación del antibiótico.

Las bacterias producen enzimas que hidrolizan o modifican el antibiótico como mecanismo de resistencia. Muchos de los antibióticos tienen enlaces químicos que son fáciles de hidrolizar (Pang et al., 2019). Las β -lactamasas son un grupo grande de enzimas que hidrolizan los β -lactámicos. La tetraciclina también puede ser hidrolizada debido al gen *tetX* (Blair et al., 2015).

La modificación es el resultado de la transferencia de grupos acetil, adenosil o fosforil a la estructura del antibiótico, dejándolo inactivo. La acetilación es el método más amplio ya que funciona con varios antibióticos (Blair et al., 2015).

1.3.3 Bombas de eflujo.

Las bombas de eflujo son importantes para la expulsión de sustancias tóxicas, pero pueden transportar gran variedad de compuestos, entre ellos, antibióticos. Estas bombas se expresan de manera constitutiva, sin embargo, algunas pueden ser inducidas o sobreexpresadas bajo ciertas condiciones o estímulos (Kumar, Mukherjee, & Varela, 2013).

Las bombas de eflujo pueden clasificarse por su estructura y fuente de energía en cinco familias: super familia facilitador principal (MFS), familia de casete de unión al ATP (ABC), familia pequeña de multi fármaco resistencia (SMR), familia de resistencia-nodulación-división celular (RND) y familia de extrusión de fármacos y compuestos tóxicos (MATE) (Kumar et al., 2013). Sus estructuras se ven en la figura 4.

En bacterias Gram-positivas encontramos bombas de eflujo de las familias MFS y MATE), mientras que en bacterias Gram-negativas están presentes miembros de las cinco familias (Reygaert, 2018).

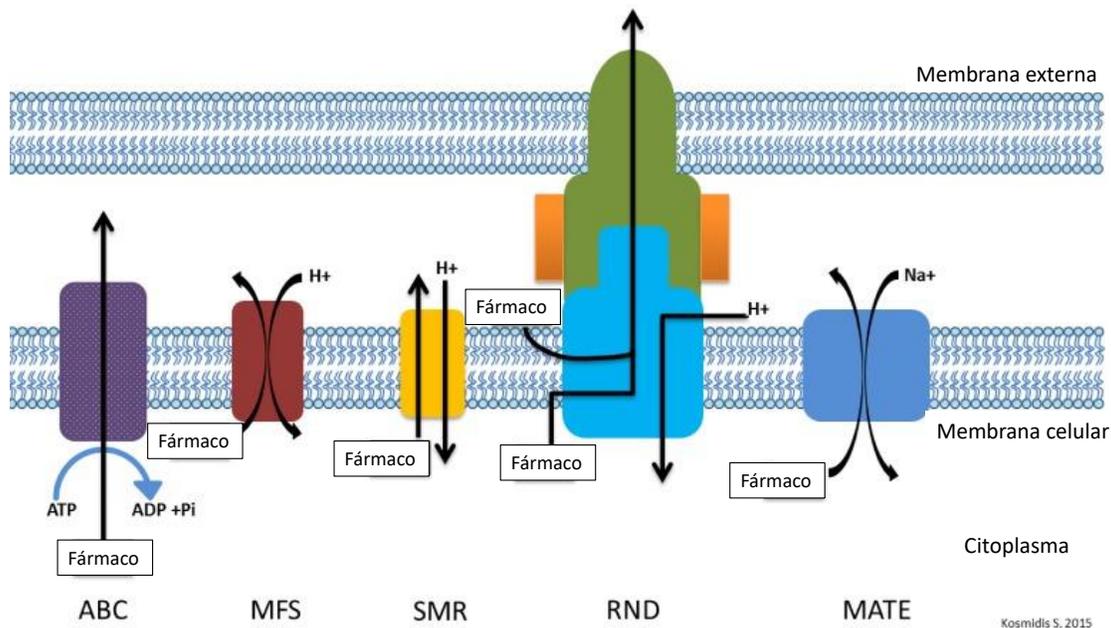


Figura 4. Estructura de las familias de bombas de eflujo. Las familias ABC, MFS, SMR y MATE son estructuras sencillas que expulsan los compuestos hacia el espacio periplásmico, mientras que la familia RND atraviesa la membrana externa y expulsa los compuestos hacia el espacio extracelular. La familia ABC necesita ATP para el transporte y las demás familias dependen de la entrada o salida de iones de hidrogeno y sodio. Fuente (Reygaert, 2018).

1.3.4 Modificación del blanco.

Las mutaciones en la información genética pueden derivar en cambios estructurales de enzimas o moléculas precursoras y en la sobreexpresión de enzimas evitando la acción del antibiótico y generando la resistencia bacteriana.

Una estrategia de Gram-positivas para evitar que la penicilina inhiba la síntesis de pared celular es aumentar el número de proteínas de unión a penicilina (PUP, involucradas en la síntesis de pared celular), por lo tanto, disminuirá la cantidad de PUP unidas a penicilina. Además, se ha reportado que las PUP tienen un cambio en la estructura que puede disminuir o evitar la unión del fármaco. Otra estrategia es cambiar la estructura de los precursores para evitar la acción de la vancomicina o cambios en la carga de la membrana para evitar la acción de la daptomicina. La mayoría de las bacterias Gram-negativas tienen resistencia intrínseca a estos fármacos debido a que su pared celular es muy delgada (Reygaert, 2009).

En el caso de síntesis de proteínas, el blanco principal es el ribosoma, por lo que, se han reportado mutaciones en el ribosoma como metilación de una subunidad del ribosoma. En el caso de síntesis de ácidos nucleicos, principalmente ADN, se ha reportado cambios en la estructura de la ADN girasa en Gram-negativos o en la topoisomerasa IV en Gram-positivos (Hawkey, 2003; Redgrave et al., 2014). Estos cambios disminuyen o evitan la unión del fármaco.

En el caso de la síntesis del ácido fólico, la resistencia se debe a mutaciones cerca del sitio activo de las enzimas DHPS y DHFR y su sobreproducción. Estas mutaciones evitan la unión del fármaco (Reygaert, 2018).

1.4 Clasificación de la resistencia.

Las bacterias se clasifican en tres categorías dependiendo de su nivel de resistencia: multi fármaco resistentes (MFR) que son resistentes a uno o varios fármacos en tres o más categorías, las extensivamente fármaco-resistentes (XFR) solo permanecen susceptibles a una o dos categorías de fármacos y las pan-fármaco resistentes (PFR) que son resistentes a todos los fármacos de todas las categorías (Magiorakos et al., 2012).

En la tabla 1 se muestra la distribución de las diferentes categorías de resistencia en bacterias Gram-negativas aisladas en México. Se observa que *Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa* son las que presentan el mayor número de cepas XFR y potenciales PFR (Garza-González et al., 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de bacterias Gram-negativas de acuerdo con sus niveles de resistencia. Datos traducidos de (Garza-González et al., 2019).

Microorganismo (n)	MFR n (%)	Posibles XFR n (%)	XFR verdaderos n (%)	Posibles PFR n (%)
<i>Acinetobacter</i> sp (861)	459 (53)	372 (43.2)	76 (8.8)	334 (38.8)
<i>Kleibsellla</i> sp. (3334)	752 (22.6)	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> (11676)	2261 (19.4)	942 (8.1)	0 (0)	5 (0.04)
<i>Enterobacter</i> sp (1334)	159 (11.9)	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> (1995)	175 (8.8)	165 (8.3)	3 (0.2)	87 (4.4)

ND: Sin datos. Solo se incluyeron las especies en las cuales el cálculo fue posible de acuerdo con la información disponible.

1.5 Uso de fármacos en la agricultura y ganadería

Los antibióticos también son usados para el tratamiento de las infecciones en la ganadería y la agricultura. Los animales consumen antibióticos para el tratamiento de infecciones, pero también se han empleado dosis subterapéuticas como promotores del crecimiento, principalmente en aves y cerdos. Las dosis empleadas, los tiempos prolongados de exposición y la recirculación de los antibióticos en el medio ambiente podrían inducir la selección de cepas resistentes, además, se pueden liberar las bacterias resistentes que sobrevivieran en el tracto digestivo (Suay-García et al., 2019). En el 2007 la Ley Federal de salud animal indico que era obligatorio usar una prescripción para usar antibióticos en la alimentación animal con el fin de reducir su consumo (Maron, Smith, & Nachman, 2013).

En la agricultura, los antibióticos son usados para el control de enfermedades y plagas. Aunque el porcentaje de antibiótico usado en la agricultura es mínimo (0.12%) el problema es que se dispersa en el suelo y en el agua donde promueve la aparición de resistencia. En México, la oxitetraciclina, la estreptomina y la gentamicina son usadas para controlar infecciones en cultivos de peras, duraznos y manzanas (Amábile-Cuevas, 2021).

El uso indiscriminado de antibióticos en estas áreas ha provocado la diseminación de genes de resistencia en el suelo y fuentes de agua, además de que pueden ser absorbidos por las frutas, las verduras y la carne de los animales (Pérez-Gracia, 2021). A mediados de los noventa se estableció la relación entre el aumento de la resistencia en patógenos humanos con el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la ganadería, por esta razón, la Unión Europea (UE) prohibió este uso desde el año 2006 y en Estados Unidos (EE. UU.) desde el 2017. Actualmente el consumo de antibióticos en la medicina veterinaria es tres veces mayor que en la humana contribuyendo a la selección de cepas resistentes (Pérez-Gracia, 2021).

1.6 Panorama mundial sobre fármaco-resistencia.

Según un estudio publicado en 2016, se estima que para 2050 las infecciones por bacterias multifármaco resistentes serán la causa número uno de muertes a nivel

mundial (Figura 5) (O'Neill, 2016). En un estudio reciente se estima que en el año 2019 murieron 1.27 millones de personas debido a la multiresistencia bacteriana. *Escherichia coli* es el patógeno que más muertes causó (Murray et al., 2022). La región más afectada es África sub-sahariana occidental donde se observa la mayor carga de muertes (Figura 6). En Estados Unidos se infectan 2.8 millones de personas con organismos farmacorresistentes cada año y más de 3500 personas mueren a causa de estas infecciones (CDC, 2019).

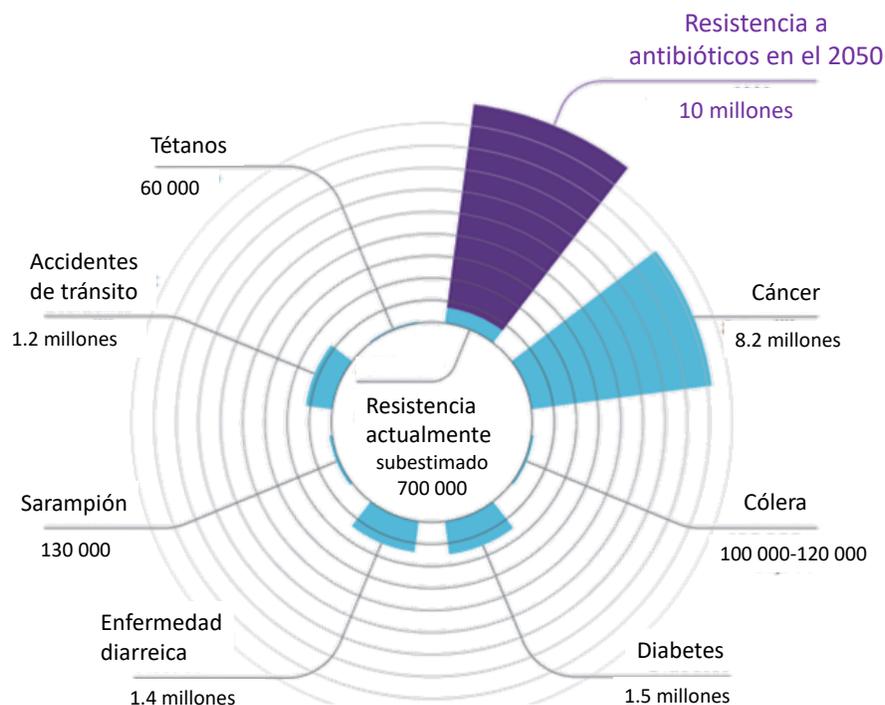


Figura 5. Estimación de muertes asociadas a la resistencia a antibióticos para el año 2050. En el año 2050 se estima que las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos serán la primera causa de muerte. Fuente (O'Neill, 2016).

En América Latina observamos que el 24.1% de las enterobacterias aisladas son productoras de beta lactamasas de amplio espectro (ESBL, por sus siglas en inglés), mientras que el 34% de las cepas de *P. aeruginosa* son MFR. A pesar de esto, algunas de estas bacterias son susceptibles a ceftazidima/avibactam (Stone & Ponce-De-Leon, 2020). En casos específicos la resistencia a colistina podría ser mayor (26.5%), tal es el caso de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con fibrosis quística (Amábile-Cuevas, 2021).

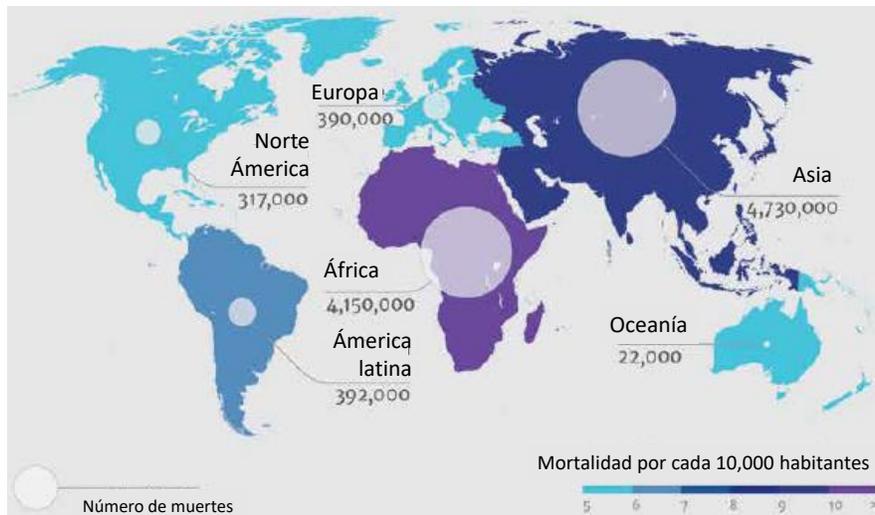


Figura 6. Distribución estimada de las muertes asociadas a la resistencia a antimicrobianos. Se observa que en Asia y en África habrá mayor carga de muertes. Fuente (O'Neill, 2016).

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un listado (Tabla 2) de las bacterias para las cuales es importante la creación de nuevos antibióticos debido a su alto perfil de resistencia y prevalencia en ambientes hospitalarios entre las que se encuentran *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Kleibsellla pneumoniae*, entre otras (Tacconelli et al., 2018).

Tabla 2. Listado de los patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos. Datos de la OMS.

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la metilicina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

1.7 Panorama de la fármaco-resistencia en México.

En México, se calcula que 450.000 casos de infecciones nosocomiales causan 32 muertes por cada 100.000 habitantes por año (OMS, 2020). Se ha reportado una mayor farmacoresistencia en bacterias Gram-negativas principalmente en las enterobacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* (Garza-González et al., 2019; Miranda-Estrada et al., 2017; Miranda-Navales et al., 2020; Molina-López et al., 2011; Paniagua-Contreras et al., 2017; Sierra-Díaz et al., 2019).

Se ha reportado que en *E. coli* hay una mayor resistencia a la ampicilina (mayor a 80%), las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (mayor al 50%) junto con el fármaco trimetoprim-sulfametoxazol (60%) (Garza-González et al., 2019; Miranda-Estrada et al., 2017; M. G. Miranda-Navales et al., 2020; Molina-López et al., 2011; Paniagua-Contreras et al., 2017; Sierra-Díaz et al., 2019). En cepas aisladas de infecciones urinarias, las mayores tasas de resistencia fueron hacia el ciprofloxacino, la ampicilina/sulbactam y trimetoprima/sulfametoxazol (mayor al 50%) (Miranda-Navales et al., 2022). En *K. pneumoniae* se observan perfiles de resistencia mayores al 50% hacia la ampicilina, ampicilina-sulbactam, las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y al aztreonam. También presenta resistencia (12.5%) al carbapenem (Garza-González et al., 2019; Miranda-Navales et al., 2020). La susceptibilidad hacia penicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y eritromicina de *Streptococcus pneumoniae* ha disminuido del año 2014-2017 (Torumkuney et al., 2022).

En *P. aeruginosa* se reportó una mayor resistencia a los carbapenémicos (33%-72%), a las fluoroquinolonas (mayor al 80%), piperacilina-tazobactam (19.1%), amikacina (mayor a 22%), a las cefalosporinas de 3ª generación (mayor al 68%) (Garza-González et al., 2019; PUCRA, 2019; Sierra-Díaz et al., 2019). Además, se ha reportado que esta bacteria presenta resistencia a 4 de 6 antibióticos de primera línea (Tabla 3) (Miranda-Navales et al., 2020). Las cepas de *P. aeruginosa* que se han encontrado en muestras de orina el 22% son multi-fármaco resistentes (MFR) (Chavolla-Canal, Gonzalez-Mercado, & Ruiz-Larios, 2016) y también son las que muestran un mayor perfil de resistencia a los antibióticos (Sierra-Díaz et al., 2019).

Tabla 3. Perfil de resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*. Datos tomados de (Miranda Noveles et al., 2019).

Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N=586		
	Número de cepas resistentes	Porcentaje medio	Valores máximos y mínimos %
Ampicilina-sulbactam		NA	
Cefepima	167	22	1-77
Ceftazidima	193	24	1-48
Meropenem	210	30	3-100
Piperacilina-tazobactam	176	22	2-63
Amikacina	146	15	0-82
Ciprofloxacino	158	18	1-82

Como se había mencionado anteriormente *P. aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más comunes en hospitales que puede causar una gran variedad de infecciones agudas y crónicas con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Además, sus altas tasas de resistencia a antibióticos la posicionan como una bacteria prioritaria para buscar nuevos tratamientos (Tacconelli et al., 2018).

1.8. *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa fue descrita en 1872 por Schroeter con el nombre de *Bacillum aeruginosum*, posteriormente Migula en 1900 la reasigna a su actual nombre. El vocablo aeruginosa hace referencia al color azul verdoso que presentan sus colonias (Peix at al., 2018). Su clasificación taxonómica se encuentra en la figura 7.

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *γ-proteobacteria*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Pseudomonadaceae*

Género: *Pseudomonas*

Especie: *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 7. Clasificación taxonómica e imagen de *P. aeruginosa*. Imagen de (CDC, 2019).

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa no fermentativa, productora de amonio, lactasa e indol negativa, catalasa y oxidasa positiva, mesófila (entre 4 y 42°C) y principalmente aeróbica, aunque es posible su crecimiento en condiciones anaeróbicas (Tümmler et al., 2014). Tiene forma de bacilo que mide 0.5-0.8 µm de diámetro y 1.5-3.0 µm de largo con un flagelo que le da movilidad y le permite colonizar diferentes superficies. Las colonias formadas por esta bacteria son mucosas con bordes irregulares de 1 a 3 mm de diámetro (Palleroni, 2015).

P. aeruginosa tiene una gran capacidad y versatilidad metabólica por lo tanto es posible encontrarla en ambientes terrestres o acuáticos, superficies de animales e incluso en superficies inertes como dispositivos médicos (Voor in 't Holt, Severin, Lesaffre, & Vos, 2014). Además de ser patógeno oportunista de organismos variados tales como insectos, peces, nemátodos, plantas y mamíferos, incluyendo al hombre (Klockgether & Tümmler, 2017). En ambientes hospitalarios es un agente causal de infecciones nosocomiales principalmente en las unidades de cuidado intensivo (Tümmler et al., 2014).

El genoma completo de esta bacteria fue publicado en el año 2000 (Stover et al., 2000). La cepa de referencia PAO1 posee un genoma de 6.3 Mpb (mega pares de bases) con 5,688 genes anotados, 63 tRNA, 12 rRNA y 43 ncRNA (Figura 8). Se calcula que tiene una proporción más alta de genes involucrados en la regulación (8.4%) en comparación a otros genomas, igualmente, tiene una mayor proporción de sistemas de dos componentes probables con 55 sensores, 89 reguladores y 14 híbridos, lo que le permite adaptarse a los cambios en el entorno (Stover et al., 2000).

La gran cantidad de reguladores y sistemas de dos componentes, le dan a *P. aeruginosa* una gran resistencia y versatilidad metabólica que le permiten sobrevivir y adaptarse como patógeno. Esta bacteria puede formar biopelículas y producir una gran cantidad de compuestos conocidos como factores de virulencia.

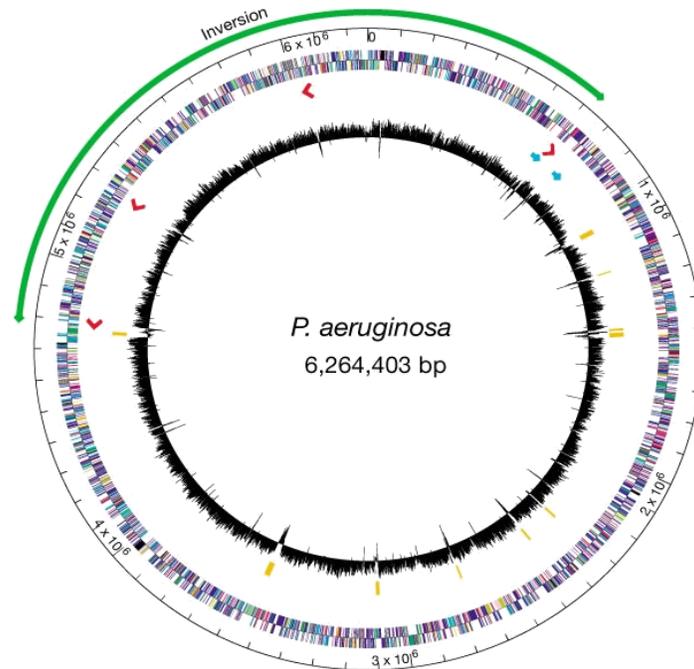


Figura 8. Representación circular del genoma de *P. aeruginosa*. El círculo externo indica la localización cromosomal en pares de bases. Fuente (Stover et al., 2000).

1.9. Factores de virulencia.

Los factores de virulencia son proteínas o compuestos que matan a las células del hospedero para poder establecer una infección y proporcionan varios métodos para la evasión del sistema inmune (Balasubramanian et al., 2013). Algunos de ellos son los siguientes.

1.9.1. Lipopolisacáridos.

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Está formado principalmente de dos partes: el lípido A y un núcleo de oligosacáridos, en algunos puede estar presente una región llamada antígeno O (Figura 9). El LPS juega un papel importante en la adhesión a las células del hospedero y el lípido A estimula la respuesta inflamatoria del sistema inmune generando un choque séptico que puede ser mortal (Khalifa et al., 2011).

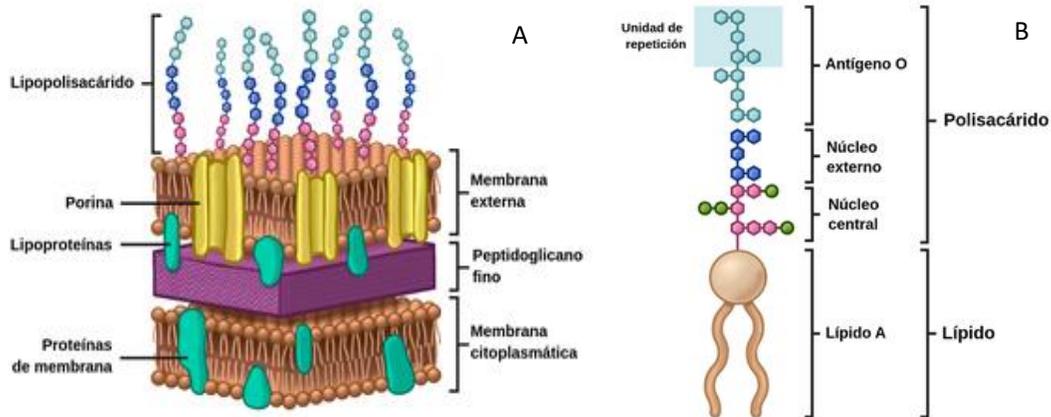


Figura 9. Estructura de la pared celular de bacterias Gram-negativas y del LPS. En el panel A se observa la estructura compleja de la pared celular de una bacteria Gram-negativa compuesta por dos membranas y una capa delgada de peptidoglucano, así como los LPS presentes en la membrana externa. En el panel B se esquematiza la estructura del LPS formada por un lípido y un polisacárido. Fuente: pagina web (LabsterTheory, s/f).

1.9.2. Alginato.

El alginato es un polisacárido de carga negativa formado por el ácido B-D manurónico y el ácido L-gulurónico (Figura 10) (Fata et al., 2015). Este polisacárido protege a la bacteria de la acción de macrófagos y citocinas, promueve la inflamación crónica y es uno de los principales constituyentes de las biopelículas (Leid et al., 2005). Los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis del alginato están agrupados en un operón (Fata et al., 2015)

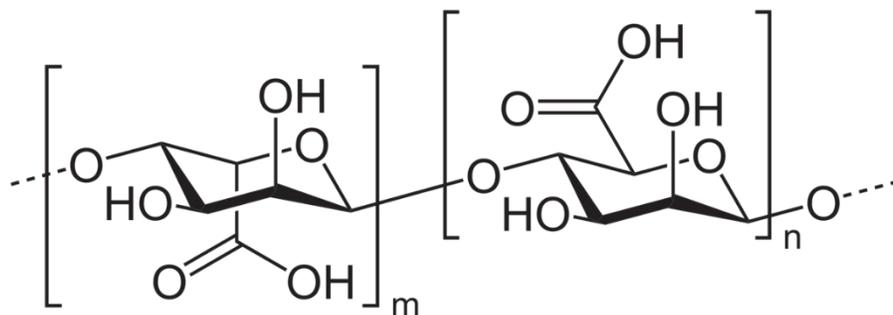


Figura 10. Estructura del alginato. Fuente (McMurry, 2004).

1.9.3. Elastasa (LasB).

La elastasa B es una metaloproteasa codificada por el gen *lasB* y tiene un peso molecular de 33 KDa. Sin embargo, la actividad de elastasa resulta de la cooperación de LasB con LasA, otra proteasa que corta la elastina debilitando su estructura y favoreciendo la acción de LasB.

Esta enzima puede romper las fibras de elastina de alveolos y tejido vascular así como el colageno tipo III y IV, la colectina, la fibronectina, la laminina y la fibrina (Cigana et al., 2021; Khalifa et al., 2011). Además, es capaz de interferir con la respuesta inmune ya que degrada algunas moléculas como las inmunoglobulinas (IgG), el interferón gama (IFN- γ), las interleucinas 2 y 8 (IL-2 e IL-8), el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (Khalifa et al., 2011).

La elastasa (LasB) puede romper la trombina humana generando pequeños péptidos que se unen a los LPS y evitan la respuesta pro-inflamatoria (Van Der Plas et al., 2016). Otros estudios demuestran que LasB junto a la proteasa alcalina evitan que la flagelina sea reconocida por el sistema inmune (Casilag et al., 2015). Al mismo tiempo esta enzima está involucrada en la formación de biopelícula (Galdino et al., 2019).

1.9.4. Proteasa alcalina.

La proteasa alcalina es una metaloproteasa de zinc codificada por el gen *aprA* sintetizada en la fase estacionaria temprana (Lazdunski et al., 1990). La proteína pesa 50 KDa y es secretada a través del sistema de secreción tipo I (Galdino et al., 2019).

Esta enzima puede romper proteínas componentes de la lámina basal y el endotelio como la fibronectina y la laminina. También es importante en la evasión del sistema inmune porque degrada proteínas del complemento y algunas citocinas como la IL-6, el IFN- γ y el TNF- α ; bloquea la quimiotaxis y la fagocitosis de neutrófilos. Además, evita la detección del sistema inmune inhibiendo el reconocimiento de la flagelina

por el receptor TLR5 y permite que *P. aeruginosa* crezca en ambientes con limitación de hierro debido a que rompe la transferrina y libera hierro en el microambiente (Galdino et al., 2019).

1.9.5. Pioverdina.

P. aeruginosa produce varios pigmentos, los más conocidos y estudiados son la pioverdina y la piocinanina. La pioverdina es un sideróforo fluorescente que es producido en ambientes con baja concentración de hierro para favorecer la acumulación, la movilización y el transporte de este metal hacia el interior de la bacteria (Figura 11) (Dell'Anno et al., 2022; Ringel & Brüser, 2018). La pioverdina está formada de tres partes: un péptido específico, un cromóforo conservado 2, 3-diamino-6, 7-hidroxiquinolina y una cadena acilada lateral unida al cromóforo que puede ser malato, succinato (Ringel & Brüser, 2018).

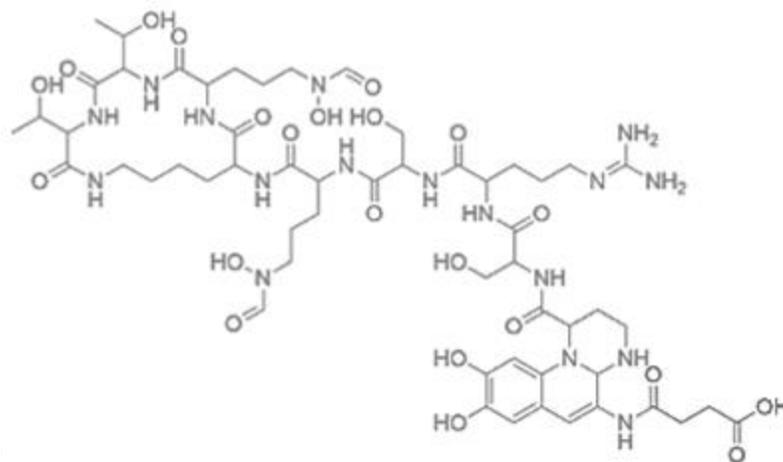


Figura 11. Estructura de la pioverdina. Fuente (Dell'Anno et al., 2022).

La síntesis de pioverdina se lleva a cabo en una estructura llamada siderosoma donde las sintetetas de péptidos no ribosomales (SPNR) PvdL, PvdI y PvdD se acoplan con las enzimas PvdH, PvdA y PvdF, MbtH, PvdG. La apioverdina acilada es transportada hacia el periplasma por pvdE (un sistema de transporte tipo ABC). En el periplasma la apioverdina es desacetilada por PvdQ y modificada por PvdP y PvdO y PtaA. Las pioverdinas son secretadas por transportadores PvdRT-OmpQ (Ringel & Brüser, 2018).

Además de jugar un papel importante como sideróforo, la producción de pioverdina está relacionada con la formación de biopelícula. En pacientes con fibrosis quística se observó que las pioverdinas pueden inhibir el crecimiento del hongo *Aspergillus fumigatus*, lo cual le da una ventaja competitiva (Dell'Anno et al., 2022).

La pioverdina está relacionada con la resistencia a antibióticos y favorece la producción de la exotoxina A y la proteasa PrpL. Además, debido a su capacidad para captar hierro puede provocar daño a la mitocondria comprometiendo su función (Dell'Anno et al., 2022).

1.9.6. Piocianina.

La piocianina es un pigmento de la clase fenazinas (Figura 12) que es producido y secretado por *P. aeruginosa* a través del sistema de secreción tipo II y su presencia en heridas, esputo, orina y secreciones de pacientes infectados nos podría evidenciar su papel en la patología de las infecciones por esta bacteria (Hall et al., 2016). Está compuesta por 2 subunidades de N-metil-1-hidroxifeazina y las enzimas involucradas en su síntesis se codifican en el operón *phz*.

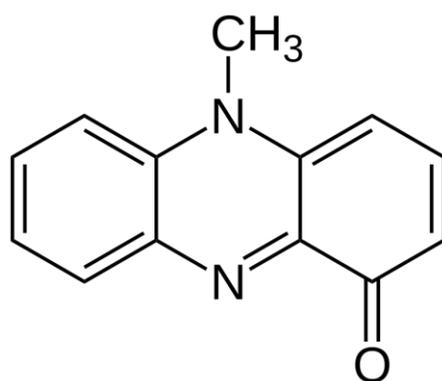


Figura 12. Estructura de la piocianina. Basada en (Nadal Jimenez et al., 2012).

La síntesis de fenazinas comparte la ruta con el ácido shikímico. Las enzimas de la ruta metabólica son PhzC, D, E, F, G, M y S (Jayaseelan et al., 2014). PhzM transfiere un grupo metilo a la fenazina-1-ácido carboxílico, posteriormente PhzS descarboxila la molécula 5-metilfenazina-1-ácido carboxílico convirtiéndola en piocianina (Jayaseelan et al., 2014).

La piocianina induce estrés oxidativo debido a que es capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) como superóxido y peróxido de hidrogeno. Estas ERO causan daño oxidativo dentro de la célula e incluso pueden dañar al DNA (Reszka et al., 2004). Además, contribuye a la formación de biopelícula debido a la lisis celular que provoca el estrés oxidativo y la liberación de DNA extracelular (Das & Manefield, 2012).

También se ha demostrado que la piocianina reduce la respuesta inmune ya que inhibe a la IL-2 y disminuye la producción de inmunoglobulinas, linfocitos y neutrófilos. Por otro lado, aumenta los niveles de interleucina 8 (IL-8), IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) a través de la activación por LPS (Hall et al., 2016).

1.9.7. Acido cianhídrico (HCN).

El HCN o cianuro inhibe el complejo IV de la cadena respiratoria por lo que puede ser un veneno letal para los humanos. Sin embargo, *P. aeruginosa* es resistente a este veneno debido a la enzima rondanasa, la cual es capaz de convertir el cianuro a tiocianato (Broderick et al., 2008).

El HCN se ha encontrado en esputos de pacientes con fibrosis quística infectados con *P. aeruginosa*. La presencia del ácido cianhídrico se correlacionó con una función deficiente de los pulmones de los pacientes (Ryall et al., 2008). Además, recientemente se ha demostrado que el HCN le da ventaja a *P. aeruginosa* en un ambiente polimicrobiano, ya que puede controlar a la población de *S. aureus* en el contexto de infección (Sylvie et al., 2022).

En *P. aeruginosa* la enzima involucrada en la producción del HCN es codificada en los genes *hcnABC*. La HCN sintasa descarboxila la glicina produciendo HCN, cuatro electrones y cuatro hidrógenos (Lenney & Gilchrist, 2011).

1.9.8. Ramnolípidos (RL).

Los ramnolípidos son moléculas anfifílicas que están formadas por una cadena lipídica y un azúcar en el otro extremo. Son moléculas surfactantes que solubilizan

las moléculas hidrófobas, por lo tanto, le permite utilizar alcanos como fuentes de carbono (Soberón-Chávez et al., 2005).

P. aeruginosa produce dos formas de ramolípidos, los mono-ramnolípidos y los di-ramnolípidos (Figura 13). Los RL están formados por un dímero de ácido graso unido a un residuo mono o di-ramnosa por medio de un enlace B-glucosídico (Soberón-Chávez et al., 2005). La biosíntesis de RL es catalizada principalmente por dos enzimas Rt1 y Rt2 que de manera secuencial transfieren grupos ramnosil al β-hidroxidecanoil-β-hidroxidecanoato o al mono-ramnolípidido. Rt1 es una enzima transmembranal compuesta por dos polipéptidos, RhIA está en la membrana interna y RhIB es la unidad catalítica que se encuentra en el periplasma. Rt2 es codificada por el gen *rhIC* (Maier & Soberón-Chávez, 2000).

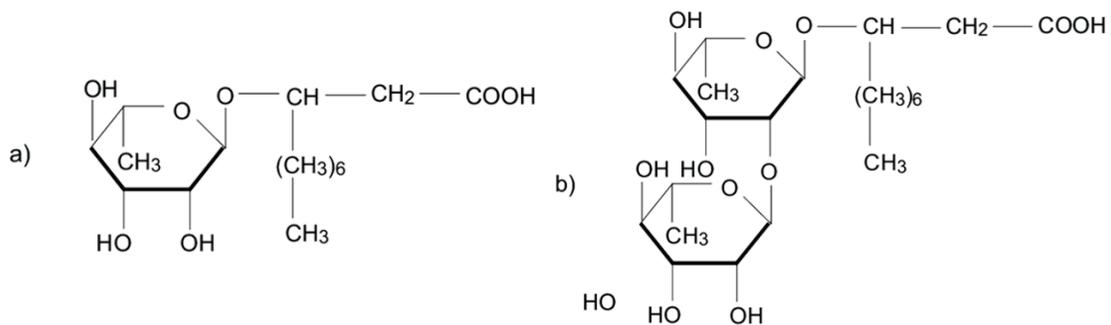


Figura 13. Estructura química de los ramnolípidos. En *P. aeruginosa* se producen dos tipos: a) mono-ramnolípidos y b) di-ramnolípidos. Fuente (Jiménez-Islas et al., 2010).

Los ramnolípidos actúan como hemolisinas y pueden interferir con la barrera epitelial para que *P. aeruginosa* se instale e invada en tejido pulmonar. Además, pueden alterar el transporte mucociliar, los movimientos del epitelio respiratorio e inhibir la fagocitosis (Khalifa et al., 2011). Los ramnolípidos están involucrados en el movimiento tipo swarming, la formación y la separación de la biopelícula (Boles et al., 2005; Caiazza et al., 2005).

1.10. Biopelícula en *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* se pueden encontrar dos estilos de vida: células planctónicas que crecen de manera individual y encontradas en medios líquidos, sin embargo, en el

crecimiento en superficies las células se agrupan dentro de una matriz de exopolisacáridos conocida como biopelícula (Filloux & Vallet, 2003; Tuon et al., 2022).

La biopelícula mantiene a la comunidad bacteriana unida protegiéndola de los agentes externos, por lo que, esta estructura le confiere una ventaja adaptativa (Ellen & O'Toole, 2000). La matriz de la biopelícula está compuesta por proteínas, lípidos, exopolisacáridos (alginato), ADN extracelular, ARN y agua (Wei & Ma, 2013). Las biopelículas pueden desarrollarse en superficies bióticas y abióticas (equipo médico) durante cinco etapas (Figura 14) (Moreau-Marquis et al., 2010).

- 1) Adhesión reversible a una superficie. Las bacterias planctónicas se adhieren a una superficie mediante flagelos o pilli tipo IV. El movimiento restringido del flagelo modula la biosíntesis de exopolisacáridos (Hickman y Harwood, 2008). Se ha reportado que las respuestas y la formación de biopelícula son específicas del material a adherirse (Guilbaud et al., 2017).
- 2) Cambio al estado de fijación irreversible. Las bacterias se agregan y se encapsulan en una matriz de exopolisacáridos.
- 3) Formación de microcolonias. Propagación de las bacterias en microcolonias.
- 4) Maduración. Las microcolonias se desarrollan en estructuras en tercera dimensión parecidas a hongos.
- 5) Liberación de bacterias planctónicas. En el centro de las microcolonias se abre una cavidad para la liberación de bacterias que pueden colonizar otros espacios (Ma et al., 2009).

Las bacterias dentro de la biopelícula son fenotípicamente diferentes a las planctónicas, algunas de estas diferencias son cambios en motilidad, en la producción de exopolisacáridos y son de 10-1000 veces más resistentes a los antibióticos (Spoering & Lewis, 2001). Incluso se ha observado que las bacterias dentro de la biopelícula son heterogéneas, es decir, muestran expresión diferencial de fenotipos y actividad metabólica de acuerdo con los gradientes de oxígeno, nutrientes y pH que se generan dentro de la biopelícula (Stewart & Franklin, 2008).

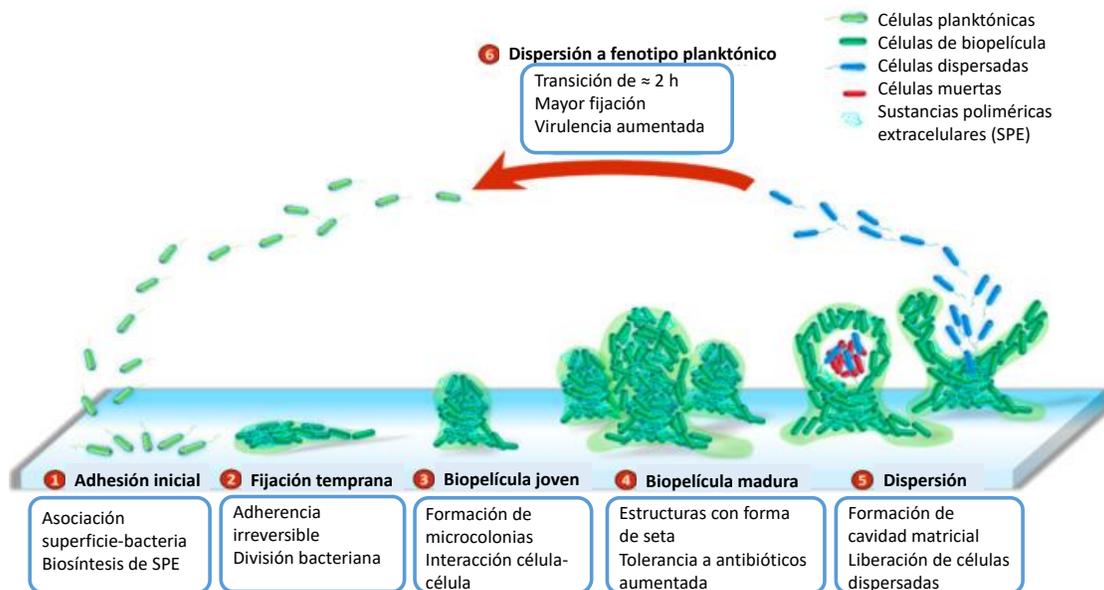


Figura 14. Etapas de la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa*. En la imagen se observa como las bacterias planctónicas se adhieren a una superficie y empiezan a sintetizar polisacáridos para mantenerse unidas. Posteriormente comienzan a crecer formando pequeñas colonias hasta que maduran en estructuras en forma de seta. De esa biopelícula se liberan bacterias planctónicas y se dispersan. Fuente (Thi et al., 2020).

1.11. Movimiento tipo enjambre (swarming).

El movimiento tipo enjambre es una adaptación para la translocación de superficies (Figura 15). Es un movimiento rápido, comunitario y coordinado a través de una superficie sólida o semisólida que depende de la densidad bacteriana, la cantidad de nutrientes, la humedad y viscosidad de la superficie (Coleman et al., 2020; Overhage et al., 2008).

Las bacterias dentro del enjambre sufren cambios físicos como la elongación celular y el aumento de la cantidad de flagelos. Además, se observan cambios metabólicos y de expresión genética como la sobreexpresión de genes del sistema de secreción tipo III y factores de virulencia como proteasas, pirocianina y sideróforos. Las bacterias dentro del enjambre son más resistentes a antibióticos (Overhage et al., 2008).

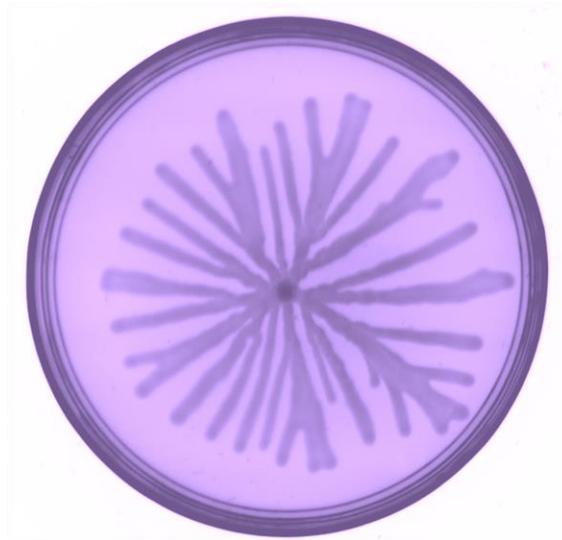


Figura 15. Movimiento tipo swarming en *P. aeruginosa*. La imagen muestra la zona de expansión dejada por *P. aeruginosa* después de 18 h de cultivo. Imagen propia

Este movimiento se caracteriza por una colonia en forma de dendrita, para realizarlo se necesitan una célula elongada, una gran cantidad de flagelos y la producción de ramnolípidos. Se ha encontrado una relación inversa entre el swarming y la formación de biopelícula, lo que muestra las diferentes adaptaciones entre una infección aguda y el establecimiento de una crónica (Coleman et al., 2020)

1.12. Sistema de secreción tipo III (SST3).

Entre todos los mecanismos de virulencia para establecer infección, los sistemas de secreción y transporte de proteínas efectoras son importantes. En *P. aeruginosa* se han reportado varios de estos sistemas y uno de los más importantes es el sistema de secreción tipo III (SST3) (Horna & Ruiz, 2021) (Figura 16).

El SST3 es importante para la colonización, la sobrevivencia y la replicación de la bacteria en el hospedero. Su principal función es inyectar las proteínas efectoras en el hospedero que son importantes en la patogénesis interfiriendo el sistema inmune, alterando el citoesqueleto y vías de transducción (Horna & Ruiz, 2021). La presencia del SST3 en infecciones se ha relacionado con una mayor persistencia de la carga bacteriana y recaídas que incrementan las tasas de mortalidad en los pacientes.

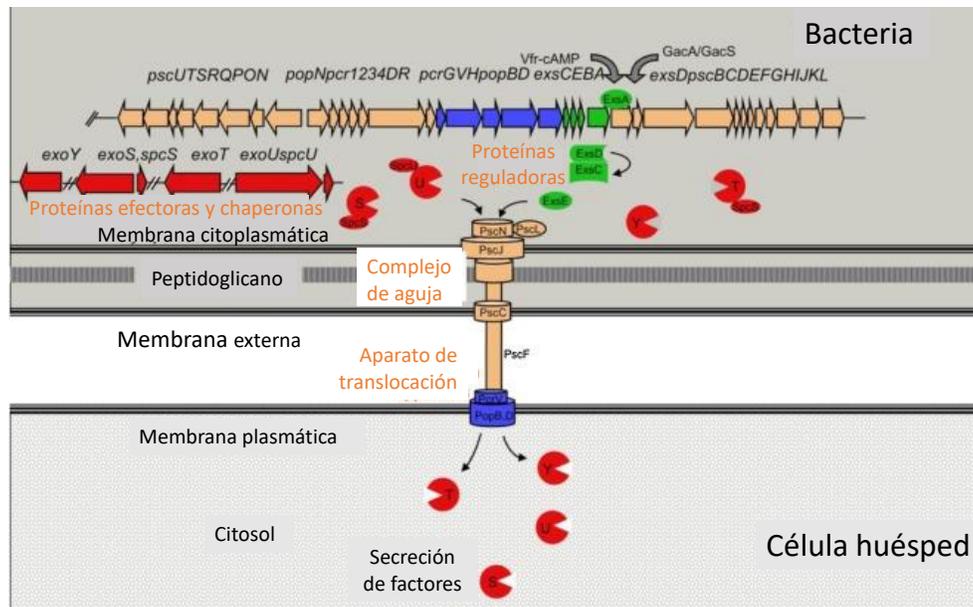


Figura 16. Estructura del SST3 de *P. aeruginosa*. En la parte de arriba se muestran los genes necesarios para la expresión de la jeringa (SST3) y los efectores. La jeringa está formada por una aguja y un aparato de translocación, el que se une a la membrana de la célula huésped para secretar los efectores dentro de la célula. Fuente (Horna & Ruiz, 2021).

El SST3 es una estructura en forma de jeringa compuesta por cinco partes: aguja, aparato de translocación, sistema de regulación, chaperonas y efectores. En su expresión están involucrados 36 genes estructurales y regulatorios agrupados en 5 operones mientras que los genes efectores y chaperonas están dispersos en el genoma. Se ha sugerido que la función original de este sistema era la defensa contra los depredadores (Hauser, 2009).

La aguja es una estructura que empieza en el citoplasma de la bacteria y alcanza las células hospederas vecinas, su función es transportar las proteínas del citosol al ambiente extracelular atravesando las membranas y el peptidoglicano (Hauser, 2009).

El aparato de translocación es un poro responsable de la inyección de efectores en las células hospederas. La presencia de poros en la membrana de las células hospederas puede causar la muerte de la célula debido a que incrementa la permeabilidad generando choque osmótico (Dacheux et al., 2001)

El sistema de regulación es un complejo de 25 genes involucrados en los procesos regulatorios del SST3. La transcripción de los componentes induce la activación de la secreción asegurando que los componentes estén disponibles cuando sean necesarios. El principio de la secreción está poco estudiado, pero se sabe que la señal es el contacto con las células del hospedero (Hauser, 2009).

Las chaperonas son proteínas pequeñas que interactúan con los efectores y algunos otros componentes del SST3 evitando las interacciones inespecíficas o prematuras y aseguran el desdoblamiento de los efectores indispensable para la secreción. Se clasifican en 3 clases: las de clase I interactúan con los efectores, las de clase II interactúan con el aparato translocador y las de clase III interactúan con proteínas estructurales exportadoras (Galle et al., 2013; Hauser, 2009)

En *P. aeruginosa* se conocen 4 efectores principales: ExoS, ExoT, ExoU y ExoY, sin embargo, recientemente se han reportado dos nuevos efectores PemA y PemB. Los efectores ExoT y ExoY son los que se encuentran con mayor frecuencia (90-100%), mientras que ExoS es encontrado en el 52-78% y ExoU en el 25-52% de los aislados de infecciones agudas (Horna & Ruiz, 2021; Hauser, 2009). La presencia de efectores no es uniforme, pero se ha encontrado que ExoS y ExoU son mutuamente exclusivas, por lo que su presencia puede relacionarse a dos fenotipos diferentes: invasivo y citotóxico, respectivamente (Horna & Ruiz, 2021).

ExoS es una proteína con dos funciones: la región N-terminal es una región activadora de GTPasa y la región C-terminal tiene actividad de ADP ribosil transferasa (ADPRT). La presencia de la región N-terminal causa apoptosis (Kaminski et al., 2018). La activación de GTPasas genera rompimiento del citoesqueleto de actina, mientras que la actividad de ADPRT inhibe la síntesis de ADN y tráfico vesicular generando apoptosis (Hauser, 2009). Además, este efector interfiere la fagocitosis, permitiendo que la bacteria sobreviva dentro del hospedero (Rangel et al., 2014)

ExoT comparte un grado de identidad en aminoácidos del 76% con ExoS. Debido a su alto nivel de identidad, tiene propiedades similares y, por lo tanto, los mismos

mecanismos de acción, sin embargo, su capacidad de inducir muerte celular es más lenta que la de ExoS. Se ha reportado que ExoT provoca la fosforilación de p38 β y las cinasas Jun N-terminal (JNK), las cuales desestabilizan los sitios de adhesión focal (Barbieri & Sun, 2005).

ExoU es una fosfolipasa que puede interactuar con varios sustratos y tiene una gran actividad citotóxica que resulta en un rápido efecto necrótico. Para activarse este efector requiere de la presencia de ubiquitinas y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Tyson & Hauser, 2013). Se ha encontrado que la prevalencia de este efector es mayor en las cepas aisladas de quemaduras o unidades de cuidados intensivos (UCI) o en casos de otitis media (Bradbury et al., 2010; Park et al., 2017) y en México se reportó que se encuentra en el 90% de los aislados clínicos (Morales-Espinosa et al., 2017). Las cepas con este efector (ExoU⁺) suelen ser más resistentes a antibióticos.

ExoY es una nucleotidil ciclasa que promueve el incremento de cAMP, cGMP y cUMP, lo que genera el rompimiento de los microtúbulos (Morrow et al., 2017). Este efector necesita la f-actina para estimular su actividad que puede ser diferente dependiendo de la línea celular (Morrow et al., 2015). ExoY juega un papel directo en la evasión del sistema inmune ya que suprime la activación de la cinasa 1 activada por TGF-B (He et al., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente las bacterias realizan procesos necesarios para su sobrevivencia o adaptación tales como: formación de biopelículas, producción y secreción de diversos compuestos, esporulación, entre otros. Muchos de estos procesos son resultado de un comportamiento social, el cual está regulado por un sistema conocido como percepción de quorum (Ng & Bassler, 2009).

1.13. Sistema de percepción de quorum (SPQ).

El sistema de percepción de quorum (SPQ) o también conocido como “quorum sensing” es una vía a través de la cual las bacterias se comunican y regulan su expresión genética en respuesta a la composición de su comunidad y la densidad poblacional (Ng & Bassler, 2009). Es una respuesta adaptativa que permite

responder ante nuevos ambientes y por lo tanto es importante en la sobrevivencia y patogénesis en un nicho ecológico concreto (Smith & Iglewski, 2003).

En bacterias Gram-negativas los autoinductores son moléculas que pueden atravesar libremente la membrana y la respuesta se da por un regulador ubicado en el citoplasma. En bacterias Gram-positivas los autoinductores son oligopéptidos que necesitan un transportador para ser excretados al medio. La respuesta se produce por un sistema de dos componentes donde hay un receptor externo tipo cinasa y factores de transcripción citoplásmicos que modifican la expresión genética (Figura 17) (Ng & Bassler, 2009).

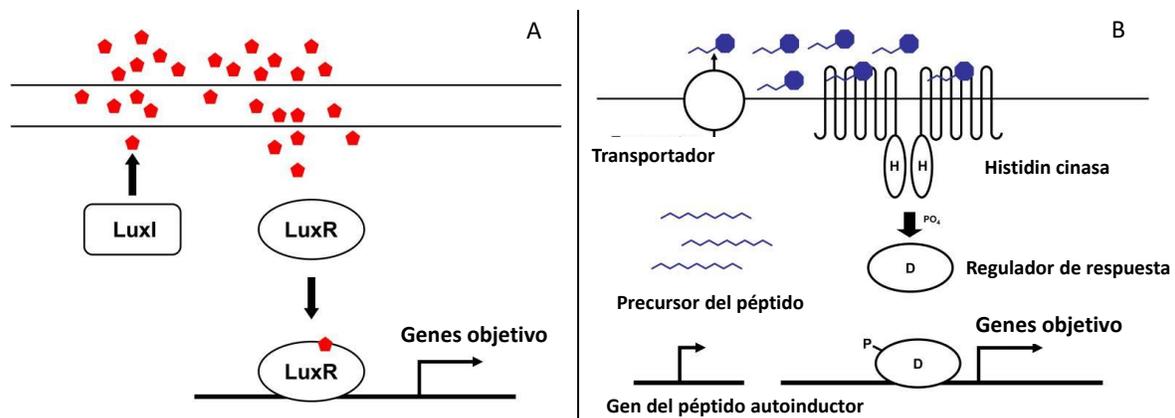


Figura 17. Modelo de los SPQ de bacterias. En la mayoría de las bacterias Gram-negativas (A) el autoinductor (rojo) es secretado al exterior de la bacteria, después por transporte pasivo o activo entra al citoplasma para unirse al receptor (LuxR) que cambia de conformación y regula la transcripción. Sin embargo, en la mayoría de bacterias Gram-positivas (B) el autoinductor (péptido) es secretado al exterior por un transportador y reconocido por un sistema de dos componentes que activan al regulador transcripcional y modifican la expresión de genes. Fuente (Ng & Bassler, 2009).

El SPQ se descubrió en *Allivibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, dos bacterias marinas que producen bioluminiscencia (Hastings & Nealson, 1977; Nealson & Hastings, 1979). Se observó que en altas concentraciones las bacterias producen luz debido a la acción de la luciferasa, una enzima que es producida debido a la acumulación de una molécula autoinductora (Nealson & Hastings, 1979). A este fenómeno se le asignó el nombre de sistema de percepción de quorum (SPQ) o “quorum sensing” tipo lux (Fuqua et al., 1994).

El SPQ tipo *lux* está formado por 3 componentes: un autoinductor, una proteína que sintetiza el autoinductor (LuxI) y una proteína que se une al autoinductor e inicia la transcripción (LuxR) (Papenfort & Bassler, 2016). En bacterias Gram-negativas se han encontrado homólogos al sistema *lux* y generalmente funcionan de la misma manera:

- 1) Un autoinductor, una molécula de bajo peso molecular que es sintetizada de manera basal por LuxI y secretada al exterior por medio de transporte activo o pasivo.
- 2) Al aumentar la densidad poblacional, la concentración de autoinductores en el ambiente incrementa llegando a un umbral necesario para su reingreso al citoplasma y reconocimiento por el receptor LuxR.
- 3) Lux R se une al autoinductor, cambia su conformación e inicia la señalización para inducir la expresión de diversos genes.
- 4) Uno de los genes inducidos es LuxI, promoviendo la síntesis de autoinductor y por lo tanto la autoregulación del sistema.

De esta manera, el SPQ promueve que las bacterias se comporten colectivamente al sincronizar la expresión genética de toda la población (Papenfort & Bassler, 2016).

Las principales moléculas usadas como autoinductores en bacterias Gram-negativas son las acil homoserin lactonas (AHL) aunque se han reportado otras como el autoinductor 2, quinolonas, entre otras. Mientras que en bacterias Gram-positivas los autoinductores son oligopéptidos (Williams, 2007) (Figura 18).

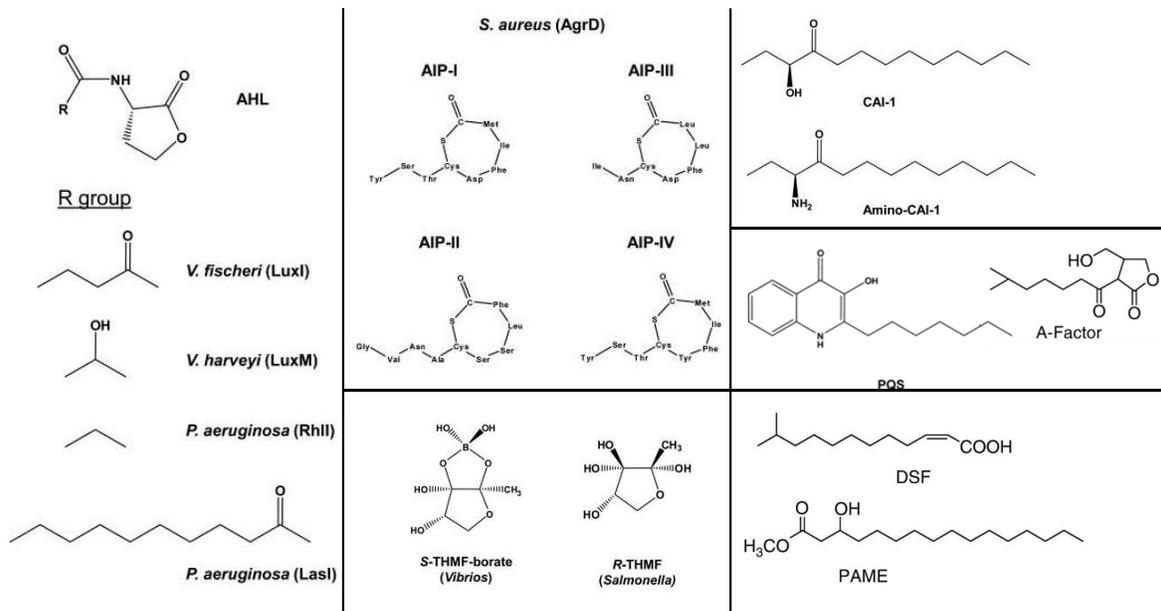


Figura 18. Las diferentes moléculas que son autoinductores de los sistemas de percepción de quorum bacteriano. Basado en (Ng & Bassler, 2009; Williams, 2007).

1.14. SPQ en *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* están presentes tres sistemas de percepción de quorum que responden a diferentes moléculas y regulan diferentes respuestas. Estos sistemas se regulan entre ellos y son LasR, RhlR y PqsR.

El sistema LasR fue nombrado así por su directa relación con la producción de elastasa (lasA y las B). Además, regula la producción de proteasa alcalina (aprA) y exotoxina A (toxA). Este sistema responde al autoinductor N-3-oxo-dodecanoil homoserin lactona, la sintetasa es LasI y el receptor es LasR. Entre los genes que son inducidos se encuentran *rhlI* y *rhlR*, que son los componentes del siguiente sistema (Lee & Zhang, 2015).

El sistema RhlR se llama así porque regula principalmente la producción de ramnolipidos (rhlABR). También se ha relacionado con la producción de piocianina (phz), hemolisina y elastasa (las A y las B). La molécula autoinductora es N-butilil homoserin lactona, el receptor RhlR y la sintasa RhlI. Este sistema es muy importante en condiciones de bajo fosfato (Soto-Aceves et al., 2021).

Mediante estudios transcriptómicos de mutantes *lasI* y *rhII* se ha demostrado que algunos genes solo responden a LasR, otros son específicos de RhlR y algunos son activados por ambos sistemas. Estos genes constituyen cerca del 10% del genoma de *P. aeruginosa* (Schuster & Greenberg, 2006; Schuster et al., 2003).

El sistema PqsR es un sistema no canónico ya que su autoinductor es una quinolona (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona). La síntesis de la quinolona esta codificada en el grupo de genes *pqsABCD*, *phnAB* y *pqsH* y su receptor es PqsR, antes llamado MvfR (Lee & Zhang, 2015). PqsH es la enzima que cataliza el paso final de la biosíntesis de quinolonas, esta enzima está regulada por LasR, lo que implica que el sistema PQS es controlado por LasR (Schertzer et al., 2010). Este sistema regula la expresión de pirocianina, lectina y ramnolípidos (Farrow et al., 2008).

Durante mucho tiempo se creyó que los sistemas responden a una jerarquía donde LasR es el sistema que se activa primero y enciende los otros sistemas (Figura 19). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que el sistema Rhl puede ser activado sin presencia de LasR en condiciones de bajo fosfato (Soto-Aceves et al., 2021).

1.15. Nuevas alternativas de tratamiento.

Como se ha mencionado anteriormente el uso excesivo de antibióticos en la salud y en otras áreas nos ha llevado a la selección de bacterias resistentes (Pérez-Gracia, 2021). Esto nos llevó a la producción de nuevos antibióticos que seleccionan nuevas cepas resistentes, por lo que, este método solo es una solución temporal.

La selección de bacterias multi fármaco resistentes nos ha planteado el problema de cómo combatir las infecciones causadas por estas bacterias. Al respecto se han tomado 3 perspectivas: producción de nuevos antibióticos o antibióticos híbridos, reutilización de moléculas existentes y estrategias anti-virulencia.

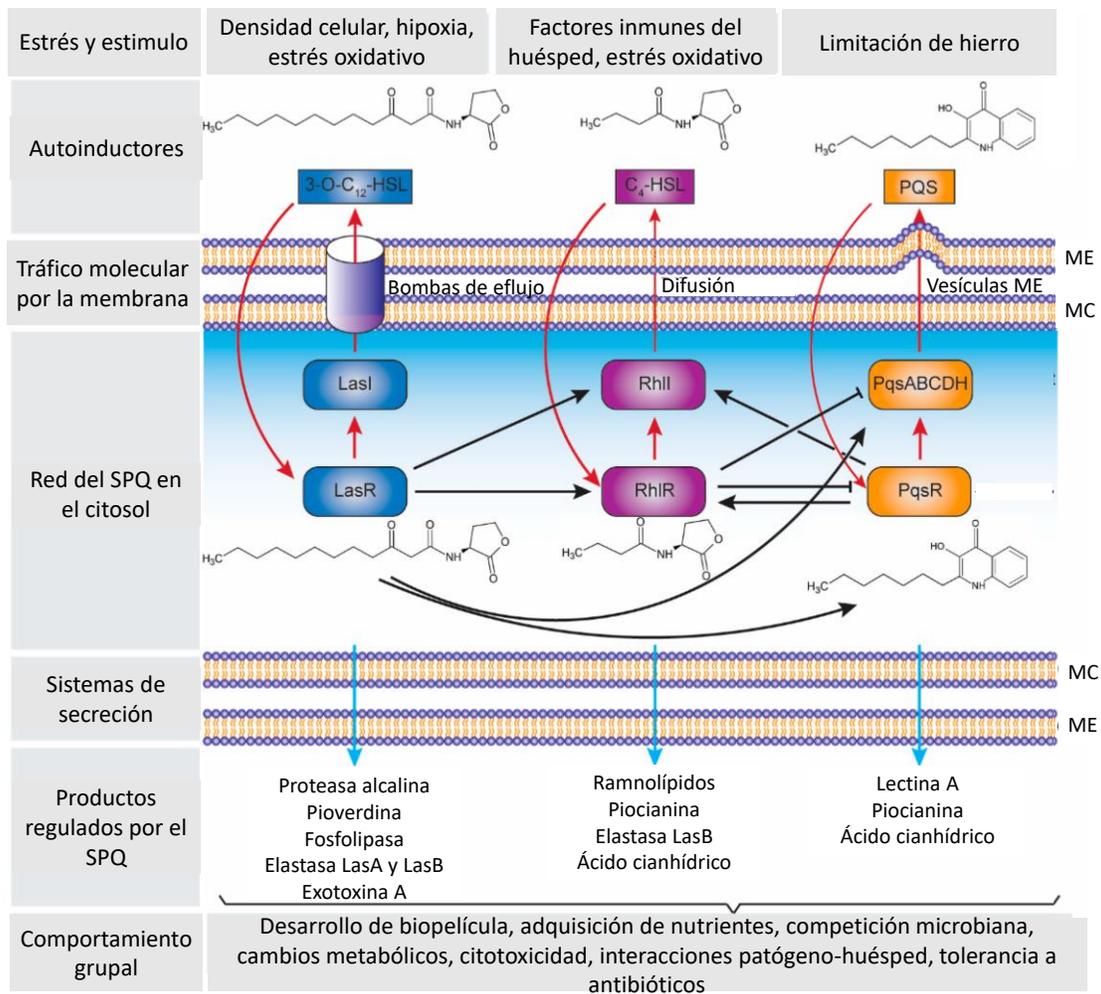


Figura 19. Los SPQ presentes en *P. aeruginosa*. En el esquema se muestran los estímulos que activan cada uno de los SPQ de esta bacteria, los autoinductores, la red de regulación entre ellos y los compuestos que son producidos como respuesta. Así como la forma en que los autoinductores atraviesan la membrana. Modificado de (Thi et al., 2020).

Se han descubierto nuevas moléculas que podrían ser usadas como antibióticos tales como: teixobactina, darobactina y cefiderocol (Imai et al., 2019; McCarthy, 2019; Zhanel et al., 2019) (Figura 20). La teixobactina se probó in vitro y después de varios pases no generó resistencia (McCarthy, 2019). El cefiderocol es una cefalosporina sideróforo. Debido al grupo catecol, la bacteria lo internaliza, una vez dentro libera el hierro en el periplasma y la cefalosporina puede llevar a cabo su acción (Zhanel et al., 2019).

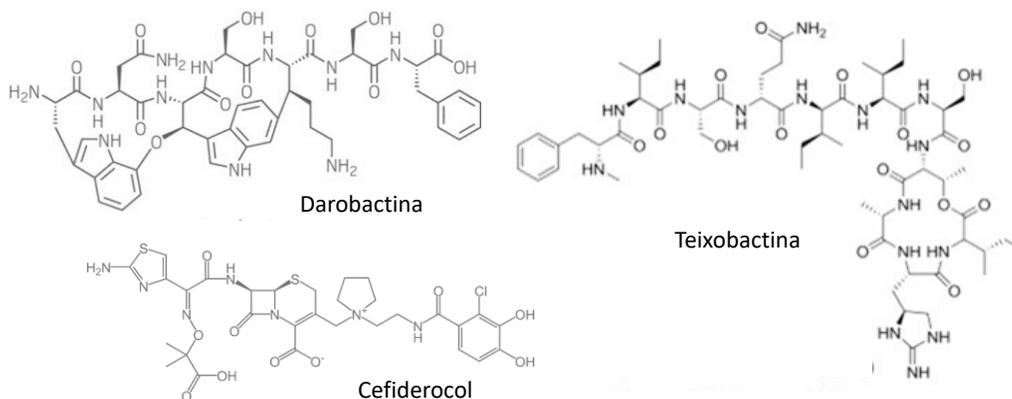


Figura 20. Estructura química de los nuevos antibióticos desarrollados. Fuentes (Katsnelson, 2019; Brown, 2017; Katsube et al., 2017).

También se han usado combinaciones de antibióticos ya conocidos con moléculas inhibitoras de β -lactamasas como: ceftazidima/avibactam, meropenem/varbobaactam, aztreonam/avibactam y ceftolozano/tazobactam. Sin embargo, no son completamente eficaces ya que no pueden inhibir las β -lactamasas de la clase B ni las carbapenemasas (Hecker et al., 2015; Liscio et al., 2015; Sader et al., 2018; Zhanel et al., 2013).

Como se observa, estas estrategias no son completamente eficientes y además podrían generar resistencia ya que ejercen una presión de selección al eliminar a la población. A diferencia de los antibióticos, las estrategias anti-virulencia no ejercen presión de selección y, por lo tanto, se esperaría que no generaran resistencia (Defoirdt, 2017). Dentro de las estrategias anti-virulencia, se encuentran los compuestos que inhiben el SPQ (Rasko & Sperandio, 2010).

1.15.1. Compuestos anti-SPQ.

Como se mencionó anteriormente el SPQ regula la producción de factores de virulencia que son necesarios para la colonización y sobrevivencia dentro del hospedero. Por lo tanto, si este sistema se inhibe las bacterias no serán capaces de establecerse eficientemente y el sistema inmune del hospedero podría combatir la infección.

El SPQ puede ser interferido por medio de 3 blancos (Fetzner, 2014):

1. La sintasa. Si inhibes la producción de autoinductores, no habrá señal y, por lo tanto, no habrá respuesta.
2. El autoinductor. Es posible degradar el autoinductor para evitar su unión al regulador y evitar la respuesta.
3. El regulador transcripcional. En presencia de autoinductores, se puede evitar la unión de éstos al regulador usando análogos y así interrumpir la respuesta.

De los tres blancos mencionados, los dos últimos son los más estudiados.

1.15.1.1. Degradación del autoinductor.

Esta estrategia es principalmente para los SPQ basados en AHL como autoinductores y se basa en degradar la AHL para evitar su unión al regulador. La AHL puede ser degradada por tres tipos de enzimas: lactonasas, acilasas y oxidorreductasas (LaSarre & Federle, 2013).

Las AHL-lactonasas son una familia de metalo-lactamasas que hidrolizan el enlace éster del anillo lactona de las AHL, liberando N-acil homoserinas, las cuales ya no son reconocidas por el receptor (Figura 21) (LaSarre & Federle, 2013). Debido a que el anillo lactona está conservado en todas las AHL, esta enzima tiene una especificidad para una gran variedad de sustratos, aunque prefiere las AHL de cadena mediana y larga (LaSarre & Federle, 2013). La primera lactonasa (AiiA) fue aislada de *Bacillus* spp (Dong et al., 2000), la expresión de este gen en bacterias patógenas disminuye la acumulación de AHL y modifica el SPQ (Momb et al., 2008). Se han reportado algunas otras lactonasas como AttM, AiiB, AhID, AhIK, AidC, AiiM (LaSarre & Federle, 2013).

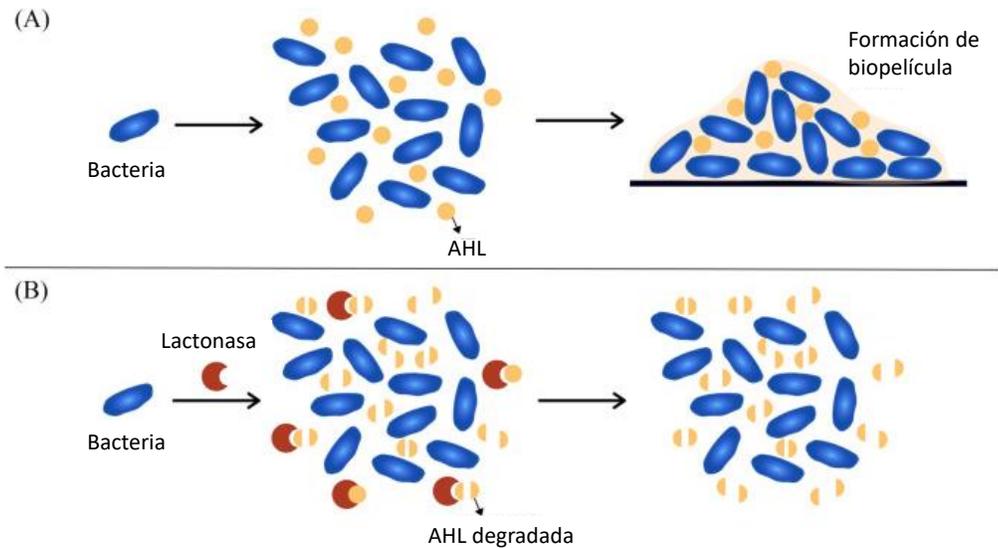


Figura 21. Ejemplo del mecanismo de acción de las lactonasas. A) La AHL es reconocida por su regulador y se produce el comportamiento comunitario. B) La lactonasa degrada la AHL por lo que no puede ser reconocida por el regulador y no hay respuesta. Fuente (Mok Tsze Chung et al., 2021).

Las AHL-acilasas hidrolizan el enlace amida entre el anillo lactona y el ácido graso, separándolos de manera irreversible. Estas enzimas tienen una especificidad basada en la longitud de la cadena de ácido graso. La primera actividad de AHL-acilasa se descubrió en *Variovorax paradoxus*. Otras acilasas son: Aiid, PvdQ, QuiP, AhIM, AiiD. (LaSarre & Federle, 2013).

Las oxidorreductasas son enzimas que oxidan o reducen los sustratos, por lo que, solo modifican el anillo lactona de la AHL (Zhang et al., 2019). El primer caso de este mecanismo fue descrito en *Rhodococcus erythropolis* (Uroz et al., 2005). Los estudios sobre estas enzimas son muy pocos.

1.15.1.2. Inhibición del regulador transcripcional.

Las AHL se unen a su receptor promoviendo su cambio de conformación y su posterior unión al ADN para iniciar la transcripción genética coordinada. En los últimos años se han probado moléculas análogas a las AHL que compiten con la señal nativa y se unen a los receptores generando complejos receptor-síñal

inactivos (Figura 22). Estas moléculas análogas pueden ser de origen natural o sintéticas (LaSarre & Federle, 2013).

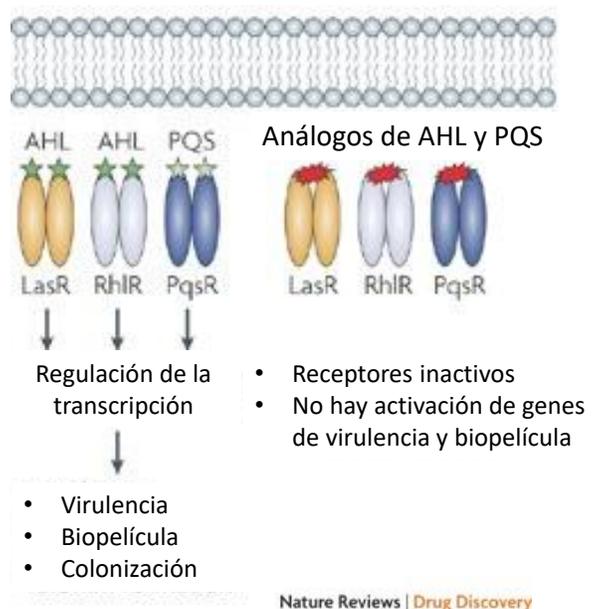


Figura 22. Inhibición del regulador transcripcional. Las moléculas análogas a las AHL se unen a los reguladores evitando la transcripción genética y la respuesta. Modificado de (Rasko & Sperandio, 2010).

1.15.1.3. Análogos de AHL de origen natural.

Los análogos de AHL se han encontrado en tres fuentes principales: plantas, hongos y algas. La patulina, el ácido penicílico y la equisetina, producidos por hongos, pueden inhibir la producción de biopelícula, movilidad y otros factores de virulencia, además de disminuir la expresión de genes reguladores del SPQ (Hemmati et al., 2020).

Las plantas son una de las mayores fuentes productoras de metabolitos con propiedades antibacterianas. Recientemente se ha demostrado que muchos compuestos extraídos de plantas, incluso algunos extractos herbales tienen actividad anti-virulencia en *P. aeruginosa* (Hemmati et al., 2020). Los compuestos son mencionados en la tabla 4.

Tabla 4. Compuestos y extractos activos contra el SPQ de *P. aeruginosa*. Los datos fueron traducidos de (Hemmati et al., 2020).

Compuesto o extracto	Factor que inhibe
Cumarina	Biopelícula y factores de virulencia
Extracto crudo de Pistacia atlantica	Biopelícula y secreción de piocianina
Curcumina	Movilidad y biopelícula
Ginseng	Producción de LasA y B y síntesis de AHL
Baicalina	Biopelícula, proteasa, elastasa, piocianina, ramnolípidos, movilidad y exotoxina A
Flavonoides	Receptores Las R y RhIR
Ajoeno	Factores de virulencia
Berberina	Biopelícula, proteasa, pioverdina, piocianina y la expresión de los genes lasI, lasR, rhII y rhIR
Trans-cinamaldehído	Proteasa, elastasa, piocianina, biopelícula y la expresión de los genes lasI, lasR, rhII y rhIR
Ácido salicílico	Proteasa, elastasa, piocianina, biopelícula y la expresión de los genes lasI, lasR, rhII y rhIR
Filirina	Piocianina, ramnolípidos, elastasa, nado, twitching y biopelícula
Trans-anetol	Swarming, proteasa, elastasa, piocianina y la expresión del gen lasB
Ácido cinámico	Piocianina, proteasa, elastasa y biopelícula
Hordenina	Swarming, piocianina, elastasa, ramnolípidos, biopelícula y la expresión de los genes lasI, lasR, rhII y rhIR
Eugenol de extracto de clavo	Biopelícula y varios factores de virulencia
Ocimum sanctum	Piocianina, proteasa, elastasa y biopelícula
Musa paradisiaca	Piocianina, proteasa, elastasa y biopelícula
Cafeína	Fenotipos de movilidad
Extracto metanólico de Phyllanthus amarus	Movilidad y piocianina
Zingerona	Biopelícula, factores de virulencia y movilidad
Combretum albiflorum	Elastasa y biopelícula
Extracto de Allium sativum	Biopelícula y elastasa
Fracción FL de Psidium guajava L	Biopelícula y factores de virulencia
Aceite de clavo	Proteasa, quitinasa, piocianina, swarming y biopelícula
Extracto metanólico de fenogreco	Proteasa, LasB, piocianina, quitinasa, swarming y biopelícula
Extracto de diclorometano de Cordiagilletii	Piocianina, biopelícula y la expresión de los genes lasI, lasR, rhII y rhIR
Manilkara zapota	Piocianina, proteasa, elastasa y biopelícula
Diarilheptanoides de las cortezas de Alnus viridis y Alnus glutinosa	Piocianina, twitching y biopelícula
Gingerol	Exoproteasa, ramnolípidos, piocianina y biopelícula
Diterpeno fitol	Piocianina, twitching y biopelícula

Se ha reportado que las algas marinas tienen diversas estrategias para evitar la acumulación bacteriana. El alga *Delisea pulchra* produce furanonas halogenadas, principalmente bromadas (Figura 23), que pueden imitar a las AHL y evitar la respuesta. Las furanonas disminuyen la secreción de proteasas, la producción de pioverdina y la formación de biopelícula (De Nys et al., 1995; de Nys et al., 1993).

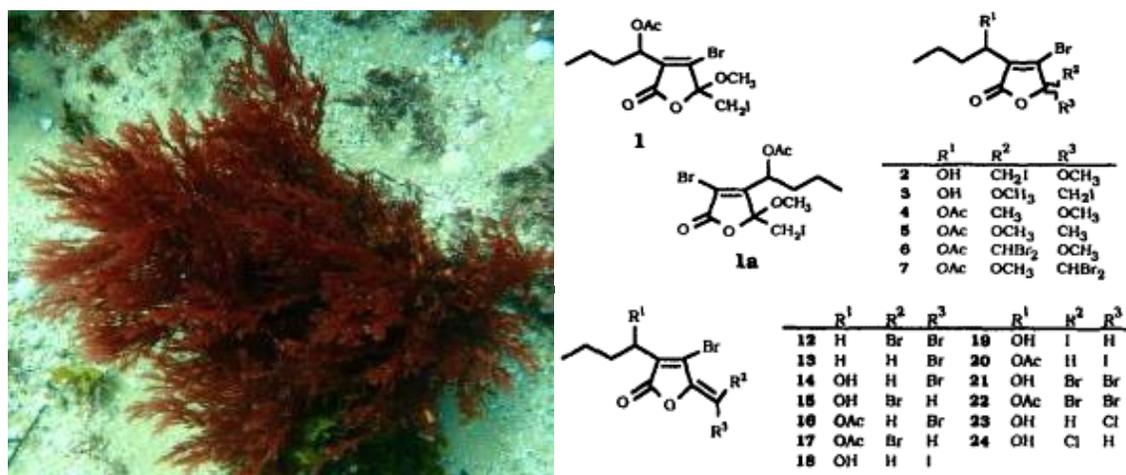


Figura 23. Las furanonas bromadas producidas por el alga roja *D. pulchra*. A la izquierda se muestra el alga *D. pulchra* y en la derecha las estructuras de las 21 furanonas aisladas. Fuente (de Nys et al., 1993).

La furanona natural (5Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona inhibe la bioluminiscencia en *V. harveyi* (Defoirdt et al., 2007), disminuye la formación de biopelícula y swarming en *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Ren et al., 2002; Ren et al., 2001) y aumenta la producción de sideróforo en *P. aeruginosa* (Ren et al., 2005). Otra furanona, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF) reduce la producción de ramnolípidos y evita la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* PAO1 (Choi et al., 2014).

Algunas furanonas naturales extraídas de algas rojas inhiben la colonización de superficies, además de disminuir la producción de elastasa, así como la invasión y colonización de *P. aeruginosa* en células epiteliales de córnea (Zhu et al., 2002) Debido a su eficiencia como inhibidores del SPQ, diversos conjuntos de furanonas se han sintetizado para evaluar su actividad.

1.15.1.4. Furanonas sintéticas.

Las furanonas son una familia de moléculas caracterizadas por la presencia de un anillo furano heterocíclico de cinco miembros. Dos estudios muestran que las furanonas sintéticas C-30 y C-56 (Figura 24) inhiben el SPQ y la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* (Hentzer et al., 2002, Hentzer et al., 2003). Las furanonas C-30 y C-56 disminuyen el SPQ, aumentan la sobrevivencia de los ratones, contribuyen a la disminución de la carga bacteriana y disminuyen el daño tisular de los pulmones (Wu et al., 2004).

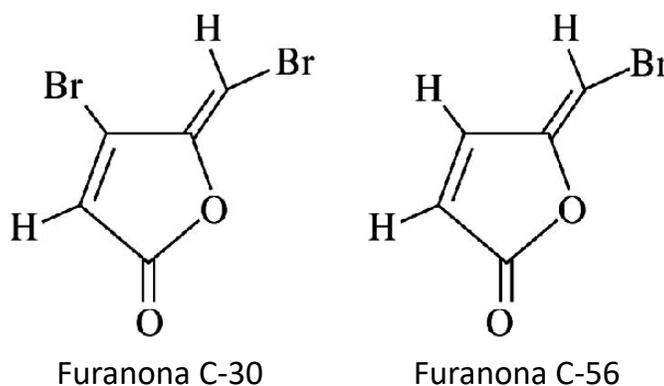


Figura 24. Estructuras de las furanonas C-30 y C-56. Las dos furanonas se han reportado como inhibidoras del SPQ. Tomada de (Abudoleh & Mahasneh, 2017).

Un estudio demuestra que una furanona denominada 5a puede reducir la adhesión de las células plasmáticas a superficies de vidrio en *P. aeruginosa* y otras furanonas inhiben el SPQ no saben los mecanismos (Kim et al., 2008).

También se ha demostrado que la (Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-metilfuran-2(5H)-ona (BF8) puede restablecer la susceptibilidad a antibióticos de las células persistentes de *P. aeruginosa* PAO1 en células plasmáticas y en biopelículas (Pan et al., 2012). Dos derivados de esta molécula, una con el bromo sustituido por un grupo carbonilo (NF1) y por un grupo metoxi (NF2) no tienen el mismo efecto, por lo que, se sugiere que el bromo es importante para la acción (Pan & Ren, 2013)

Otras furanonas (Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-2(5H)-furanona y 3,4-dicloro-2(5H)-furanona reducen la capacidad de adherencia en biopelículas de *Listeria*

monocytogenes (Rodríguez-López et al., 2019). Una gran variedad de furanonas bromadas sintéticas mostraron reducciones del 43% sobre la producción de biopelícula en PAO1 y *E. coli* (Shetye et al., 2013).

En un estudio se sintetizaron unas furanonas bromadas bicíclicas que inhibieron la formación de biopelícula en *E. coli* y la producción de elastasa B en *P. aeruginosa*. Además disminuyeron la formación de biopelícula a través del autoinductor 2 (Park et al., 2017; Yang et al., 2014). En otro estudio se sintetizaron 37 derivados de la furanona C-30 y se demostró que los derivados 2, 3, 24, 27 y 34 son los más efectivos para inhibir la formación de biopelícula en diferentes bacterias patógenas (Gomez et al., 2022).

2. JUSTIFICACIÓN.

El aumento de las infecciones causadas por organismos fármaco-resistentes son un problema de salud pública mundial debido a que tienen mayores tasas de mortalidad y morbilidad. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa infecciones nosocomiales y de difícil erradicación por su elevada tasa de resistencia a antibióticos. En México se ha reportado que esta bacteria tiene alta prevalencia en infecciones nosocomiales y presenta resistencia a 4 de los 6 antibióticos de primera línea (Garza-González et al., 2019; Miranda-Novales et al., 2020)

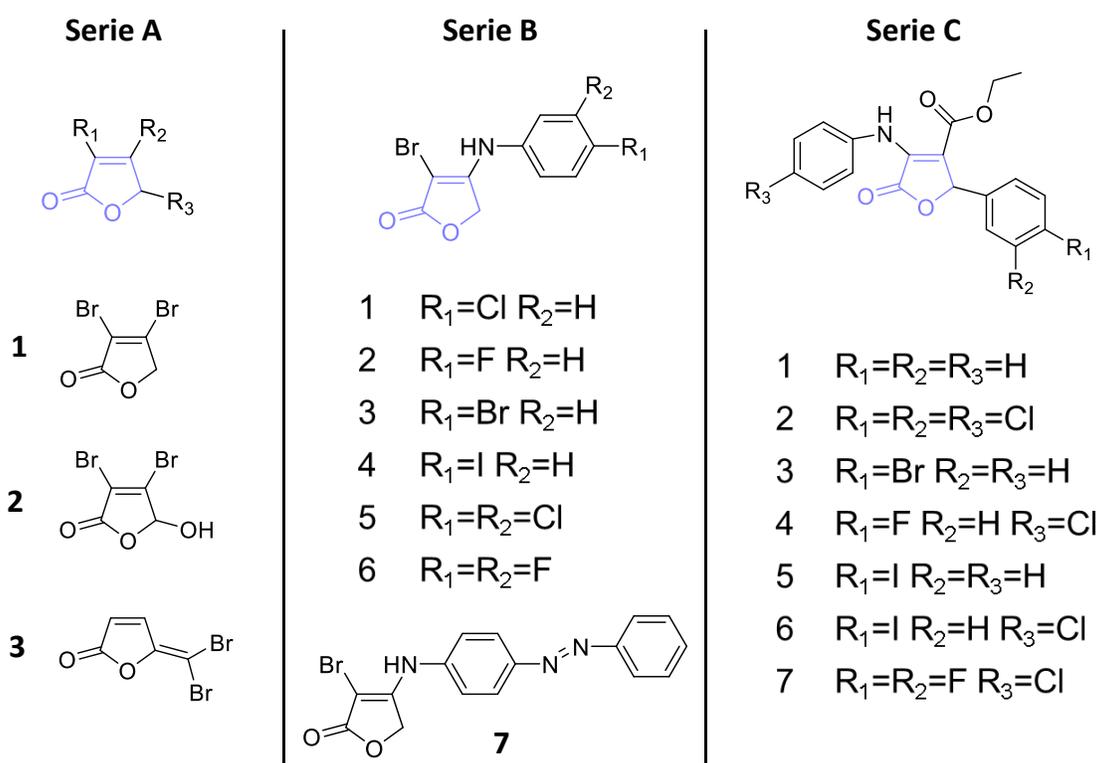
El desarrollo de nuevos antibióticos nos daría una solución temporal debido a que las bacterias desarrollaran nuevos mecanismos de resistencia. Por esta razón, es importante encontrar nuevas alternativas que no sometan a las bacterias a esta presión de selección como los tratamientos anti-virulencia (Defoirdt, 2017). La estrategia anti-virulencia inhibe el SPQ, responsable de la producción o formación de fenotipos relacionados con la virulencia y se ha demostrado que inhibir el SPQ y disminuir la virulencia aumenta la sobrevivencia de hospedero y puede ayudar a la eliminación de la infección (Gupta et al., 2015; Wu et al., 2004).

Se ha demostrado ampliamente que la furanona bromada C-30 es capaz de inhibir el SPQ en *P. aeruginosa*, sin embargo, algunas cepas no son susceptibles a su

acción (García-Contreras et al., 2015). Por esta razón, es necesario encontrar nuevas estructuras de furanonas que puedan tener esta acción.

3. HIPOTESIS.

Se conoce que algunos derivados naturales y sintéticos de la furan-2(5*H*)-ona inhiben el sistema de percepción de quorum en *P. aeruginosa*. Entonces es factible que los derivados de la bromofuran-2(5*H*)-ona (serie A), la bromo-4-(fenilamino)-furan-2(5*H*)-ona (serie B) y el etil 5-oxo-2-fenil-4-(fenilamino)-2,5-dihidrofuran-3-carboxylato (serie C) (Figura 25) disminuyan la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa*.



Furanonas serie A [furan-2(5*H*)-ona]

Furanonas serie B [3-bromo-4-(fenilamino) furan-2(5*H*)-ona]

Furanonas serie C [etil 5-oxo-2-fenil-4-(fenilamino)-2,5-dihidrofuran-3-carboxylato]

Figura 25. Estructuras de las furanonas utilizadas en este estudio.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Evaluar la inhibición del sistema de percepción de quorum (SPQ) de *P. aeruginosa* por derivados de la bromofuran-2(5H)-ona (serie A), la bromo-4-(fenilamino)-furan-2(5H)-ona (serie B) y el etil 5-oxo-2-fenil-4-(fenilamino)-2,5-dihidrofuran-3-carboxilato (serie C).

4.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar el efecto de los derivados de la serie A, B y C sobre el crecimiento de dos cepas de *P. aeruginosa*, una de referencia (PA14) y un aislado clínico multi fármaco resistente (INP64).
2. Evaluar el efecto de los derivados de la serie A, B y C sobre la producción de factores de virulencia de *P. aeruginosa* PA14 e INP64.
3. Realizar una relación estructura-actividad respecto a los compuestos más activos.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Cepas y compuestos.

Las cepas de *P. aeruginosa* PA14 (donada por el Dr. Rodolfo García) e INP64 (donada por el Dr. Rafael Coria) fueron mantenidas en glicerol y congeladas a -70°C. *P. aeruginosa* PA14 fue transformada por electroporación con el vector p220 que tiene una fusión transcripcional del gen *lacZ* y los genes *rhIA* (PA14 *lacZ::rhIA*), *pqsA* (PA14 *lacZ::pqsA*), *phz1* (PA14 *lacZ::phz*). Las bacterias transformadas fueron seleccionadas con tetraciclina.

Las furanonas utilizadas en este estudio (Figura 26) fueron sintetizadas por el MC Víctor Castro Torres en el Instituto de Química de la UNAM, se disolvieron en DMSO a una concentración de 1 M y se guardaron a -20°C.

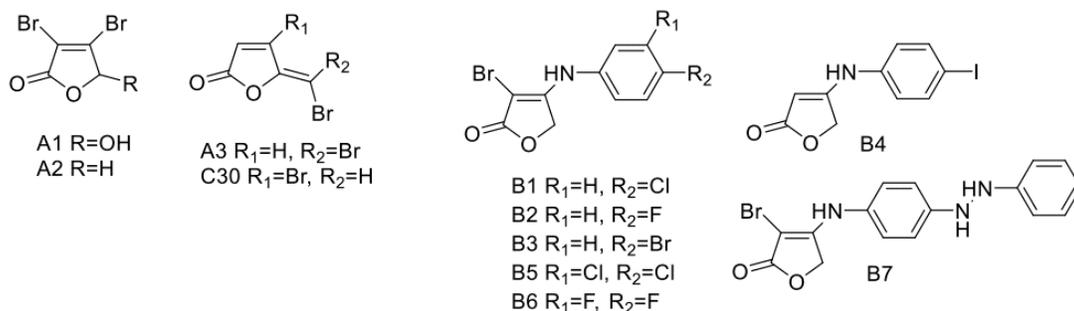


Figura 26. Estructuras de las furanonas de la serie A y B.

5.2 Síntesis de compuestos serie C.

La síntesis de estos compuestos se realizó en el Instituto de Química bajo la dirección del MC Víctor Castro Torres (Figura 27) siguiendo el procedimiento publicado anteriormente (Narayana et al., 2009). El procedimiento se resume a continuación, 0.226 g de β -ciclodextrina (0.2 mmol) se disolvieron en 30 mL de agua destilada y se agitó durante 10 minutos hasta obtener una solución transparente. A la solución se le adicionó un derivado de anilina (2 mmol) y se mantuvo en agitación por 5 minutos para formar un complejo de anilina-ciclodextrina. Posteriormente, se agregaron lentamente 0.170 g de dietil acetileno dicarboxilato (2 mmol) a través de embudo de adición seguido de un aldehído aromático (2 mmol) y la mezcla de reacción se llevó a los 60-70°C. La reacción se monitoreo por cromatografía de capa fina, posteriormente la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con acetato de etilo (4 x 10 mL). Las capas orgánicas fueron lavadas con agua, saturadas con solución brine (2 x 10 mL) y desecadas con Na₂SO₄ anhidro. Las capas orgánicas fueron evaporadas bajo presión reducida. El producto crudo resultante de la reacción fue purificado mediante cromatografía en columna abierta de sílice usando una mezcla de acetato de etilo y hexano (7:3) como eluyente. Los productos obtenidos fueron llevados al servicio de cristalografía del Instituto de Química.

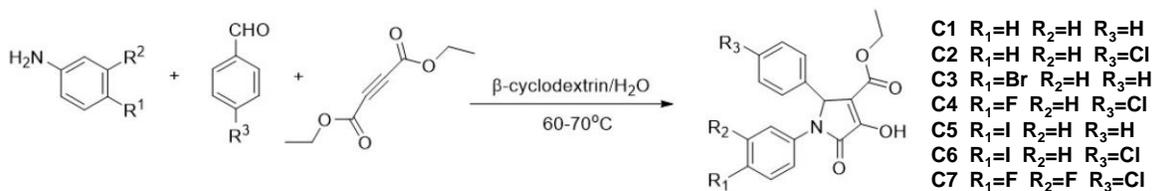


Figura 27. Síntesis de las moléculas de la serie C.

5.3 Crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de las furanonas y pirrolidonas.

Un precultivo de *P. aeruginosa* fue diluido en medio LB a una DO₆₀₀ de 0.05 equivalente a 1x10⁶ UFC/mL, los compuestos fueron agregados al inicio del cultivo a diferentes concentraciones: 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 µM. Los cultivos fueron incubados a 37°C/200 rpm durante 18 h, cada 2 h se tomaban muestras para medir el crecimiento en un espectrofotómetro a una DO de 600 nm.

5.4 Efecto de las furanonas y pirrolidonas en la producción de pirocianina.

Un precultivo de *P. aeruginosa* fue diluido en medio LB a una DO₆₀₀ de 0.05 equivalente a 1x10⁸ UFC/mL. A las 18 h de incubación, se extrajo y se cuantificó la pirocianina como se reporta anteriormente (Essar et al., 1990). Brevemente, 1 mL del cultivo fue centrifugado a 13,000 rpm durante 2 min y se recuperó el sobrenadante. La pirocianina se extrajo con cloroformo y HCL, posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro a una DO de 520 nm. El blanco usado fue HCL 0.2 N.

5.5 Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la formación de biopelícula.

Un precultivo de *P. aeruginosa* fue diluido en medio LB a una DO₆₀₀ de 0.05 equivalente a 1x10⁸ UFC/mL repartidos en 2 ml en tubos de vidrio e incubados a 37°C/200 rpm durante 18 h. Posteriormente la biopelícula fue cuantificada como se reporta previamente (O'Toole, 2011) con algunas modificaciones. El cultivo fue descartado y el tubo se lavó 2 veces con agua destilada para remover las células planctónicas restantes, después se agregaron 2.5 mL de cristal violeta a 0.1% y se dejó durante 15 minutos. El cristal violeta restante se eliminó, posteriormente se

agregaron 3 ml de etanol al 70% y se dejó por 15 minutos. La concentración de cristal violeta se midió en un espectrofotómetro a una DO de 630 nm usando EtOH 70% como blanco.

5.6 Efecto de las furanonas y pirrolidonas en el movimiento tipo swarming.

Un precultivo de *P. aeruginosa* fue diluido en 1 ml de LB a una DO600 de 0.05 para PA14 y de 1.5 para INP64. Se inoculó 1 μ L de este cultivo en una placa de medio BM2 (K_2HPO_4 62 mM, $MgSO_4$ 2 mM $FeSO_4$ 10 μ M, glucosa 0.4%, casamino ácidos 0.1% y agar 0.5%) (Overhage et al., 2008). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 h para PA14 y 36 h para INP64. Posteriormente el área de movimiento se midió con el software Molecular Imaging V. 4.0.3 de Kodak.

5.7 Regulación de los genes involucrados en QS por las furanonas y pirrolidonas.

Las cepas se cultivaron en medio LB a una DO600 inicial de 0.05 equivalente a 1×10^8 UFC/mL con las furanonas A1-A3 a 100 μ M durante 4 h. Posteriormente se tomó 1 mL de cultivo para recuperar las bacterias por centrifugación, el pellet bacteriano se resuspendió en un mL de Buffer Z y se cuantificó la actividad de B-gal como esta reportado (Miller, 1972).

5.8 Análisis estadísticos.

Todos los ensayos se realizaron en 3 ensayos por triplicado. Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism versión 9.0 para Windows mediante un ANOVA de una vía seguido por comparaciones múltiples de Dunnet.

6. RESULTADOS.

6.1 Síntesis de compuestos de la serie C.

Recientemente publicamos la síntesis y evaluación citotóxica de los derivados etil 5-oxo-2-fenil-4-(fenilamino)-2,5-dihidrofuran-3-carboxilato (Castro-Torres et al., 2020). Estos compuestos se sintetizaron mediante una reacción one-pot como se mencionó anteriormente (Narayana et al., 2009). Las estructuras de los compuestos

fueron elucidadas por análisis espectroscópicos y su comparación con los datos publicados en la literatura. Para llevar a cabo unos estudios de relación estructura actividad decidimos realizar una determinación estructural a través de un análisis cristalográfico de la furanona C2 (Figura 28).

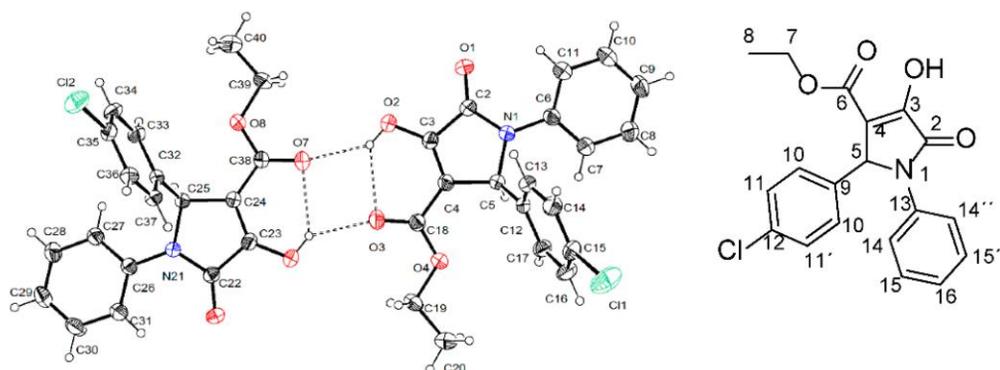


Figura 28. Estructura del compuesto C2. La estructura se determinó por análisis cristalográficos de rayos X. Imagen propia.

Los resultados de este estudio cristalográfico demostraron que los compuestos previamente publicados como etil 5-oxo-2-fenil-4-(fenilamino)-2,5-dihidrofuran-3-carboxilato (Castro-Torres et al., 2020) corresponden a derivados de pirrolidonas 3-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona (C1-C7). Cabe destacar la dificultad de discriminar entre las pirrolidonas C1-C7 y las furanonas reportadas previamente usando espectroscopia convencional.

Varios procedimientos sintéticos han sido descritos para obtener pirrolidonas halogenadas de aminas aromáticas y aldehídos en la presencia de dialquil acetileno dicarboxilatos. Sin embargo, muchas de estas síntesis requieren condiciones ácidas, radiación de luz, o complejos de ZnO, dimetil acetileno carboxilato, amina y aldehídos aromáticos. Al contrario, nuestra síntesis es limpia ya que solo usa β -dextrina como catalizador reusable y agua como solvente. Todas las reacciones tienen un alto rendimiento (85-94%).

La violaceína muestra actividad bactericida contra *P. aeruginosa* (Hoshino, 2011). Considerando que este compuesto tiene una mitad de 2-pirrolidona decidimos evaluar las pirrolidonas C1-C7 sobre la formación de biopelícula en *P. aeruginosa*.

6.2 Crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de las furanonas y pirrolidonas.

La terapia anti-SPQ inhibe la comunicación bacteriana sin afectar el crecimiento, por lo que, es importante evaluar el efecto de los compuestos sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Las furanona A3 comenzó a disminuir el crecimiento a partir de 250 μ M, mientras que las furanonas B1-B6 y las pirrolidonas C1-C7 no lo inhibieron a ninguna concentración probada (Figura 29).

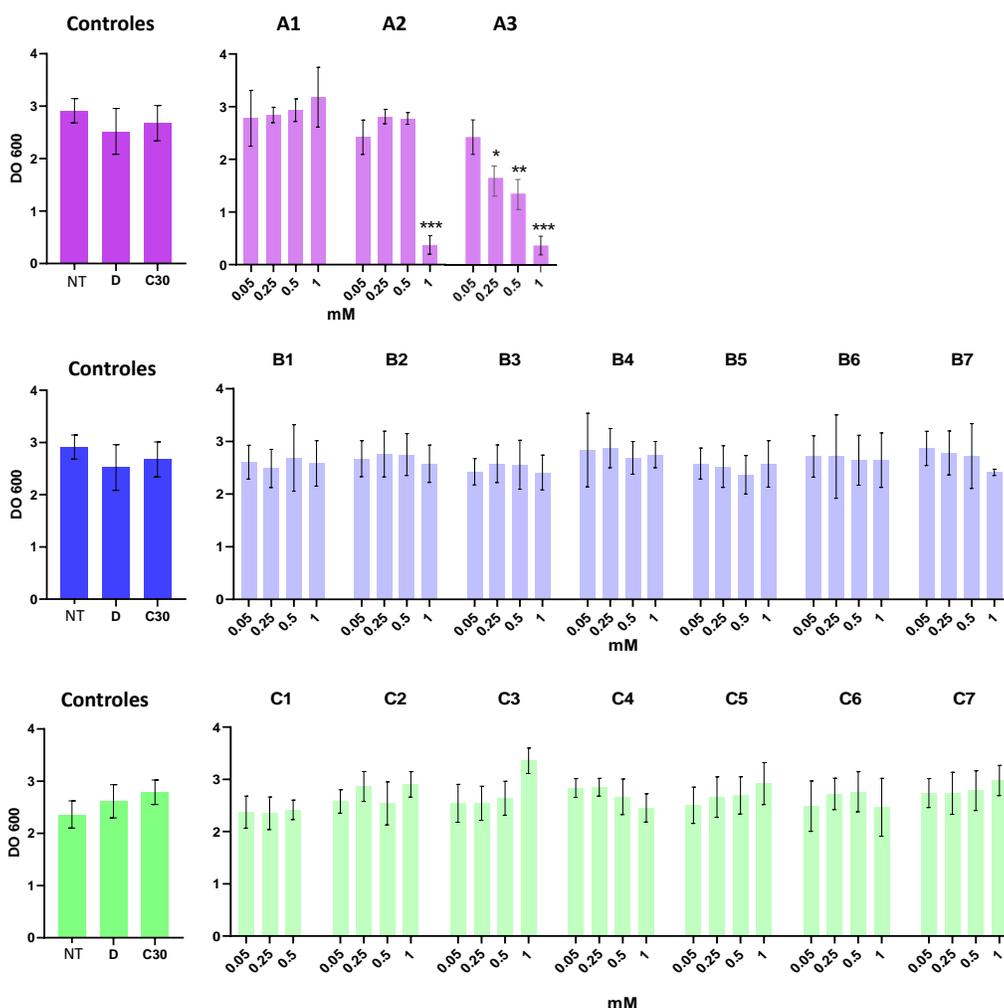


Figura 29. Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre el crecimiento de la cepa PA14. Se observa que solo las furanonas A2 y A3 (rosa) disminuyeron el crecimiento bacteriano mientras que las furanonas B (azul) y las pirrolidonas C (verde) no tienen efecto sobre el crecimiento. Las bacterias se cultivaron en presencia de los compuestos probados durante 18 h, se tomó un mL y se midió el crecimiento en un espectrofotómetro tomando el medio LB como blanco. Los controles son: NT, sin tratamiento; D, dimetil sulfoxido y C30, furanona C-30 a 100 μ M. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.001$.

6.3 Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la producción de piocianina.

La producción de piocianina depende exclusivamente del SPQ por lo que es un buen candidato para ver el efecto de esas furanonas. En la cepa PA14 las furanonas del grupo A disminuyeron la producción de piocianina en un 35% desde 10 μM hasta un 50% a 100 μM , mientras que las del grupo B no tuvieron efecto. Por otro lado, solo la pirrolidona C5 disminuyó la producción en un 35% a 500 μM (Figura 30).

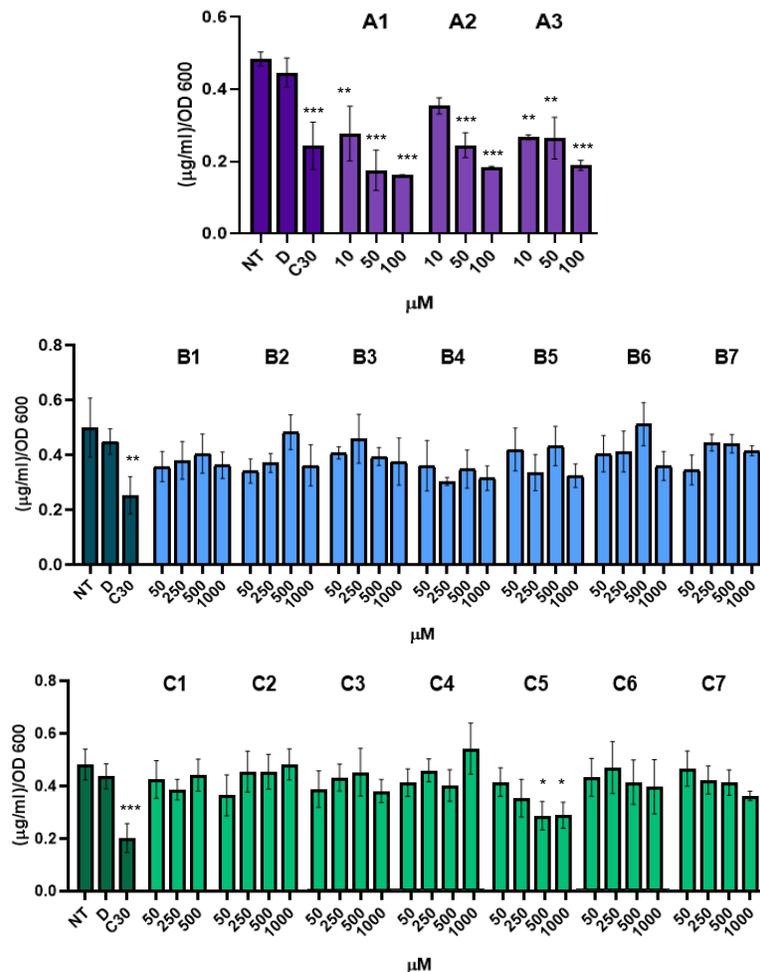


Figura 30. Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la producción de piocianina en *P. aeruginosa* PA14. Las furanonas A en todas las concentraciones (morado) y la pirrolidona C5 (verde) a 500 y 1000 μM disminuyeron la producción de piocianina, mientras que las furanonas B (azul) no tuvieron efecto sobre este factor. Las bacterias fueron cultivadas 18 h a 37°C/200 rpm en presencia de las furanonas y pirrolidonas, posteriormente la piocianina fue extraída y cuantificada por espectrofotometría como se mencionó anteriormente. NT: no tratamiento, D: dimetil sulfoxido, C30: furanona C-30 100 μM . * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.001$.

Las furanonas que disminuyeron la producción de piocianina en la cepa PA14 fueron probadas en la cepa fármacoresistente INP64. En esta cepa, las furanonas del grupo A disminuyeron en un 40% la producción de piocianina en todas las concentraciones. Por otra parte, las furanonas del grupo B y las pirrolidonas (grupo C) no tuvieron efecto (Figura 31).

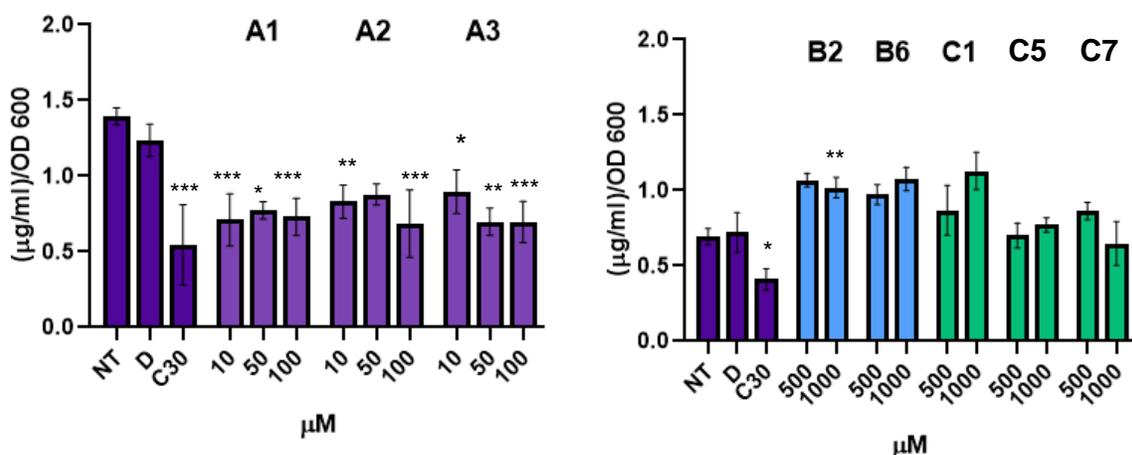


Figura 31. Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la producción de piocianina en *P. aeruginosa* INP64. Las furanonas A (morado) disminuyeron la producción de piocianina en la cepa INP64, mientras que las furanonas B (azul) aumentaron la producción y las pirrolidonas C (verde) no tuvieron efecto. Las bacterias fueron cultivadas 18 h a 37°C/200 rpm en presencia de las furanonas y pirrolidonas, posteriormente la piocianina fue extraída y cuantificada por espectrofotometría como se mencionó anteriormente. NT: no tratamiento, D: dimetil sulfoxido, C30: furanona C-30 a 100 µM. * P≤0.05, ** P≤0.005, *** P≤0.001.

6.4 Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la formación de biopelícula.

La formación de biopelícula es una característica relevante en las infecciones causadas por *P. aeruginosa* porque dificulta su tratamiento y erradicación, por esta razón es importante reducir o inhibir la formación de biopelícula. En la cepa PA14 las furanonas del grupo A disminuyeron la formación de biopelícula de un 30 a un 50% a 100 µM. Además, las furanonas B2, B6 y las pirrolidonas C1 y C7 disminuyeron la formación de biopelícula en un 50% a 1000 µM (Figura 32).

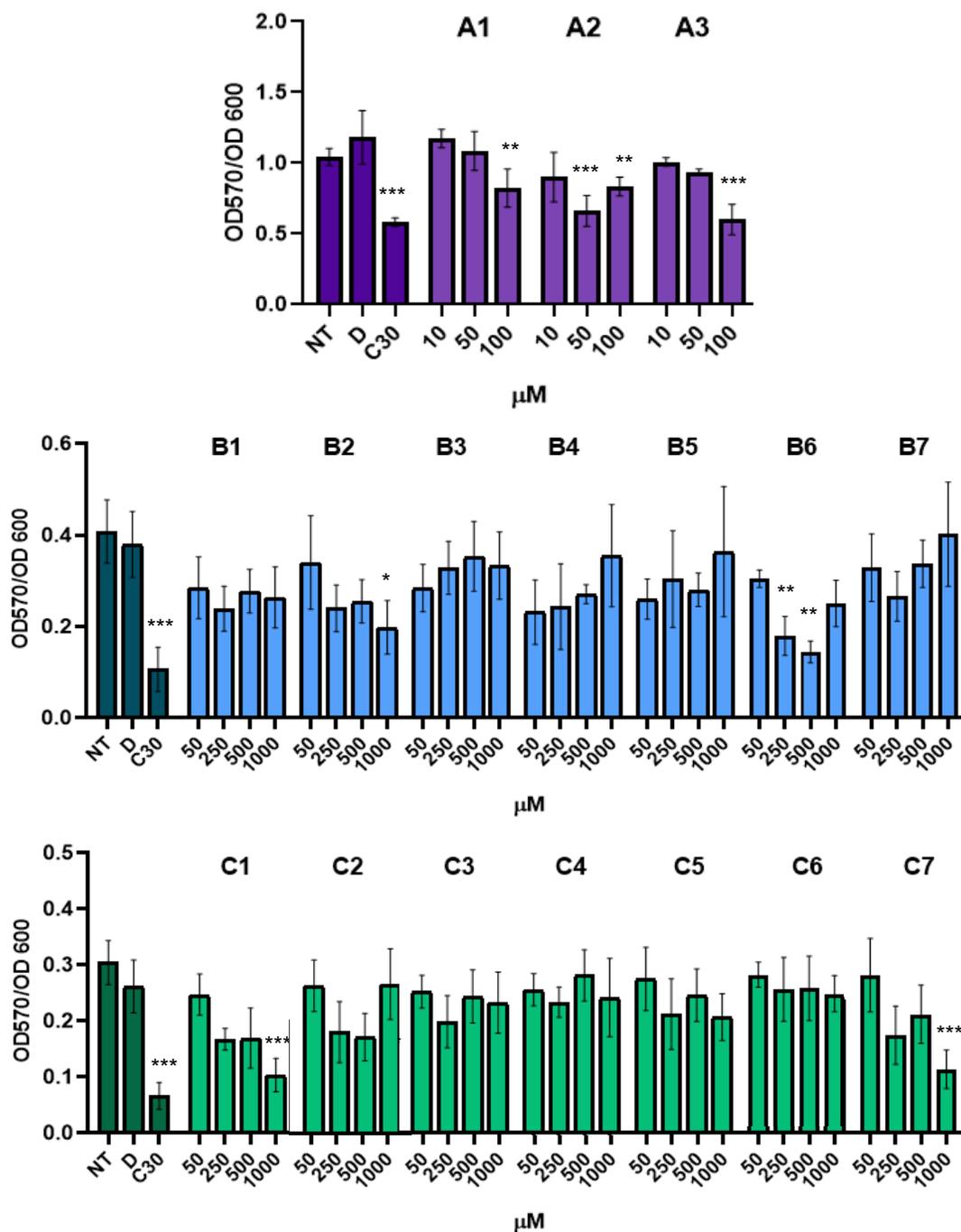


Figura 32. Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* PA14. Las furanonas A2, A3 a 100 μM (morado), B2, B6 a 500 y 1000 μM (azul) y las pirrolidonas C1 y C7 a 1000 μM (verde) disminuyeron la biopelícula en PA14. Las bacterias fueron incubadas en tubos de vidrio durante 18 h a 37°C/200 rpm en presencia de las furanonas y pirrolidonas. Posterior, la biopelícula fue teñida con cristal violeta y cuantificada por espectrofotometría como se indica anteriormente. NT: no tratamiento, D: dimetil sulfoxido, C30: furanona C-30 a 100 μM. * P≤0.05, ** P≤0.005, *** P≤0.001.

Las moléculas que tuvieron efecto en la cepa PA14 se probaron en la cepa INP64. En esta cepa las furanonas del grupo A inhibieron la formación de biopelícula a una concentración de 100 μM , mientras que las 2 furanonas del grupo B y las 3 pirrolidonas disminuyeron la biopelícula en un 50% en todas las concentraciones probadas (Figura 33).

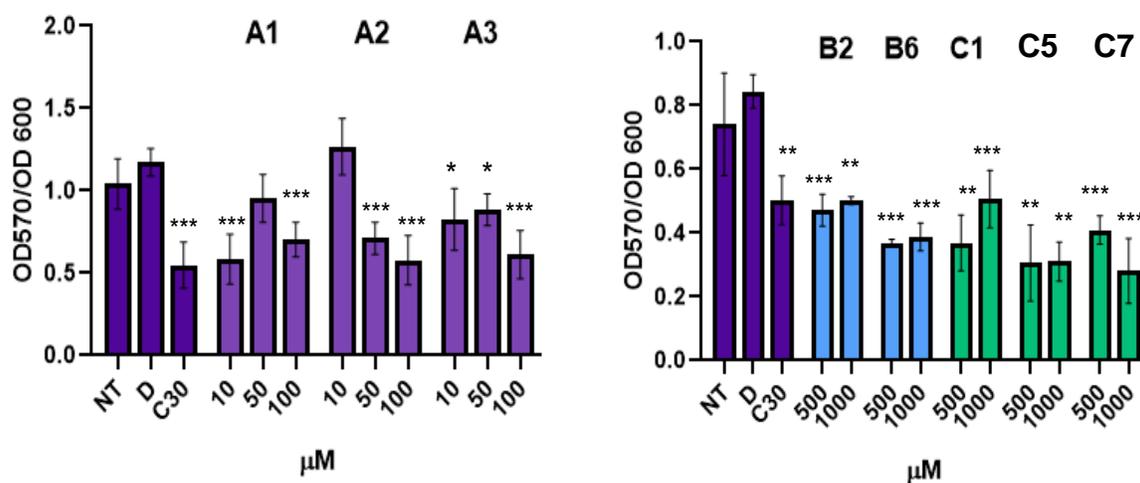


Figura 33. Efecto de las furanonas y pirrolidonas sobre la producción de biopelícula en *P. aeruginosa* INP64. Las furanonas A (morado), B (azul) y las pirrolidonas C a 500 y 1000 μM (verde) disminuyeron la formación de biopelícula en la cepa fármaco-resistente INP64. Las bacterias fueron incubadas en tubos de vidrio durante 18 h a 37°C/200 rpm en presencia de las furanonas y pirrolidonas. Posterior, la biopelícula fue teñida con cristal violeta y cuantificada por espectrofotometría como se indica anteriormente. NT: no tratamiento, D: dimetil sulfoxido, C30: furanona C-30 a 100 μM . * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.001$.

6.5 Efecto de las furanonas y pirrolidonas en la movilidad tipo *swarming*.

Las furanonas del grupo A son efectivas para disminuir la producción de pirocianina y biopelícula por lo que se probaron en la movilidad tipo *swarming* para asegurar que interrumpe el sistema de percepción de quorum. En ambas cepas, la A3 disminuyó en un 90% la movilidad *swarming* a una concentración de 100 μM . La disminución no fue dependiente de la concentración (Figura 34).

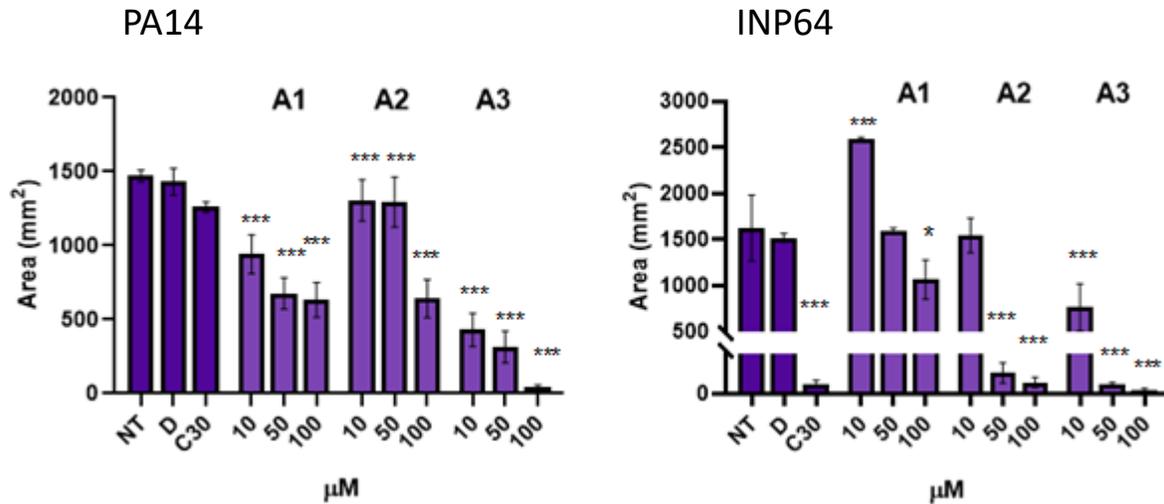


Figura 34. Efecto de las furanonas del grupo A sobre el movimiento swarming en *P. aeruginosa* PA14 e INP64. La furanona A3 disminuyó al 90% el movimiento tipo swarming en ambas cepas, mientras que la furanona A2 tuvo mayor efecto en INP64 y A1 fue más efectiva en PA14. Las placas de medio BM2 se inocularon con 10 µL de un precultivo a DO de 1. Se incubaron durante 24 h para PA14 y 36 h para INP 64. El área de swarming se midió con el programa Kodak. NT: no tratamiento, D: dimetil sulfoxido, C30: furanona C-30 a 100 µM. * P≤0.05, ** P≤0.005, *** P≤0.001.

6.6 Efecto de furanonas sobre los reguladores del SPQ.

Debido a que las furanonas del grupo A fueron las más efectivas en la inhibición del SPQ se determinó el posible blanco molecular de las furanonas A1, A2 y A3 mediante la actividad del reportero B-gal. La furanona A2 disminuyó la expresión de *rhlA*, *pqsA* y *phz*. Por otro lado, la furanona A3 disminuyó la expresión tiene un comportamiento similar a la furanona A2 (Figura 35).

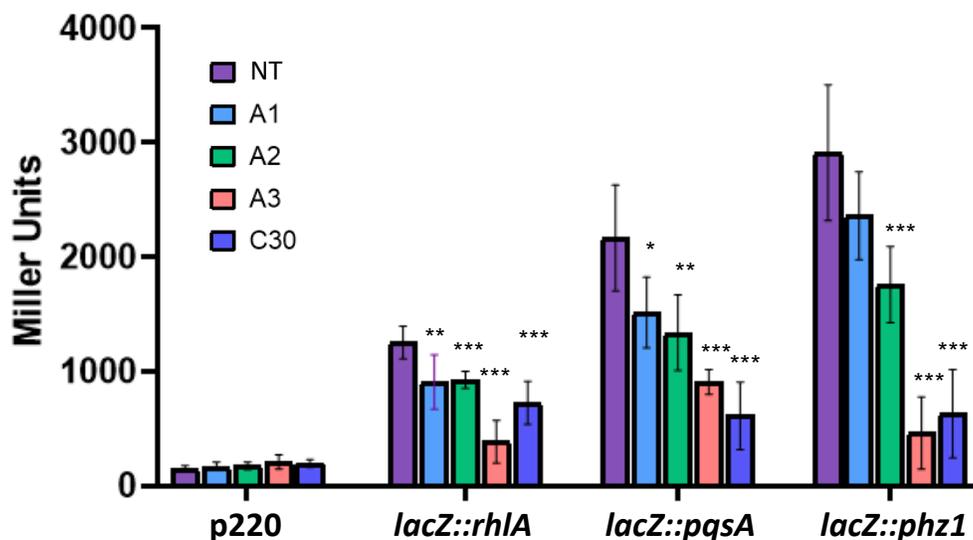


Figura 35. Efecto de las furanonas sobre los reguladores del SPQ. La furanona A3 (rosa) disminuyó la expresión de los tres genes rio abajo de los reguladores RhIR/I y PqsR/I igual que la furanona C-30, el vector p220 es el plásmido sin la fusión transcripcional usado como control. Las cepas PA14 *lacZ::rhIA*, PA14 *lacZ::pqsA* y PA14 *lacZ::phz1* se crecieron durante 4 h en medio LB. Posteriormente, se siguió el protocolo para medir B-gal. NT: no tratamiento, D: dimetil sulfoxido, C30: furanona C-30 a 100 μ M. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.001$.

7. DISCUSION.

Para la síntesis de las furanonas de la serie C se utilizó la metodología informada por Narayana et al 2001. La estructura de los compuestos sintetizados se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos así por su comparación con datos de la literatura (Narayana et al., 2009) (Figura 36).

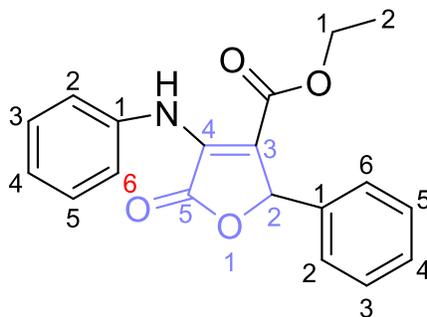


Figura 36. Estructura química del etil 5-oxo-2-fenil-4-(fenilamino)-2,5-dihidrofuran-3-carboxilato.

Con el fin de obtener datos de la estructura cristalina se decidió realizar la determinación estructural de la furanona C-2 por métodos de difracción de rayos X. Los resultados indicaron de manera inequívoca que la estructura de C-2 correspondía a una pirrolidona y no a una furanona. Este resultado mostró que todas las estructuras de la serie C eran en realidad pirrolidonas.

La síntesis de la pirrolidona C-2 se había informado previamente utilizando los mismos reactivos a los utilizados para la síntesis de la pirrolidonas C-1 a C-7, sin embargo, se utilizó radiación de microondas en la presencia de p-TSOH (Swamy et al., 2020). También la pirrolidona C-2 se obtuvo con los mismos reactivos ya mencionados, pero utilizando partículas tetragonales de nano-ZrO₂ como catalizador reutilizable (Saha et al., 2016). Además, otros derivados de pirrolidonas halogenadas fueron sintetizados de dietil acetileno dicarboxilato, aminas y aldehídos aromáticos mediante la catálisis sin metal y foto-redox bajo la radiación de rosa de bengala (Dutta et al., 2021). Otros análogos de pirrolidonas han sido sintetizados de la reacción de 3,4 difluoro anilina, dietil acetileno dicarboxilato y Cl-benzaldehído en agua y catalizada con ZnO-[DABCO(C₂COOH)₂]₂ (Mondal et al., 2019). Sin embargo, nuestra síntesis de las pirrolidonas C1-C7 es superior ya que se utilizó β-dextrina como catalizador reusable y agua como disolvente.

Una de las moléculas que fungen como autoinductores del SPQ de *P. aeruginosa* son las AHL, estas moléculas tienen una furanona como estructura base. Con base en lo anterior, las furanonas C-30 y C-56 fueron sintetizadas adicionando átomos de bromo. En este estudio mostramos la actividad anti-SPQ de dos series de derivados de furanonas (A y B) y una serie de pirrolidonas (C) comparadas con la actividad anti-SPQ de la furanona C-30. Además, se muestra la actividad anti-SPQ de estas series en una cepa de referencia (PA14) y un aislado clínico multi-fármaco resistente (INP64).

Aunque en este estudio no se observa un mejor desempeño de las furanonas probadas con la C-30 es importante encontrar nuevas moléculas que inhiban este sistema porque la furanona C-30 presenta una gran variabilidad en su acción sobre el SPQ, incluso aumentando su expresión en algunos aislados clínicos de *P.*

aeruginosa (García-Contreras et al., 2015). También, se ha reportado que algunas cepas son resistentes a la furanona C-30 por sobreexpresión de bombas de eflujo, esto podría deberse a que esta furanona inhibe el crecimiento en algunos aislados clínicos (García-Contreras et al., 2015) sometidos a una presión de selección que genera resistencia. Debido a esta resistencia es importante encontrar nuevas moléculas que puedan inhibir el SPQ de esta bacteria.

Nuestros resultados muestran que los derivados de bromofuran-2(5H)-ona (serie A) en concentración de 100 μM disminuyen la expresión de los tres factores de virulencia, además, en la cepa PA14, las furanonas A2 y A3 disminuyen la expresión de genes involucrados en el SPQ. En otros estudios se han probado furanonas que disminuyen la formación de biopelícula en concentraciones menores, sin embargo, no se han combinado con otros factores y tampoco se ha estudiado el posible blanco y la mayoría de los estudios son realizados con la cepa PAO 1, una cepa con menor virulencia que la PA14 usada en este estudio (Kim et al., 2008; Pan et al., 2012; Pan & Ren, 2013; Park et al., 2017; Shetye et al., 2013; Yang et al., 2014).

En un estudio anterior (Yang et al., 2014), se probaron furanonas bromadas bicíclicas que tienen efecto sobre la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* en una concentración mayor (400 μM) a las furanonas de la serie A probadas en este estudio (100 μM). En otro estudio más reciente (Gomez et al., 2022) se demostró que una monobromo furanona 2 disminuye la biopelícula 75%, mientras que una dibromofuranona con un grupo metilo 24 en un 70% en una concentración de 50 μM .

Las bromo-4-(fenilamino)-furan-2(5H)-ona B2 y B6 solo disminuyen la formación de biopelícula, pero no los otros dos factores, esto sugiere que están actuando por un método diferente al SPQ, esto es respaldado por el hecho de que estas furanonas no afectan la expresión de los genes involucrados en el SPQ. La formación de biopelícula puede ser regulada por otros métodos como el regulador Gac/Rsm y los niveles de di-GMP cíclico (Valentini & Filloux, 2016; Valentini et al., 2018) por lo que posiblemente estas furanonas podrían interferir estos sistemas pero se necesitan más estudios al respecto.

Por otro lado, las 3-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona C1, C5 y C7 muestran diferentes efectos sobre el SPQ de *P. aeruginosa*. La pirrolidona C5 disminuye la producción de pirocianina en la cepa PA14, mientras que en la cepa INP64 no tiene efecto. Las pirrolidonas C1 y C7 disminuyen la formación de biopelícula en ambas cepas a concentraciones 10 veces más altas que las furanonas de la serie A, lo que las hace menos efectivas.

Por otro lado, es importante mencionar que las moléculas más activas de las series B y C son las que presentan átomos de flúor en sus estructuras. Lo que nos sugiere que este halógeno podría ser un buen inhibidor del SPQ. Indiscutiblemente, para probar esta hipótesis se requieren más estudios.

8. CONCLUSIONES.

Los compuestos sintetizados en este trabajo son derivados de 3-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona y no furanonas. Este hallazgo evidenció la dificultad de diferenciar las estructuras.

Los derivados de bromofuran-2(5H)-ona (A1-A3) a 100 μ M disminuyen la producción de pirocianina, la formación de biopelícula y el movimiento tipo swarming en las cepas PA14 e INP64 de *P. aeruginosa* sin afectar su crecimiento.

Los derivados de las bromo-4-(fenilamino)-furan-2(5H)-ona (B1-B6) hasta 1 mM no afectan el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* PA14 e INP64. Sin embargo, solo B2 y B6 disminuyen la formación de biopelícula y el movimiento tipo swarming en ambas cepas de *P. aeruginosa*.

Los derivados de las 3-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona (C1-C7) no afectan el crecimiento de *P. aeruginosa* hasta 1 mM, no obstante, solo C1, C5 y C7 disminuyen la formación de biopelícula.

9. PERSPECTIVAS.

Probar la eficacia de las furanonas A para disgregar biopelículas en superficies y dispositivos médicos.

10. BIBLIOGRAFIA.

- Abudoleh, S. M., & Mahasneh, A. M. (2017). Anti-quorum sensing activity of substances isolated from wild berry associated bacteria. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 9(1).
- Alla Katsnelson. (2019). Novel antibiotic discovered in the guts of worms. *C&EN Global Enterprise*, 97(47). <https://doi.org/10.1021/cen-09747-scicon1>
- Amábile-Cuevas, C. F. (2021). Antibiotic usage and resistance in Mexico: an update after a decade of change. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 15(04), 442–449. <https://doi.org/10.3855/jidc.13467>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., & Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Barbieri, J. T., & Sun, J. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT BT - Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology (pp. 79–92). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0031-7>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1210–1223. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04743.X>
- Bradbury, R. S., Roddam, L. F., Merritt, A., Reid, D. W., & Champion, A. C. (2010). Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.018283-0>
- Broderick, K. E., Chan, A., Balasubramanian, M., Feala, J., Reed, S. L., Panda, M., ... Boss, G. R. (2008). Cyanide Produced by Human Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to Lethality in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(3), 457–464. <https://doi.org/10.1086/525282>
- Brown, D. G. (2017). New Drugs and Emerging Leads in Antibacterial Drug Discovery. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 682–702.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12409-6>

Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., & O'Toole, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *187*(21), 7351–7361. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005>

Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S., & Häussler, S. (2015). LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition. *Infection and Immunity*, *84*(1), 162–171. https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15/SUPPL_FILE/ZII999091531SO1.PDF

Castro-Torres, V. A., Jacobo-Herrera, N. J., Díaz-Sánchez, L., Rocha-Zavaleta, L., García-López, P., & Martínez-Vázquez, M. (2020). Synthesis and cytotoxic evaluation of halogenated furanones. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* *2020 151:12*, *151*(12), 1841–1849. <https://doi.org/10.1007/S00706-020-02708-0>

CDC. (2019a). About Antibiotic Resistance. Recuperado el 22 de abril de 2023, de <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

CDC. (2019b). About *P. aeruginosa* in Healthcare Settings. Recuperado de www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html

Chavez-Jacobo, V. (2020). La batalla contra las superbacterias: No mas antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *23*(1), 1–11.

Chavolla-Canal, A. J., Gonzalez-Mercado, M. G., & Ruiz-Larios, A. (2016). Prevalencia de bacterias aisladas con resistencia antibiótica extendida en los cultivos de orina durante 8 años en un hospital de segundo nivel en México. *Revista Mexicana de Urología*, *76*(4), 213–217. <https://doi.org/10.1016/J.UROMX.2016.04.003>

Choi, S.-C., Zhang, C., Moon, S., & Oh, Y.-S. (2014). Inhibitory effects of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) on acyl-homoserine lactone-mediated virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Microbiology*, *52*(9), 734–742. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4060-x>

Cigana, C., Castandet, J., Sprynski, N., Melessike, M., Beyria, L., Ranucci, S., ...

Everett, M. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Contributes to the Establishment of Chronic Lung Colonization and Modulates the Immune Response in a Murine Model. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.620819>

Coleman, S. R., Blimkie, T., Falsafi, R., & Hancock, R. E. W. (2020). Multidrug adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* swarming cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01999-19>

Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., & Attree, I. (2001). Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Molecular Microbiology*, 40(1), 76–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02368.x>

Das, T., & Manefield, M. (2012). Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046718>

De Nys, R., Steinberg, P. D., Willemsen, P., Dworjanyn, S. A., Gabelish, C. L., & King, R. J. (1995). Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, 8(4), 259–271. <https://doi.org/10.1080/08927019509378279>

de Nys, Rocky, Wright, A. D., König, G. M., & Sticher, O. (1993). New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra* (cf. *fimbriata*). *Tetrahedron*, 49(48), 11213–11220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81808-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81808-1)

Defoirdt, T. (2017). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>

Defoirdt, T., Miyamoto, C. M., Wood, T. K., Meighen, E. A., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2486–2495. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2007.01367.X>

Dell'Anno, F., Vitale, G. A., Buonocore, C., Vitale, L., Palma Esposito, F., Coppola, D., ... de Pascale, D. (2022). Novel Insights on Pyoverdine: From Biosynthesis to

Biotechnological Application. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911507>

Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., & Zhang, L.-H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3526–3531. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3526>

Dutta, A., Rohman, M. A., Nongrum, R., Thongni, A., Mitra, S., & Nongkhaw, R. (2021). Visible light-promoted synthesis of pyrrolidinone derivatives via Rose Bengal as a photoredox catalyst and their photophysical studies. *New Journal of Chemistry*, *45*(18). <https://doi.org/10.1039/d1nj00343g>

Ellen, D. M., & O'Toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/membr.64.4.847-867.2000>

Essar, D., Eberly, L., Hadero, A., & Crawford, I. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications | *Journal of Bacteriology*. *Journal of Bacteriology*, *172*(2).

Farrow, J. M., Sund, Z. M., Ellison, M. L., Wade, D. S., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2008). PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the rhl quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00753-08>

Fata, M. M., Ivan, D., M., S. I., Shirin, G., & A., R. B. H. (2015). Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, *6*(3), 10.1128/mbio.00453-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00453-15>

Fetzner, S. (2014). Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology*, *201*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.001>

Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Medecine sciences*, *19*(1), 77–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/medsci/200319177>

Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal*

of *Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>

Galdino, A. C. M., Viganor, L., de Castro, A. A., da Cunha, E. F. F., Mello, T. P., Mattos, L. M., ... Santos, A. L. S. (2019). Disarming *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB) as a Chemotherapeutic Target. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01701>

Galle, M., Carpentier, I., & Beyaert, R. (2013). Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protein and Peptide Science*, *13*(8), 831–842. <https://doi.org/10.2174/138920312804871210>

García-Contreras, R., Martínez-Vázquez, M., Velázquez Guadarrama, N., Villegas Pañeda, A. G., Hashimoto, T., Maeda, T., ... Wood, T. K. (2013). Resistance to the quorum-quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Pathogens and Disease*, *68*(1), 8–11. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12039>

García-Contreras, R., Pérez-Eretza, B., Jasso-Chávez, R., Lira-Silva, E., Roldán-Sánchez, J. A., González-Valdez, A., ... Wood, T. K. (2015). High variability in quorum quenching and growth inhibition by furanone C-30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Pathogens and Disease*, *73*(6), ftv040. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv040>

Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, *14*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0209865>

Guilbaud, M., Bruzard, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., ... Bellon-Fontaine, M.-N. (2017). Proteomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Adhering to Solid Surfaces. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01465>

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., ... Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*.

<https://doi.org/10.3390/toxins8080236>

Hastings, J. W., & Nealson, K. H. (1977). BACTERIAL BIOLUMINESCENCE. *Annual Review of Microbiology*, 31(1), 549–595.

<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.003001>

Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9).

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>

Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(suppl_1), 29–35.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkg207>

He, C., Zhou, Y., Liu, F., Liu, H., Tan, H., Jin, S., ... Ge, B. (2017). Bacterial nucleotidyl cyclase inhibits the host innate immune response by suppressing TAK1 activation. *Infection and Immunity*, 85(9). <https://doi.org/10.1128/IAI.00239-17>

Hecker, S. J., Reddy, K. R., Totrov, M., Hirst, G. C., Lomovskaya, O., Griffith, D. C., ... Dudley, M. N. (2015). Discovery of a cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00127>

Hemmati, F., Salehi, R., Ghotaslou, R., Kafil, H. S., Hasani, A., Gholizadeh, P., ... Rezaee, M. A. (2020). Quorum Quenching: A Potential Target for Antipseudomonal Therapy. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2989. <https://doi.org/10.2147/IDR.S263196>

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., ... Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87–102. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-87/CITE/REFWORKS>

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., ... Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*, 22(15), 3803–3815. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366>

Horna, G., & Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 246, 126719.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>

Hoshino, T. (2011). Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1463–1475. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z>

Imai, Y., Meyer, K. J., Iinishi, A., Favre-Godal, Q., Green, R., Manuse, S., ... Lewis, K. (2019). A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 576(7787). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1>

in 't holt, A. F. V., Severin, J. A., Lesaffre, E. M. E. H., & Vos, M. C. (2014). A Systematic Review and Meta-Analyses Show that Carbapenem Use and Medical Devices Are the Leading Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2626–2637. <https://doi.org/10.1128/aac.01758-13>

Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>

Kaminski, A., Gupta, K. H., Goldufsky, J. W., Lee, H. W., Gupta, V., & Shafikhani, S. H. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS Induces Intrinsic Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That is Dependent on its GAP Domain Activity. *Scientific Reports*, 8(1), 14047. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32491-2>

Katsube, T., Echols, R., Arjona Ferreira, J. C., Krenz, H. K., Berg, J. K., & Galloway, C. (2017). Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacterial Infections: Pharmacokinetics and Safety in Subjects With Renal Impairment. *Journal of Clinical Pharmacology*, 57(5). <https://doi.org/10.1002/jcph.841>

Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V., & Khedher, M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Annales de Biologie Clinique*, 69(4), 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>

Kim, C., Kim, J., Park, H.-Y., Park, H.-J., Lee, J. H., Kim, C. K., & Yoon, J. (2008). Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1474-6>

- Klockgether, J., & Tümmler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research*, 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10506.1>
- Kumar, S., Mukherjee, M. M., & Varela, M. F. (2013). Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *International Journal of Bacteriology*, 2013, 204141. <https://doi.org/10.1155/2013/204141>
- LabsterTheory. (s/f). Pared celular gram negativa. Recuperado de <https://theory.labster.com/es/gram-negative-bacteria/>
- Lambert P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95, 22–26.
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M., & Murgier, M. (1990). Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 72(2), 147–156. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9084\(90\)90140-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9084(90)90140-C)
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Leid, J. G., Willson, C. J., Shirliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., & Jeffers, A. K. (2005). The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing¹. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7512–7518. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512>
- Lenney, W., & Gilchrist, F. J. (2011). &em>&em>Pseudomonas aeruginosa&em>&em> and cyanide production. *European Respiratory Journal*, 37(3), 482 LP – 483. <https://doi.org/10.1183/09031936.00122810>
- Liscio, J. L., Mahoney, M. V., & Hirsch, E. B. (2015). Ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam: two novel β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination agents for the treatment of resistant Gram-negative bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 266–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.003>
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. (2009).

Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Maier, R. M., & Soberón-Chávez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625–633. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>

Maron, D. F., Smith, T. J. S., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-48>

McCarthy, M. W. (2019). Teixobactin: a novel anti-infective agent. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 17(1), 1–3. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1550357>

McMurry, J. (2004). *Química orgánica*. CENGAGE Learning.

Miller, J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 426–433. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2016.02.021>

Miranda-Navales, G., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., & Ponce de León-Rosales, S. (2022). Limited Therapeutic Options in Mexico for the Treatment of Urinary Tract Infections. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111656>

Miranda-Navales, M. G., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., Rodríguez-Álvarez, M., Solórzano-Santos, F., Soto-Hernández, J. L., ... ángeles-Morales, V. (2020). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de México*, 62(1), 42–49. <https://doi.org/10.21149/10543>

Mok Tsze Chung, A. S., Teo, Y. K., Cheng, W. T., & Tan, J. B. L. (2021). Structure-

activity relationship of biological macromolecules. En *Biological Macromolecules: Bioactivity and Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85759-8.00002-6>

Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R. M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M. E., Hernández-Castro, R., & Ángel Manjarrez-Hernández, H. (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(12), 840–849. <https://doi.org/10.3855/jidc.1703>

Momb, J., Wang, C., Liu, D., Thomas, P. W., Petsko, G. A., Guo, H., ... Fast, W. (2008). Mechanism of the Quorum-Quenching Lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate Modeling and Active Site Mutations. *Biochemistry*, 47(29), 7715–7725. <https://doi.org/10.1021/bi8003704>

Mondal, P., Chatterjee, S., Sarkar, P., Bhaumik, A., & Mukhopadhyay, C. (2019). Preparation of DABCO-Based Acidic-Ionic-Liquid-Supported ZnO Nanoparticles and Their Application for Ecofriendly Synthesis of N-Aryl Polyhydroquinoline Derivatives. *ChemistrySelect*, 4(40). <https://doi.org/10.1002/slct.201902427>

Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa, L. F., Isselo, D., Méndez, J. L., Rodríguez, C., ... Cravioto, A. (2017). Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>

Moreau-Marquis, S., Redelman, C. V., Stanton, B. A., & Anderson, G. G. (2010). Co-culture Models of *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilms Grown on Live Human Airway Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (44). <https://doi.org/10.3791/2186>

Morrow, K. A., Seifert, R., Kaefer, V., Britain, A. L., Sayner, S. L., Ochoa, C. D., ... Stevens, T. (2015). Heterogeneity of pulmonary endothelial cyclic nucleotide response to *pseudomonas aeruginosa* ExoY infection. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(10). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00165.2015>

Morrow, K. Adam, Frank, D. W., Balczon, R., & Stevens, T. (2017). The

Pseudomonas aeruginosa exoenzyme Y: A promiscuous nucleotidyl cyclase edema factor and virulence determinant. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 238). https://doi.org/10.1007/164_2016_5003

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1). <https://doi.org/10.1128/membr.05007-11>

Narayana Murthy, S., Madhav, B., Vijay Kumar, A., Rama Rao, K., & Nageswar, Y. V.D. (2009). Facile and efficient synthesis of 3,4,5-substituted furan-2(5H)-ones by using β -cyclodextrin as reusable catalyst. *Tetrahedron*, 65(27), 5251–5256. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2009.04.081>

Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), 496–518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mr.43.4.496-518.1979>

Ng, W.-L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 197–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47). <https://doi.org/10.3791/2437>

O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on antimicrobial resistance.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E. W. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2671–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.01659-07>

Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–1. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM01210>

- Pan, J., Bahar, A., Syed, H., & Ren, D. (2012). Reverting Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Persister Cells by (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one. *PLoS ONE*, 7(9), e45778. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045778>
- Pan, Jiachuan, & Ren, D. (2013). Structural effects on persister control by brominated furanones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(24), 6559–6562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.070>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., & Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 478–485. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2015.08.005>
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2016 14:9, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Park, J. S., Ryu, E.-J., Li, L., Choi, B.-K., & Kim, B. M. (2017). New bicyclic brominated furanones as potent autoinducer-2 quorum-sensing inhibitors against bacterial biofilm formation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 76–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.037>
- Park, M.-H., Kim, S. Y., Roh, E. Y., & Lee, H. S. (2017). Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (exoU and exoS) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. *Auris Nasus Larynx*, 44(3), 258–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anl.2016.07.005>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*,

- 57, 106–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Pérez-Gracia, M.-T. (2021). *La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos*.
- PUCRA. (2019). Estado actual de la resistencia antimicrobiana México 2018. Recuperado el 10 de abril de 2023, de <http://www.puis.unam.mx/ReportePUCRA2.pdf>
- Rangel, S., Logan, L. K., & Hauser, A. R. (2014). The ADP-Ribosyltransferase Domain of the Effector Protein ExoS Inhibits Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. *mBio*, 5(3), 10.1128/mbio.01080-14. <https://doi.org/10.1128/mbio.01080-14>
- Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2), 117–128. <https://doi.org/10.1038/nrd3013>
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Ren, D., Sims, J. J., & Wood, T. K. (2002). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology*, 34(4), 293–299. <https://doi.org/10.1046/J.1472-765X.2002.01087.X>
- Ren, Dacheng, Sims, J. J., & Wood, T. K. (2001). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environmental Microbiology*, 3(11), 731–736. <https://doi.org/10.1046/J.1462-2920.2001.00249.X>
- Ren, Dacheng, Zuo, R., & Wood, T. K. (2005). Quorum-sensing antagonist (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 689–695. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1691-6>
- Reszka, K. J., O'Malley, Y., McCormick, M. L., Denning, G. M., & Britigan, B. E.

(2004). Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), 1448–1459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.011>

Reygaert, W. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Molecular Aspects of Antimicrobial Resistance and Virulence. *CLINICAL LABORATORY SCIENCE*, 22.

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.3.482>

Ringel, M. T., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial cell. Microbial Cell (Graz, Austria)*, 5(10), 424–437.

Rodríguez-López, P., Barrenengoa, A. E., Pascual-Sáez, S., & Cabo, M. L. (2019). Efficacy of Synthetic Furanones on *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Foods*. <https://doi.org/10.3390/foods8120647>

Ryall, B., Lee, X., Zlosnik, J. E. A., Hoshino, S., & Williams, H. D. (2008). Bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex are cyanogenic under biofilm and colonial growth conditions. *BMC Microbiology*, 8(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-108>

Sader, H. S., Mendes, R. E., Pfaller, M. A., Shortridge, D., Flamm, R. K., & Castanheira, M. (2018). Antimicrobial activities of aztreonam-avibactam and comparator agents against contemporary (2016) clinical enterobacteriaceae isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1). https://doi.org/10.1128/AAC.01856-17/SUPPL_FILE/ZAC001186804S1.PDF

Saha, A., Payra, S., & Banerjee, S. (2016). In-water facile synthesis of poly-substituted 6-arylamino pyridines and 2-pyrrolidone derivatives using tetragonal nano-ZrO₂ as reusable catalyst. *RSC Advances*, 6(104). <https://doi.org/10.1039/c6ra24367c>

Schertzer, J. W., Brown, S. A., & Whiteley, M. (2010). Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Molecular Microbiology*, 77(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2958.2010.07303.x

Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>

Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*, *185*(7), 2066–2079. <https://doi.org/10.1128/jb.185.7.2066-2079.2003>

Shetye, G. S., Singh, N., Gao, X., Bandyopadhyay, D., Yan, A., & Luk, Y.-Y. (2013). Structures and biofilm inhibition activities of brominated furanones for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *MedChemComm*, *4*(7), 1079–1084. <https://doi.org/10.1039/C3MD00059A>

Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., Bravo-Cuellar, A., Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., & Bravo-Cuellar, A. (2019). Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. *Cirugía y cirujanos*, *87*(2), 176–182. <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000494>

Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00008-0)

Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(6), 718–725. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0150-3/FIGURES/2>

Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2021). The Rhl Quorum-Sensing System Is at the Top of the Regulatory Hierarchy under Phosphate-Limiting Conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, *203*(5). <https://doi.org/10.1128/JB.00475-20>

Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001). Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, *183*(23), 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/jb.183.23.6746-6751.2001>

Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms.

Nature Reviews Microbiology, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>

Stone, G. G., & Ponce-De-Leon, A. (2020). In vitro activity of ceftazidime/avibactam and comparators against Gram-negative bacterial isolates collected from Latin American centres between 2015 and 2017. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(7), 1859–1873. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA089>

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>

Suay-García, B., Galán, F., Rodríguez-Iglesias, M. A., & Pérez-Gracia, M. T. (2019). Detection and Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing *Escherichia coli* in Animals. <https://home.liebertpub.com/vbz>, 19(2), 115–120. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2018.2333>

Swamy, M. K., Venkatesh, N., Swapna, M., & Venkateswar Rao, P. (2020). Microwave assisted Synthesis and Antimicrobial Activity of Substituted Pyrrolidinone derivatives. *International Journal of ChemTech Research*, 13(1). <https://doi.org/10.20902/ijctr.2019.130128>

Sylvie, L., Yongzheng, W., E., D. S., Christophe, B., Marvin, W., Lhousseine, T., & Jean-Marc, G. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* Production of Hydrogen Cyanide Leads to Airborne Control of *Staphylococcus aureus* Growth in Biofilm and In Vivo Lung Environments. *mBio*, 13(5), e02154-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.02154-22>

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences 2020*, Vol. 21, Page 8671, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228671>

Torumkuney, D., de la Torre, C., Langfeld, K., Lopez-Turrent, N. P., & Ossaille Beltrame, C. (2022). Country data on AMR in Mexico in the context of community-

acquired respiratory tract infections: links between antibiotic susceptibility, local and international antibiotic prescribing guidelines, access to medicine and clinical outcome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(Supplement_1), i43–i50. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAC216>

Tümmler, B., Wiehlmann, L., Klockgether, J., & Cramer, N. (2014). Advances in understanding *Pseudomonas*. *F1000Prime Reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-9>

Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>

Tyson, G. H., & Hauser, A. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Is a Novel Coactivator of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infection and Immunity*, 81(8), 2873–2881. <https://doi.org/10.1128/iai.00414-13>

Uroz, S., Chhabra, S. R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P., & Dessaux, Y. (2005). N-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*, 151(10), 3313–3322. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.27961-0/CITE/REFWORKS>

Valentini, M., & Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>

Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*, 41, 15–20. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.11.006>

Van Der Plas, M. J. A., Bhongir, R. K. V., Kjellström, S., Siller, H., Kasetty, G., Mörgelin, M., & Schmidtchen, A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11567>

Wei, Q., & Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>

Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153(12). <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0>

Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M., & Høiby, N. (2004). Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 1054–1061. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh223>

Yang, S., Abdel-Razek, O. A., Cheng, F., Bandyopadhyay, D., Shetye, G. S., Wang, G., & Luk, Y.-Y. (2014). Bicyclic brominated furanones: A new class of quorum sensing modulators that inhibit bacterial biofilm formation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(4), 1313–1317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.004>

Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., ... Karlowsky, J. A. (2019). Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-1055-2>

Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagacé-Wiens, P. R. S., ... Karlowsky, J. A. (2013). Ceftazidime-avibactam: A novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination. *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0013-7>

Zhang, J., Feng, T., Wang, J., Wang, Y., & Zhang, X. H. (2019). The Mechanisms and Applications of Quorum Sensing (QS) and Quorum Quenching (QQ). *Journal of Ocean University of China*, 18(6). <https://doi.org/10.1007/s11802-019-4073-5>

Zhu, H., Thuruthyil, S. J., Rice, S., Kjelleberg, S., Kumar, N., Read, R. W., ... Willcox, M. D. P. (2002). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors by furanones. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(13), 943.