



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

INHIBICIÓN DE LA PERCEPCIÓN DE QUORUM MEDIANTE LA LACTONASA  
AiiM EN CEPAS CLÍNICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE  
PACIENTES CON QUEMADURAS.

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**M. C LUIS ESAÚ LÓPEZ JÁCOME**

DIRECTOR DE TESIS  
**DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS**  
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA.  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR  
**DRA. GLORIA SOBERON CHÁVEZ**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DRA. MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA**  
LABORATORIO DE GENÓMICA BACTERIANA.  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo que me ha dado, porque a pesar de estar en tiempos complejos en cuanto a salud, en el panorama mundial y nacional, mi familia y yo estamos bien.

A mi esposa, Janett, por su constante apoyo, paciencia, por todo lo que me brinda. A mi hijo Esaú, porque es mi motor constante para todo. Porque me brinda la felicidad, junto con su madre. Porque es nuestro mejor experimento, porque es mi todo.

A mis padres, Miguel y Alicia, por su apoyo constante, amor, consejos. Porque sin ellos nada hubiese sido posible. A mis hermanos, Yadhira, Nelly y Abi por siempre estar presentes. A mis sobrinos Isis y Abi.

A mi tía Jovita (Q.E.P.D), quien siempre me apoyó y alentó a seguir estudiando, y esta tesis no será motivo de omisión de su nombre y memoria.

Al Laboratorio de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, por todo el apoyo, porque junto con Rafa, jefe y amigo; y Claudia, iniciamos este laboratorio hace 10 años. A Rafa por su apoyo constante. A Mely y Claudia quienes me apoyaron en todo momento. Sin omitir a Noé, Memo, Isa, Lulú, Alice, Enrique, Arturo y Sam. A todos ellos por hacer de ese espacio laboral sitio de debates, de aprendizaje constante.

Al Dr. Rodolfo García Contreras, quien además de jefe, tutor, mostró ser un amigo y consejero, quien me permitió jugar, diseñar, hacer y deshacer experimentalmente, por estar de manera constante al pendiente respetando mi criterio y exponiendo sus ideas para llevar todo al mejor puerto. Muchas Gracias por todo.

A los miembros del Laboratorio de Bacteriología, a cargo del Dr. Rodolfo por su apoyo constante, Pau, Bere, (ambas exintegrantes y amigas), Dánae, Daniel. Dr. Guillermo.

A la Dra. Georgina por su amistad, consejos, conocimientos y uno que otro regaño, por brindarme un espacio físico donde trabajar en el laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la facultad de medicina, lugar donde no solo aprendí, sino donde conocí amigos y colegas excepcionales. A Hugo (el Gords), Iris (Transformista experimentada), Huguito, Dani, Sampieri, Yorch el famoso, Chepina y un largo etcétera. A Eugenia por sus enseñanzas, apoyo absoluto. Muchas gracias a todos. Jamás podré estar al nivel de ustedes, pero he aprendido (aunque sea poco).

A la Dra. Rosario Morales por brindarme su amistad y apoyarme en todo momento, así como a los amigos que hice en su laboratorio, Fernando, Gaby y Pepe, quienes en todo momento me apoyaron y ayudaron.

A la Dra. Gloria Soberón por su apoyo constante y a Abi por sus consejos y ayuda.

Al Dr. Toshinari Maeda por su apoyo, amistad y por brindarme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio, en el Instituto de Tecnología de Kyushu a través de la beca Jasso. A Nguyen Thi Dong Phuong por su apoyo, amistad y conocimientos compartidos, al igual que a Chandra, por su amistad, conocimientos y consejo. A Hoshiko, Boia, Hirano y Nishima por su amistad, ayuda, hospitalidad. Gracias por todo.

Soy de los que piensan que la **ciencia** tiene una gran  
belleza. Un científico en el laboratorio no es sólo un  
técnico: es también un niño colocado ante fenómenos  
naturales que le impresionan como un cuento de  
hadas.

Marie Curie

Un poco de ciencia aleja a Dios, pero mucha ciencia te  
acerca a Él  
Louis Pasteur.

# Contenido

Resumen .....	1
Abstract .....	1
1. Introducción. ....	3
1.1 Quemaduras .....	3
1.2 Epidemiología de las quemaduras. ....	4
1.3 Respuesta Inmune en las quemaduras. ....	5
1.4 Microbiología de las quemaduras. ....	6
1.5 Infecciones en pacientes quemados .....	12
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	14
1.7 Factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	15
1.7.1 Lipopolisacárido .....	19
1.7.2 Flagelo .....	20
1.7.3 Elastasa .....	21
1.7.4 Alginato .....	23
1.7.5 Proteasa alcalina .....	25
1.7.6 Pioverdina .....	27
1.7.7 Píocianina .....	35
1.7.8 HCN .....	38
1.7.9 Ramnolípidos .....	39
1.7.10 Sistema de secreción tipo III .....	41
1.8 Percepción de quorum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	46
1.9 Resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	57
1.9.1 Resistencia intrínseca. ....	57
1.9.2 Resistencia adquirida. ....	63
1.10 Infecciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	66
1.11 Estrategias Anti-percepción de quórum. ....	77
1.11.1 Inhibición de la biosíntesis de AHL. ....	79
1.11.2 Inhibición de la detección de la señal. ....	79
1.11.3 Inhibición de la señal. ....	81
1.12 Enzima AiiM. ....	87
2. Justificación.....	90
3. Diseño experimental .....	95

4. Hipótesis.....	95
4.1 Hipótesis alterna. ....	95
4.2 Hipótesis nula.....	95
5. Objetivos .....	95
5.1 Objetivo general.....	95
5.2 Objetivos específicos.....	95
6. Metodología .....	96
6.1 Aislados clínicos. ....	96
6.2 Electroforesis en gel por campos pulsados. ....	96
6.3 Concentraciones mínimas inhibitorias. ....	97
6.4 Detección de los genes <i>las/rhl</i> .....	98
6.5 Amplificación del gen <i>aiiM</i> .....	99
6.6 Purificación de AiiM. ....	100
6.7 Actividad de AiiM contra N-acil homoserin lactonas.....	102
6.8 Crecimiento bacteriano con y sin AiiM. ....	102
6.9 Determinación de factores de virulencia. ....	103
6.9.1 Cultivos con y sin AiiM.....	103
6.9.2 Actividad de elastasa.....	104
6.9.3 Actividad de proteasa alcalina .....	104
6.9.4 Piocianina .....	105
6.9.5 HCN .....	105
6.9.6 Curva de dosis-respuesta de AiiM y disminución de su actividad mediante la adición exógena de 3OC12-HSL.....	106
6.9.7 Detección de moléculas aciladas de cadena larga y su inactivación mediante la proteína AiiM. ....	106
6.9.8 Sistema de secreción tipo 3. ....	107
6.9.9 Inactivación de antibióticos $\beta$ -lactámicos antipseudomónicos. ....	108
7. Resultados .....	110
7.2 Concentraciones mínimas inhibitorias y patrones de susceptibilidad. ....	113
7.3 Amplificación de los genes <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> y <i>rhlR</i> . ....	116
7.4 Amplificación del gen <i>aiiM</i> .....	117
7.5 Expresión y purificación de la lactonasa AiiM. ....	118
7.6 AiiM tiene actividad contra diferentes moléculas N-acil homoserin lactonas. ....	120

7.7 Papel de AiiM en la cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> . .....	124
7.8 Inhibición de los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> controlados por el sistema de comunicación bacteria. ....	125
7.8.1 Actividad de elastasa .....	126
7.8.2 Actividad de proteasa alcalina. ....	126
7.8.3 Píocianina. ....	127
7.8.4 HCN. ....	128
7.9 Detección de moléculas acil homoserin lactonas de cadena larga y su inactivación mediante la proteína AiiM. ....	130
7.10 AiiM no inhibe el sistema de secreción tipo III de <i>P. aeruginosa</i> . ....	131
7.11 AiiM no degrada los antibióticos $\beta$ -lactámicos con actividad antipseudomónica. ....	132
8. Discusión.....	135
9. Conclusiones .....	140
10. Perspectivas .....	140
10. Bibliografía .....	142



## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista asociada con infecciones en unidades de cuidado intensivo, neumonías asociadas a ventilador, infecciones del sitio de la cirugía y quemaduras. Esta bacteria tiene una mortalidad del 75% en los pacientes con quemaduras debido a que puede asociarse con infecciones relacionadas con biopelículas, expresión de diversos factores de virulencia y mecanismos de resistencia. Alguno de esos factores de virulencia son proteasas como elastasa y proteasa alcalina o metabolitos tóxicos como como la piocianina, por lo que esta bacteria es de los pocos microorganismos capaces de producir cianuro, lo cual inhibe el sistema de la citocromo oxidasa de las células del hospedero. Estos factores de virulencia son controlados por el sistema de percepción de quórum. En el presente trabajo, fueron estudiadas 30 cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes quemados atendidos en un hospital de tercer nivel de la ciudad de México. Se determinaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos así como factores de virulencia (elastasa, proteasa alcalina, HCN y piocianina) con y sin la enzima N-acilhomoserin lactonasa, AiiM fue capaz de hidrolizar un amplia gama de acil homoserin lactonas. El tratamiento con la enzima redujó significativamente la actividad de la elastasa y proteasa alcalina, la producción de piocianina y HCN en todas las cepas productoras, pero no la secreción de toxinas a través del sistema de secreción tipo III. Nuestro trabajo sugiere que el tratamiento con la enzima AiiM podría ser una terapia efectiva para el combate de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en pacientes quemados.

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic bacterium associated with healthcare infections in intensive care units (ICUs), ventilator-associated pneumonia (VAP), surgical site infections, and burns. This bacterium causes 75% of death in burned patients, since it can develop a persistent biofilm associated with infections, express several virulence factors, and antibiotic-resistance mechanisms. Some of these virulence factors are proteases such as elastase and alkaline protease, or toxic metabolites such as pyocyanin and is one of the few microorganisms able to produce

cyanide, which inhibits the cytochrome oxidase of host cells. These virulence factors are controlled by quorum sensing (QS). In this work, 30 *P. aeruginosa* clinical strains isolated from burned patients from a tertiary hospital in Mexico City were studied. Antibiotic susceptibility tests were done, and virulence factors (elastase, alkaline protease, HCN, and pyocyanin) were determined in presence of an N-acylhomoserine lactonase, AiiM able to hydrolyze a wide range of acyl homoserine lactones. The treatment reduced significantly the activities of elastase and alkaline protease, and the production of pyocyanin and HCN in all producer strains but not the secretion of toxins through the type III secretion system. Our work suggests that AiiM treatment may be an effective therapy to combat *P. aeruginosa* infection in burn patients.

# 1. Introducción.

## 1.1 Quemaduras

Las quemaduras son una de las manifestaciones más severas de trauma ([Church, Elsayed, Reid, Winston, & Lindsay, 2006](#)), en las cuales, además del daño al cuerpo, se asocia a altas tasas de morbi-mortalidad y secuelas psicológicas ([Dalal, Saha, & Agarwal, 2010](#); [Y. Wang et al., 2018](#)), siendo estas últimas las secuelas más frecuentes post quemaduras ([Dalal et al., 2010](#); [Fauerbach et al., 2005](#); [Forjuoh, 2006](#)). Asimismo, constituyen un problema de salud pública mundial ([Forjuoh, 2006](#)). Esta manifestación traumática es costosa debido a los prolongados tiempos de hospitalización, rehabilitación y debido al tratamiento de heridas y escaras, sin tomar en consideración los elevados costos asociados a procesos infecciosos ([Brusselsaers, Monstrey, Vogelaers, Hoste, & Blot, 2010](#)).

Por su naturaleza etiológica, las quemaduras pueden clasificarse por: calor (flama directa y escaldadura), frío, electricidad (alto voltaje (> 1000 v) o bajo voltaje (< 1000 v)), químicas, radiación o fricción ([Aghakhani, Heidari, Tabatabaee, & Abdolkarimi, 2015](#); [Evers, Bhavsar, & Mailander, 2010](#)).

A pesar de que cada vez se cuentan con mayores adelantos médicos, la mortalidad es elevada, algunos autores reportan 5,000 decesos por cada 100,000 casos, los cuales están asociados a complicaciones ([Church et al., 2006](#)), de tal manera que la sepsis es la principal causa de mortalidad en pacientes resucitados después de un daño térmico mayor, de aquí que las complicaciones por infecciones son las responsables del 75% de las muertes en pacientes con quemaduras complicadas ([Atiyeh B.S., 2001](#); [Church et al., 2006](#)).

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, en adultos, la superficie de la piel es de aproximadamente 1.5 a 2 m<sup>2</sup> y puede alcanzar un peso 6 a 10 kg (adultos hombres), mientras que un recién nacido es de 0.2 a 0.3 m<sup>2</sup> ([Church et al., 2006](#)), por lo que la piel intacta y en condiciones saludables es vital para la preservación de la homeostasis de los fluidos corporales, termorregulación y la protección del

hospedero contra infecciones, asimismo, posee funciones inmunológicas, neurosensoriales y metabólicas como el metabolismo de la vitamina D ([Atiyeh B.S., 2001](#); [Church et al., 2006](#); [Evers et al., 2010](#)). El daño ocasionado por las quemaduras genera una brecha en la continuidad de las barreras generando las condiciones para la introducción de microorganismos circundantes, ya sea de la microbiota de la piel o microorganismos que hayan sido inoculados por el contacto del lecho de la herida con alguna superficie, ejemplo: suelo ([Church et al., 2006](#); [DeBoer & O'Connor, 2004](#); [Evers et al., 2010](#); [Eyerich, Eyerich, Traidl-Hoffmann, & Biedermann, 2018](#)).

Las quemaduras que exceden el 30% de la superficie corporal total (SCT) derivan en una hipovolemia considerable, junto a ello, viene la liberación de mediadores inflamatorios, lo que desencadenará un efecto sistémico, es decir, una disfunción cardiovascular distintiva definida como choque de quemadura ([Kaddoura, Abu-Sittah, Ibrahim, Karamanoukian, & Papazian, 2017](#)).

## 1.2 Epidemiología de las quemaduras.

La estadística epidemiológica de Estados Unidos, emitida por la Asociación Americana de Quemaduras (ABA por sus siglas en inglés), reporta que, en el 2016, 486,000 personas con quemaduras recibieron tratamiento médico, de las cuales 40,000 necesitaron hospitalización. La causa principal de quemaduras fue por fuego directo (43%), seguido por escaldadura (34%), contacto (9%), eléctrico (4%), química (3%) y otras (7%) ([ABA, 2016](#)). Por otro lado, en México, la Dirección General de Epidemiología, reportó en 2018, 110,341 casos nuevos de quemaduras (Tabla 1) en nuestro país como datos crudos ([DGE, 2018b](#)), de los cuales 53,468 casos correspondieron al género femenino (Tabla 2) ([DGE, 2018a](#)) y 56,873 al masculino (Tabla 3) ([DGE, 2018c](#)). Los grupos etarios con mayor número de casos fueron los que pertenecen a la población económicamente activa de 25-44 años con 38,691 casos, 20-24 años con 12,892 casos y en tercer lugar la población infantil de 1-4 años con 8,846 casos ([DGE, 2018d](#)). La entidad federativa con el mayor número de reportes de quemaduras al sistema de salud federal fue la Ciudad de México con

10,478 casos, seguido por el estado de México con 9,841, Jalisco con 8,991 y Nuevo León con 8,113 ([SINAVE, 2018](#)), asimismo, la entidad de salud que atendió a la mayor cantidad de pacientes quemados fue el Instituto Mexicano del Seguro Social con 69,106 y en segundo lugar las instancias que pertenecen a la Secretaría de Salud con 21,110 pacientes ([DGE, 2018b](#)). A pesar de contar con esta información epidemiológica nacional, no contamos con el número de decesos atribuibles a las quemaduras, superficie corporal quemada, clasificación etiológica de la quemadura, complicaciones, internamientos o gastos, por lo que dicha área constituye un blanco fértil para la realización de estudios que proporcionen dicha información al menos de forma particular en cada centro de atención.

### 1.3 Respuesta Inmune en las quemaduras.

La inflamación local, subsecuente a la quemadura, es indispensable para la reparación del área dañada, pero también como defensa contra agentes infecciosos. Sin embargo, una quemadura con una magnitud considerable (a partir de segundo grado) es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria sistémica que puede desencadenar en síndrome de inflamación sistémica ([Atiyeh B.S., 2001](#); [Church et al., 2006](#); [Evers et al., 2010](#)). Inicialmente la respuesta inmune de una quemadura severa es proinflamatoria, sin embargo, conforme pasa el tiempo se convierte predominantemente en anti inflamatoria, esto como un esfuerzo natural en seguir manteniendo la homeostasis corporal en un intento de mantener el estado fisiológico natural ([Church et al., 2006](#)).

Entre los factores que intervienen en el proceso inflamatorio están: Interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), citocinas proinflamatorias producidas por una amplia variedad de células, entre ellas los leucocitos. Estas citocinas son responsables de la producción de fiebre, proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, proteína A sérica del amiloide, fibrinógeno, haptoglobina, factores del complemento, entre otras) y un estado general del catabolismo. Asimismo, también regulan al incremento de la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), IL-6 y factor activador de plaquetas (PAF por sus siglas en inglés) por células endoteliales y

macrófagos ([Chaudry & Ayala, 1993](#); [Weissman, 1990](#)). IL-6 aumenta los niveles, en etapas posteriores a la quemadura a través de su producción por diferentes tipos de células, al igual que IL-1 y TNF- $\alpha$ , IL-6 induce fiebre y reactantes de fase aguda, esta actividad permite la activación de células T ([Church et al., 2006](#); [Xing et al., 1998](#)). Los picos en los niveles de IL-6 se mantienen durante una semana y los altos niveles de dicha citocina se asocian con tasas incrementadas de morbi-mortalidad ([Guo et al., 1990](#); [Xing et al., 1998](#)), otra citocina proinflamatoria relevante es el interferón gama (IFN- $\gamma$ ), la cual es producida por las células NK (*natural killer*) y células Th-1, ambas inducidas por algún daño importante. El IFN- $\gamma$  tiene un papel importante en la activación de los macrófagos y en la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> en células Th-1 pero inhibiendo la diferenciación a Th-2, por lo tanto, los tipos celulares que son importantes en la facilitación de la respuesta proinflamatoria a daño son los macrófagos proinflamatorios y las células CD4<sup>+</sup> cooperadoras ([Gosain & Gamelli, 2005](#)). Posterior a la quemadura, la producción y liberación de monocitos/macrófagos disminuye, bajo estas circunstancias los macrófagos comienzan a producir concentraciones elevadas de PGE2 y por otro lado disminuyen las concentraciones de IL-12, las cuales tienen una relación cooperativa con las células T diferenciadas ([Church et al., 2006](#); [Fear et al., 2017](#); [Gamelli, He, & Liu, 1994](#); [Goebel et al., 2000](#); [Strudwick & Cowin, 2018](#)), sin embargo, la secuencia exacta de los eventos es aún desconocida.

#### 1.4 Microbiología de las quemaduras.

La continuidad de las barreras constituye la primera línea de defensa contra procesos infecciosos, por lo que, pacientes con quemaduras severas son un blanco potencial para el infecciones y sepsis. Durante la fase aguda posterior a la quemadura, existe un incremento en el riesgo de estas y el número de muertes provocadas por sepsis aumenta ([Fear et al., 2017](#); [Sharma, 2007](#); [Tran et al., 2012](#)).

**Distribución de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad**  
**Estados Unidos Mexicanos 2018**  
**Población General**

Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a, Revisión	Total	Incidencia*	Grupos de edad											Ign.
				< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64	65 y +	
Quemaduras	T20-T32	110 341	88.04	953	8 846	5 559	5 139	7 375	12 892	38 691	8 629	11 844	3 834	6 536	43
Rabia humana	A82	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rubéola	B06	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sarampión	B05	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shigelosis	A03	3 171	2.53	174	534	417	289	281	277	553	205	228	72	124	17
Sífilis adquirida <sup>o</sup>	A51-A53	5 809	4.72	N.A.	3	7	23	614	1 316	2 982	344	343	92	76	9
Sífilis congénita**	A50	252	11.61	251	1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Síndrome coqueluchoide	U99	1 654	1.32	1 214	270	55	22	10	13	43	8	14	1	4	0
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	B20-B24	6 173	4.93	23	11	12	5	193	846	3 891	494	527	98	72	1
Síndrome de rubéola congénita**	P35.0	0	0.00	0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Síndrome Meningeo	G00-G03 excepto G00.0, G00.1	650	0.52	102	69	44	41	45	44	154	31	62	27	31	0
Teniasis	B68	160	0.13	0	25	29	23	18	18	19	11	8	0	9	0
Tétanos	A34, A35	23	0.02	0	2	1	1	1	0	5	0	3	4	6	0
Tétanos neonatal**	A33	0	0.00	0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Tifo epidémico	A75.0	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tifo murino	A75.2	124	0.10	0	4	9	10	11	9	45	11	11	8	6	0
Tos ferina	A37	783	0.62	611	81	15	6	11	14	24	9	6	3	3	0
Toxoplasmosis	B58	147	0.12	8	2	1	3	6	16	64	15	16	8	8	0
Tracoma	A71	2	0.00	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tricomoniasis urogenital <sup>o</sup>	A59.0	43 204	41.83	N.A.	N.A.	N.A.	253	3 227	7 979	21 519	5 366	3 377	935	543	5
Tripanosomiasis americana aguda (Enfermedad de Chagas)	B57.0-B57.1	123	0.10	0	0	1	0	4	7	60	16	27	4	4	0
Tripanosomiasis americana crónica (Enfermedad de Chagas)	B57.2-B57.5	814	0.65	0	4	7	11	24	48	418	95	124	36	47	0
Triquinosis	B75	8	0.01	1	1	0	0	1	0	1	1	3	0	0	0
Tuberculosis otras formas	A17.1, A17.8, A17.9, A18-A19	4 115	3.28	28	83	84	96	235	416	1 626	297	531	215	504	0
Tuberculosis respiratoria	A15-A16	17 558	14.01	66	98	76	180	900	1 549	5 902	1 650	3 117	1 231	2 789	0
Tumor maligno de la mama <sup>o</sup>	C50	13 584	13.15	N.A.	N.A.	N.A.	19	50	111	2 681	2 089	3 749	1 958	2 919	8
Tumor maligno del cuello del útero <sup>o</sup>	C53	3 312	6.23	N.A.	N.A.	N.A.	1	15	65	1 228	445	663	326	566	3
Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29	1 448 429	1,155.71	1 910	5 740	26 607	76 282	117 636	156 158	436 509	167 334	205 264	102 312	151 294	1 383
Varicela	B01	130 396	104.04	6 811	35 904	42 303	15 850	7 254	7 398	12 616	1 052	695	205	294	14
Violencia intrafamiliar	Y07.0-Y07.2	83 422	66.56	50	431	1 217	3 976	13 923	12 388	35 788	6 336	5 899	1 577	1 827	10
Vulvovaginitis <sup>o</sup>	N76	659 569	1,031.24	2 141	1 968	4 521	10 473	60 499	114 715	298 305	72 209	60 478	18 902	14 981	377
<b>TOTAL</b>		<b>44 614 997</b>		<b>2 064 871</b>	<b>5 709 654</b>	<b>4 577 347</b>	<b>3 186 807</b>	<b>2 879 800</b>	<b>3 439 556</b>	<b>9 754 963</b>	<b>3 154 157</b>	<b>4 337 548</b>	<b>2 069 011</b>	<b>3 410 118</b>	<b>31 165</b>

FUENTE: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2018

\*\* Tasa por 100 000 habitantes menores de un año

<sup>o</sup> Tasa por 100 000 habitantes mayores de 10 años

<sup>o</sup> Tasa por 100 000 habitantes mayores de un año

<sup>o</sup> Tasa por 100 000 habitantes femeninas mayores de 10 años

N.A. = No aplica para este grupo de edad

NOTA: Las tasas se calculan con Proyecciones de la Población de México 1990-2030. Censo 2010. CONAPO

Tabla 1. Distribución de casos nuevos de enfermedad por grupo etario (DGE, 2018d).

**Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación  
Estados Unidos Mexicanos 2018  
Población Femenina**

Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Total	Fuente de notificación								
			Salud	IMSS-Ord	ISSSTE	IMSS-Op	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	Otras
Quemaduras	T20-T32	53 468	9 927	33 056	1 645	1 292	255	724	233	75	6 261
Rabia humana	A82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rubéola	B06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sarampión	B05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shigelosis	A03	1 729	902	93	50	78	41	0	3	0	562
Sífilis adquirida	A51-A53	2 223	1 696	337	20	34	0	2	9	1	124
Sífilis congénita	A50	121	97	13	0	0	0	0	0	0	11
Síndrome coqueluchoide	U99	758	478	215	6	11	6	1	0	1	40
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	B20-B24	932	780	115	20	6	0	1	1	0	9
Síndrome de rubéola congénita	P35.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Síndrome Meningeo	G00-G03 excepto G00.0, G00.1	281	164	90	5	0	6	0	0	0	16
Teniasis	B68	82	40	14	2	8	0	0	1	0	17
Tétanos	A34, A35	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tétanos neonatal	A33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tifo epidémico	A75.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tifo murino	A75.2	65	54	7	1	2	0	0	0	0	1
Tos ferina	A37	419	295	81	2	5	2	1	0	0	33
Toxoplasmosis	B58	99	37	36	6	1	0	2	3	1	13
Tracoma	A71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tricomoniasis urogenital	A59.0	41 376	16 819	2 826	1 843	15 078	343	5	23	10	4 429
Tripanosomiasis americana aguda (Enfermedad de Chagas)	B57.0-B57.1	55	30	9	3	13	0	0	0	0	0
Tripanosomiasis americana crónica (Enfermedad de Chagas)	B57.2-B57.5	259	197	38	5	16	0	0	2	0	1
Triquinosis	B75	4	3	0	0	0	0	0	0	0	1
Tuberculosis otras formas	A17.1, A17.8, A17.9, A18-A19	1 787	805	663	144	40	0	7	5	3	120
Tuberculosis respiratoria	A15-A16	6 421	3 610	2 005	254	286	0	40	33	23	170
Tumor maligno de la mama	C50	13 428	3 492	4 845	2 420	44	147	213	336	17	1 914
Tumor maligno del cuello del útero	C53	3 312	1 339	1 243	315	25	2	23	91	12	262
Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29	907 112	319 096	224 143	79 305	55 807	6 950	3 337	4 209	1 968	212 297
Varicela	B01	62 655	17 225	28 562	4 041	1 662	556	402	283	176	9 748
Violencia intrafamiliar	Y07.0-Y07.2	77 994	76 550	21	71	196	127	9	48	5	967
Vulvovaginitis	N76	659 569	293 193	108 866	36 210	96 762	1 454	3 617	3 407	1 324	114 736
<b>TOTAL</b>		<b>26 342 160</b>	<b>7 953 468</b>	<b>8 458 534</b>	<b>1 736 668</b>	<b>1 462 231</b>	<b>221 732</b>	<b>226 967</b>	<b>133 885</b>	<b>51 243</b>	<b>6 097 432</b>

FUENTE: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2018

Tabla 2. Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación. Población femenina (DGE, 2018b)



**Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación  
Estados Unidos Mexicanos 2018  
Población Masculina**

Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Total	Fuente de notificación									
			Salud	IMSS-Ord	ISSSTE	IMSS-Op	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	Otras	
Quemaduras	T20-T32	56 873	11 183	36 050	1 171	1 275	215	610	213	67	6 089	
Rabia humana	A82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Rubéola	B06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sarampión	B05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Shigelosis	A03	1 442	748	67	42	46	26	0	4	1	508	
Sífilis adquirida	A51-A53	3 586	2 513	705	64	21	0	5	10	0	268	
Sífilis congénita	A50	131	102	15	0	1	0	0	2	0	11	
Síndrome coqueluchoide	U99	896	574	228	15	10	9	1	0	0	59	
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	B20-B24	5 241	4 177	839	135	27	0	9	1	1	52	
Síndrome de rubéola congénita	P35.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Síndrome Meningeo	G00-G03 excepto G00.0, G00.1	369	210	120	4	0	8	0	2	0	25	
Teniasis	B68	78	29	12	1	7	0	0	1	0	28	
Tétanos	A34, A35	21	20	1	0	0	0	0	0	0	0	
Tétanos neonatal	A33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tifo epidémico	A75.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tifo murino	A75.2	59	39	11	6	0	0	0	0	0	3	
Tos ferina	A37	364	254	82	5	5	1	1	0	0	16	
Toxoplasmosis	B58	48	28	11	3	0	0	0	4	0	2	
Tracoma	A71	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tricomoniasis urogenital	A59.0	1 828	751	146	65	152	6	1	1	0	706	
Tripanosomiasis americana aguda (Enfermedad de Chagas)	B57.0-B57.1	68	44	18	1	3	0	0	0	0	2	
Tripanosomiasis americana crónica (Enfermedad de Chagas)	B57.2-B57.5	555	405	107	12	21	0	0	1	2	7	
Triquinosis	B75	4	3	0	0	0	0	0	0	0	1	
Tuberculosis otras formas	A17.1, A17.8, A17.9, A18-A19	2 328	1 184	814	119	47	0	6	6	4	148	
Tuberculosis respiratoria	A15-A16	11 137	6 959	2 974	339	420	0	47	38	22	338	
Tumor maligno de la mama	C50	156	37	9	52	0	0	3	8	0	47	
Úlceras, gastritis y duodenitis	K25-K29	541 317	164 309	127 475	50 655	28 346	4 315	2 146	3 080	1 199	159 792	
Varicela	B01	67 741	17 025	34 172	3 928	1 472	512	520	325	210	9 577	
Violencia intrafamiliar	Y07.0-Y07.2	5 428	4 976	7	20	35	84	0	9	1	296	
<b>TOTAL</b>		<b>18 272 837</b>	<b>5 019 683</b>	<b>5 709 998</b>	<b>1 142 842</b>	<b>823 743</b>	<b>177 305</b>	<b>168 798</b>	<b>106 131</b>	<b>41 732</b>	<b>5 082 605</b>	


FUENTE: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2018

Tabla 3. Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación. Población masculina (DGE, 2018c).

Una vez que se ha producido la quemadura, el área lesionada permanece estéril y es un nicho idóneo para la colonización y proliferación de microorganismos por ser rico en proteínas y ser avascular (carecer de perfusión sanguínea como consecuencia de la quemadura) ([Barret & Herndon, 2003](#); [Church et al., 2006](#); [Erol, Altoparlak, Akcay, Celebi, & Parlak, 2004](#); [Fear et al., 2017](#); [Manson, Klasen, Sauer, & Olieman, 1992](#); [Manson, Pernot, Fidler, Sauer, & Klasen, 1992](#)). Los primeros microorganismos en colonizar son los propios de la microbiota, principalmente los Gram positivos, siendo el género *Staphylococcus* el que se encuentra mayormente distribuido por toda la piel de los humanos. Otro coco Gram positivo que coloniza casi de inmediato son los pertenecientes al género *Enterococcus*. Estas primeras colonizaciones por estos géneros de Gram positivos ocurre dentro de las primeras 48 h posteriores a la quemadura (Tabla 4) ([Church et al., 2006](#); [Erol et al., 2004](#)). Posterior a ello, los siguientes microorganismos en comenzar a colonizar son los Gram negativos, los cuales comienzan a aparecer después de cinco a siete días. Los principales agentes son aquellos que han causado severos problemas de salud pública, es decir, los reyes nosocomiales como lo son *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Acinetobacter baumannii*, la distribución del resto de microorganismos Gram negativos dependerá en gran medida de la microbiota propia de cada institución de salud, pero los *Enterobacterales* ocupan el tercer puesto, pues por distribución y frecuencia son ellas las que también colonizan y ulteriormente ocasionan problemas infecciosos. La literatura es variada en cuanto a la distribución de *Enterobacterales* pero podemos mencionar principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* y *Enterobacter* spp., principalmente ([Church et al., 2006](#); [Erol et al., 2004](#); [Hidalgo, Mas, Rubio, & Garcia-Hierro, 2016](#)). Cabe mencionar que las primeras colonizaciones se deben, principalmente, a traslocaciones, es decir, a bacterias propias del hospedero, principalmente aquellas del tracto respiratorio, o intestinal ([Hidalgo et al., 2016](#)). De igual forma, la microbiota puede ir cambiando de la propia del paciente a la propia del hospital ([Erol et al., 2004](#)). Este punto resulta interesante porque comienzan a aparecer microorganismos con mecanismos de resistencia que resultan preocupantes. Algunos estudios han documentado la aparición de microorganismos

multidrogorresistentes como colonizantes y conforme pasa el tiempo pueden asociarse a procesos infecciosos ([Pirii et al., 2018](#); [R. Sheridan et al., 2018](#)). Entre las bacterias multidrogorresistentes se pueden mencionar a *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *Stenotrophomonas maltophilia* ([R. Sheridan et al., 2018](#)). Pirii y colaboradores encontraron aislados productores de carbapenemasas en pacientes quemados. La mayor cantidad de carbapenemasas fueron encontradas en *Enterobacterales* como *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Providencia stuartii* y en Gram negativos no fermentadores como *A. baumannii*. Las carbapenemasas de la familia OXA fueron las más frecuentemente encontradas (OXA-48), mientras que en *Providencia stuartii* encontraron metalo-β-lactamasas pertenecientes a la familia NDM. Estos microorganismos estaban distribuidos por todo el cuerpo de los pacientes, desde la garganta, tracto genitourinario, perineo, nariz, espalda, ingle, oídos y ojos ([Pirii et al., 2018](#)).

Conforme pasa el tiempo de hospitalización, además de los bacilos Gram negativos, otros microorganismos comienzan a aparecer como colonizantes y después como potenciales patógenos. El siguiente grupo es el de los hongos, este grupo puede estar integrado por miembros del género *Candida*, siendo *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* las tres especies más frecuentes (Tabla 4) ([Capoor, Sarabahi, Tiwari, & Narayanan, 2010](#); [L. E. Lopez-Jacome et al., 2019](#); [Renau Escrig et al., 2016](#); [Struck & Gille, 2013](#)).



≤ 48 h		> 48 h	
Gram positivos	Gram negativos	Hongos	Virus
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Candida spp.</i>	Herpes simplex
• <b>Meticilino resistente</b>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Aspergillus spp</i>	Citomegalovirus
• <b>Meticilino susceptible.</b>	<i>E. coli</i>	<i>Fusarium spp</i>	Varicela zoster
<b><i>Staphylococcus coagulasa</i></b>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Alternaria spp.</i>	
<b>negativo</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Rhizopus spp</i>	
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Mucor spp</i>	
• <b>Vancomicina resistente</b>	<i>Proteus spp.</i>		
	<i>Bacteroides spp</i>		

Tabla 4. Distribución de colonización por microorganismos posterior a la quemadura ([Agnihotri, Gupta, & Joshi, 2004](#); [Becker et al., 1991](#); [Church et al., 2006](#); [Hidalgo et al., 2016](#); [L. E. Lopez-Jacome et al., 2019](#); [R. L. Sheridan et al., 2000](#); [Sobouti, Momeni, Masalegooyan, Ansari, & Rahbar, 2018](#)).

Por otro lado, el grupo de hongos filamentosos también puede aparecer, los principales agentes son: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Mucor* spp. ([Capoor et al., 2010](#); [Church et al., 2006](#); [L. E. Lopez-Jacome et al., 2019](#)). Los virus son el último grupo en aparecer conforme pasa el tiempo de hospitalización. Citomegalovirus y herpes simplex son los principales agentes etiológicos de este rubro ([Osawa & Singh, 2009](#); [R. L. Sheridan et al., 2000](#); [Sobouti et al., 2018](#)).

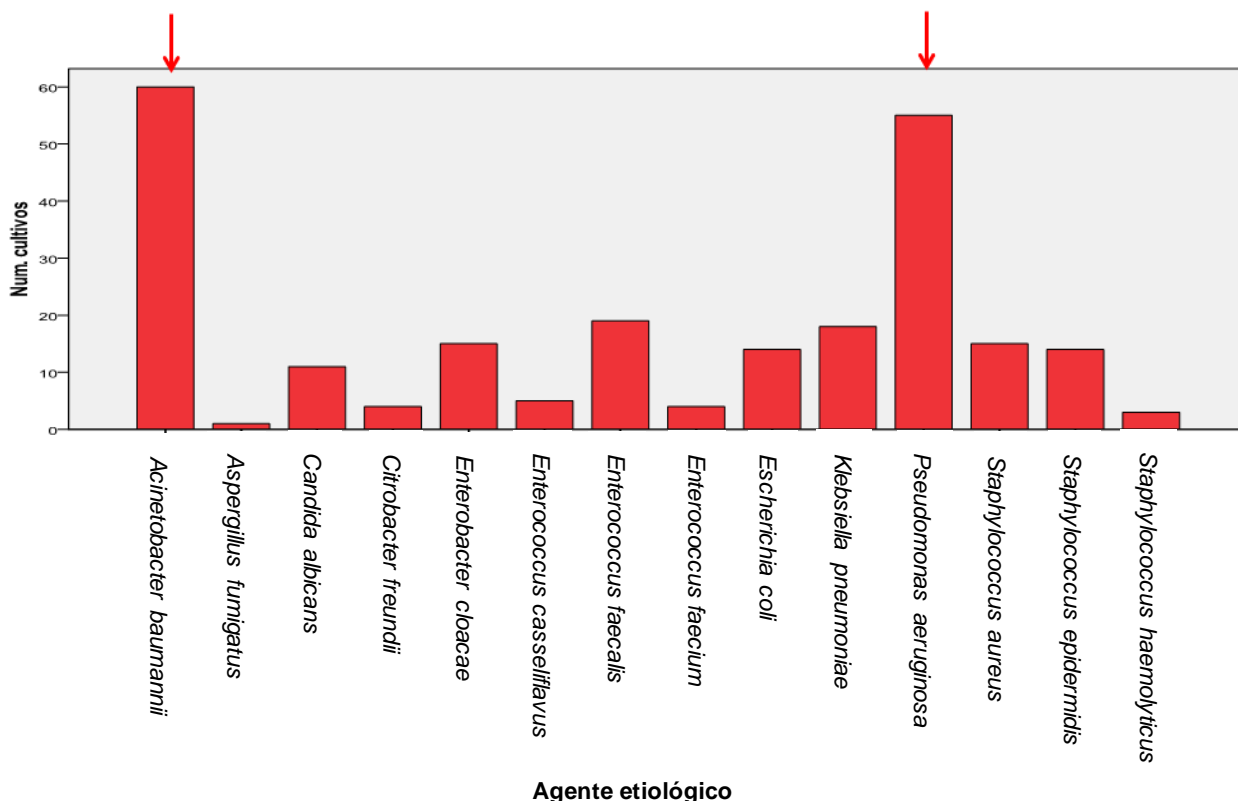
### 1.5 Infecciones en pacientes quemados

Como ya se mencionó anteriormente, la quemadura *per se* en los pacientes altera el estado inmunológico y al perderse la continuidad de las barreras, como la piel, las cuales constituyen la primera línea de defensa contra agentes patógenos o patógenos oportunistas, se proporcionan todas las condiciones idóneas para la colonización y posteriormente la constitución de un proceso infeccioso. La distribución de los agentes etiológicos en gran parte está conferida por el tiempo de hospitalización, la traslocación de microorganismos del hospedero y sobre todo la microbiota propia de cada hospital. Sin embargo, existen ciertos microorganismos que sobresalen en cuanto a la parte del hospital, y es que diferentes artículos y reportes epidemiológicos apuntan a dos microorganismos principales: *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* del complejo *calcoaceticus-baumannii*, este último, si bien es complicada su identificación a nivel de especie, debido a que comparten características bioquímicas muy similares dentro de los miembros del complejo (*Acinetobacter baumannii sensu stricto*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter seifferti* y *Acinetobacter lactuca*) es *Acinetobacter baumannii sensu stricto* la especie más frecuentemente relacionada a procesos infecciosos en general ([Toh et al., 2015](#); [Ugolotti, Marco, Bandettini, Tripodi, & Biassoni, 2016](#); [Villalon et al., 2019](#)).

En un estudio epidemiológico realizado en nuestra institución, tomando como referencia a pacientes que sufrieron quemaduras eléctricas, encontramos que los Gram negativos eran el grupo con mayor asociación a procesos infecciosos. El 59.1% de las infecciones en este grupo de pacientes estuvieron asociadas a Gram

negativos, 35.1 % a Gram positivos, 4.9% a hongos (filamentosos y levaduriformes) y por último el 0.8% a bacterias anaerobias estrictas. Del 59.1% de los bacilos Gram negativos, *P. aeruginosa* ocupaba una tasa de infecciones más alta, con 25.7%, seguida de *A. baumannii sensu stricto* con 23.5% y eran seguidos por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter del complejo cloacae*, *Citrobacter freundii*, entre otros ([L. E. Lopez-Jacome et al., 2019](#)). Asimismo, la Unidad de Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra reportó para el periodo 2011-2016 que ambas bacterias eran las principales asociadas a infecciones en pacientes atendidos en el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) (dato no publicado, gráfico 1).

## Principales agentes etiológicos (CENIAQ)



**Agente etiológico**

Unidad de vigilancia epidemiológica del Instituto Nacional de

Gráfico 1. Principales agentes etiológicos en pacientes atendidos en el CENIAQ del 2011-2016. Información remitida por la Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria del INRLGII.

## 1.6 *Pseudomonas aeruginosa*.

*P. aeruginosa* pertenece al filo Proteobacteria, clase  $\gamma$ -proteobacteria, orden Pseudomonadales y a la familia *Pseudomonadaceae* ([Taxonomy, 2020](#)). De acuerdo a la página de taxonomía del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, perteneciente a los institutos nacionales de salud de EE.UU) *P. aeruginosa* se encuentra dentro del grupo *aeruginosa*, dicho grupo está integrado por las siguientes especies: *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. caeni*, *P. citronellolis*, *P. flavecens*, *P. jijuensis*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*/grupo *multiresinivorans*, *P. oleovorans*/ grupo *pseudoalcaligenes*, *P. cf. pseudoalcaligenes*, *P. resinovorans* y *P. straminea* ([Taxonomy, 2020](#)).

El género *Pseudomonas* fue descrito a finales del siglo XIX, en 1894 por Migula ([Garrity, Bell, & Lilburn, 2015](#)). Y la especie *aeruginosa* fue descrita en 1872 por Schroeter, nombrada inicialmente como *Bacterium aeruginosum*, en 1900, Migula lo reasigna como *P. aeruginosa* ([Palleroni, 2015](#); [Peix, Ramirez-Bahena, & Velazquez, 2018](#)). Etimológicamente *Pseudomonas* significa falsa unidad y *aeruginosa* hace referencia al cardenillo por el color azul verdoso derivado de compuestos cúpricos. Son bacilos Gram negativos, lactosa negativo, indol negativo y oxidasa positivo. A la morfología microscópica se observan bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos de 0.5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.5-5  $\mu\text{m}$  de largo. Son bacilos móviles debido a uno o varios flagelos polares. En cuanto a la morfología macroscópica son colonias de bordes irregulares ligeramente convexas de 1-3 mm de diámetro. Se pueden observar mucosas o de aspecto mantecilloso. Se puede llegar a observar iridiscencia, un característico brillo metálico asociado a la autólisis ([Palleroni, 2015](#)). Es una especie definida como aerobia estricta debido a que el oxígeno participa como aceptor de electrones, sin embargo, en algunos casos el nitrato puede ser utilizado como un aceptor alternativo de electrones por lo que con esa característica puede crecer en ambientes anaerobios ([Blondel-Hill Edith, 2007](#); [Palleroni, 2015](#)). Asimismo, puede ser recuperada fácilmente en una amplia variedad de medios de cultivo debido a su flexibilidad metabólica. Crece bien a 37°C, sin embargo, puede sobrevivir y proliferar en un amplio rango de temperaturas, desde 4°C hasta 42°C, esta última temperatura puede ser usada

como marcador de identificación, debido a que *P. aeruginosa* es la única que posee la capacidad de crecer a esa temperatura ([Blondel-Hill Edith, 2007](#); [LaBauve & Wargo, 2012](#)).

*P. aeruginosa* es una bacteria ubicua con una diversidad metabólica diversa, dicha cualidad le confiere la capacidad de poder estar presente en una amplia gama de ambientes, adecuando los diversos nichos biológicos para su propio beneficio. Esta flexibilidad permite que *P. aeruginosa* sea un exitoso patógeno oportunista, tiene la habilidad de infectar plantas ([Schroth, Cho, Green, Kominos, & Microbiology Society, 2018](#)), insectos ([Jander, Rahme, & Ausubel, 2000](#)), nemátodos ([Mahajan-Miklos, Tan, Rahme, & Ausubel, 1999](#)), peces ([Thomas et al., 2014](#)) y mamíferos, hombre incluido ([Haenni et al., 2017](#); [Micek et al., 2005](#)).

En humanos, *P. aeruginosa*, es uno de los mayores patógenos oportunistas, la cual está asociada a un gran número de infecciones, tanto comunitarias como hospitalarias. Es en este último rubro donde tiene una gran importancia a nivel mundial. Se han documentado infecciones relacionadas a los cuidados en la salud en unidades de cuidado intensivo, neumonías asociadas a ventiladores, bacteriemias asociadas a líneas centrales, infección de sitios quirúrgicos, quemaduras, infecciones de tracto urinario, otitis media y queratitis. Quizá la población en la cual se han desarrollado un mayor número de estudios es en pacientes con fibrosis quística ([Cohen et al., 2017](#); [Chatterjee et al., 2016](#); [Fournier et al., 2016](#); [Olivares et al., 2016](#)).

### 1.7 Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

El genoma completo de esta bacteria oportunista fue secuenciado y publicado en el 2000 ([Stover et al., 2000](#)). La cepa tipo, PAO1 secuenciada posee un genoma de 6.3 Mpb (mega pares de bases). La complejidad genética de *P. aeruginosa* se acerca bastante a la de uno de los eucariotas simples como *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo genoma codifica para 6,200 proteínas aproximadamente ([Ball et al., 2000](#); [Stover et al., 2000](#)). Por otro lado, su genoma es de mayor tamaño en

comparación con algunas bacterias como por ejemplo *Bacillus subtilis* con 4.2 Mpb, *Escherichia coli* con 4.6 Mpb y *Mycobacterium tuberculosis* con 4.4 Mpb, en la tabla 5 se enlista el desglose de categorías de clústeres genéticos ([Blattner et al., 1997](#); [Cole et al., 1998](#); [Kunst et al., 1997](#); [Stover et al., 2000](#)). Tiene una cantidad de 5,688 genes anotados, 63 tRNA, 12 rRNA y 43 ncRNA.

Característica	Total	Característica	Total
Predicción de función general	709	Transporte de aminoácidos y metabolismo	558
Función desconocida	548	Transcripción	526
Mecanismo de señales de transducción	455	Producción de energía y conversión	366
Transporte de iones inorgánicos y metabolismo	352	Biogénesis de pared celular/membrana y envoltura	282
Transporte de lípidos y metabolismo	270	Transporte de carbohidratos y metabolismo	261
Transporte de coenzimas y metabolismo	218	Traducción, biogénesis y estructura ribosomal	207
Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	206	Modificación postraduccional, regeneración de proteínas, chaperonas	201
Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular.	182	Replicación, recombinación y reparación	160
Movilidad celular	160	Transporte de nucleótidos y metabolismo	107
Mecanismos de defensa	74	Control del ciclo celular, división celular y partición cromosómica	39
Estructura de la cromatina y dinámica	3	Procesamiento del RNA y modificación	2

Tabla 5. Desglose por categoría de grupos de clústeres ortólogos ([Winsor et al., 2016](#)).



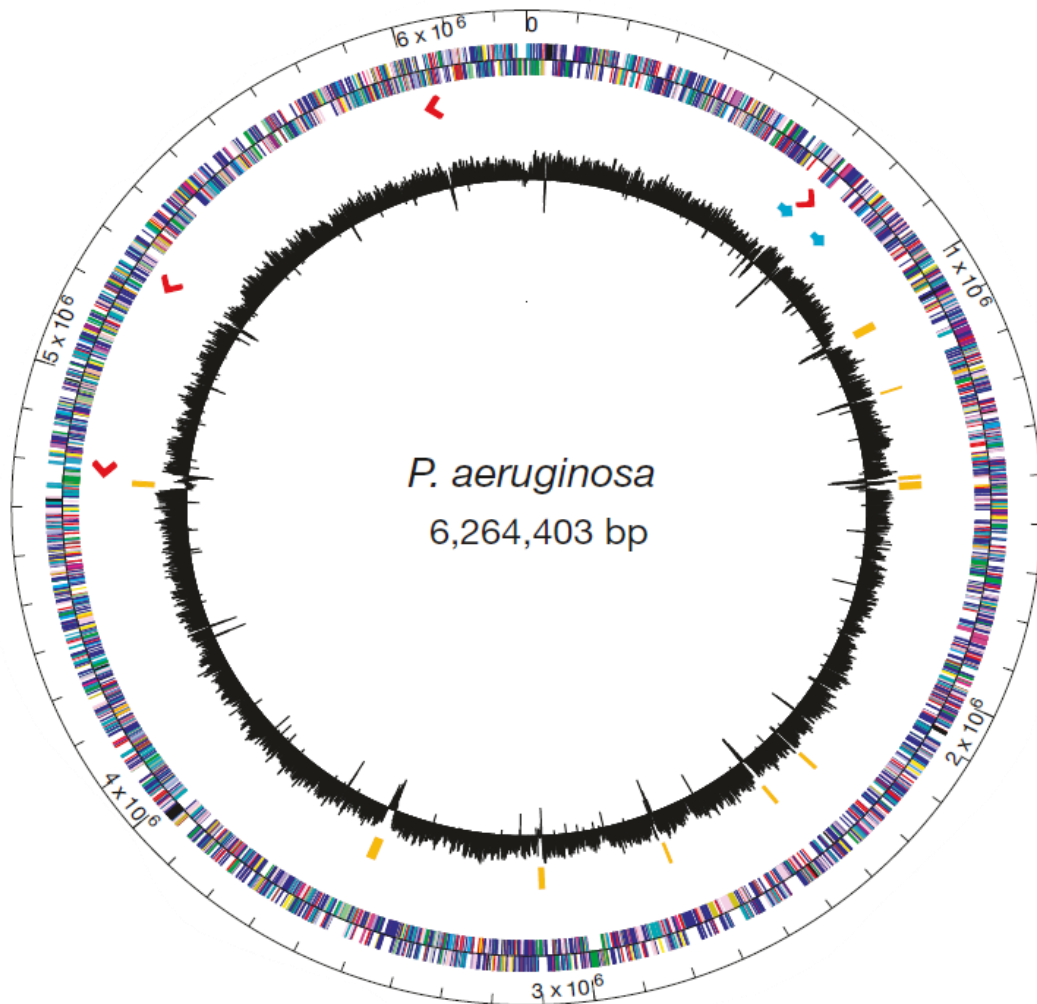


Imagen 1. Representación circular del genoma de *P. aeruginosa* PAO1. El círculo más externo indica la localización cromosómica en pares de bases (cada línea son 100 Kb. La distribución de los genes se representa mediante los cuadros de colores de acuerdo a la categoría funcional y la dirección de la transcripción (la banda externa corresponde la hebra positiva, la banda interna corresponde a la hebra menos). Las flechas rojas representan la localización y dirección de la transcripción de los genes del rRNA, las flechas azules muestran la localización de dos regiones que contienen probables bacteriófagos. El círculo negro en el centro es el porcentaje G+C representado como el promedio no sobrelapado que cubre una región de 1 Kb de una hebra entera del genoma de *P. aeruginosa*. Las barras amarillas representan regiones  $\geq 3$  Kb con contenido G+C de dos desviaciones estándar ( $< 58.8\%$ ) debajo de la media ( $66.6\%$ ).

*P. aeruginosa*, como ya se mencionó previamente, posee una flexibilidad metabólica que le confiere una capacidad de supervivencia elevada, aunada a ello, posee un amplio arsenal de factores de virulencia, que le confieren, aún más, la capacidad de subsistir en determinados nichos y perdurar.

En la Tabla 6 se muestran algunos de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* y los efectos ocasionados en el hospedero.

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Mecanismo de virulencia</b>	<b>Efecto patógeno en el hospedero</b>
<b>Lipopolisacárido</b>	Estimulación de la producción de citocinas	Choque
<b>Flagelo</b>	Adhesión a las mucosas Movilidad: rol de internalización	Difusión bacteriana
<b>Alginato</b>	Provoca fenotipo mucoso Adhesión a las células traqueales. Inhibición de la fagocitosis. Inhibición del efecto de los antibióticos y la respuesta inmunitaria.	Patogenicidad respiratoria. Resistencia a las defensas del hospedero (fagocitosis) y de los antibióticos. Responsable del aspecto mucoso de las cepas.
<b>Exotoxina A</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas de las células.	Muerte celular, necrosis tisular. Rol importante en la virulencia
<b>Exotoxina S</b>	Efecto citotóxico Proliferación y apoptosis de Linfocitos T.	Resistencia a las defensas del hospedero. Daña el glucopéptido, vimentina. Degrada IgG e IgA
<b>Exoenzima U</b>	Rol anti fagocitario	Lesión de células epiteliales. Responsable de bacteriemia y choque séptico.
<b>Ramnolípidos.</b>	Efecto detergente	Hidrólisis tensoactiva
<b>Elastasas (LasA, LasB)</b>	Degradación de elastina, fibrina, interferón, complemento y colágeno.	Destrucción del tejido que contiene elastina y colágeno. Rol importante en la virulencia
<b>Proteasa alcalina</b>	Proteólisis	Papel en las infecciones corneales y de tejidos blandos.
<b>Piocianina y pioverdina</b>	Acción bactericida Promueve la liberación de elastasa Inhibición de movimientos ciliares. Captura de hierro. Inducción de radicales libres	Disminuye el clareamiento bacilar. Papel en la aparición de vasculitis arterial pulmonar.
<b>Lecitinas solubles</b>	Inhibición de los movimientos ciliares de las células pulmonares	Patogenicidad respiratoria Rol en las infecciones crónicas.
<b>Fosfolipasa C</b>	Efecto citolítico local	Lisis de células ciliares (atelectasia pulmonar). Rol en las infecciones agudas y crónicas.
<b>Ácido cianhídrico</b>	Arresto de la respiración celular. Disminución de la función pulmonar.	Permite la colonización.

Tabla 6. Listado de algunos de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* y sus efectos ([Ben Haj Khalifa, Moissenet, Vu Thien, & Khedher, 2011](#); [Bruno, Woods, Storey, & Mody, 1999](#); [Epelman, Bruno, Neely, Woods, & Mody, 2000](#); [Jia, Wang, Zhou, & Jin, 2006](#); [J. Lee & Zhang, 2015](#)).

### 1.7.1 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) se encuentra localizado en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, juega un papel protector contra la lisis provocada por la actividad del suero y por otra parte tiene el rol de endotoxina. Está implicado en la estimulación de la respuesta inflamatoria y de las interacciones con el tejido del hospedero, este componente se divide en tres partes (imagen 2) ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [Rocchetta, Burrows, & Lam, 1999](#)).

1. Lípido A, también llamado endotoxina, es el responsable de la estimulación excesiva del sistema inmune, el cual puede ocasionar choque séptico y conducir a la muerte ([W. A. Lynn & Golenbock, 1992](#)) .
2. El núcleo del oligosacárido
3. Antígeno O, el cual es una región variable del polisacárido.

La presencia o ausencia del antígeno O en el núcleo del oligosacárido está relacionada a diferentes fenotipos. Se observan colonias lisas en presencia del antígeno, mientras que en su ausencia se observan rugosas, asimismo, se ha observado que éstas últimas son más susceptibles a la lisis por la acción del suero ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [Cryz, Pitt, Furer, & Germanier, 1984](#); [Lam, Taylor, Islam, Hao, & Kocincova, 2011](#); [Pier, 2007](#)).

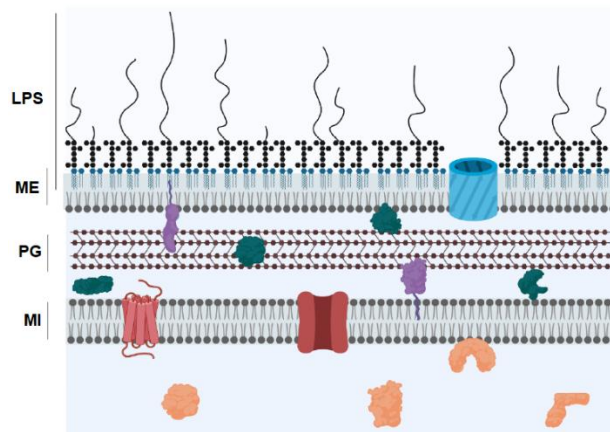


Imagen 2. Representación de la envoltura celular de Gram negativas. LPS: lipopolisacárido, ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrada interna. Imagen tomada de ([Huszczynski, Lam, & Khursigara, 2019](#)).

### 1.7.2 Flagelo

*P. aeruginosa* es un organismo móvil mediante un flagelo polar. La flagelina es la proteína primaria del componente del filamento flagelar, además, es posible clasificarla en 2 serotipos, en el a y el b. Entre las funciones asociadas al flagelo están la movilidad y la adherencia a las células del hospedero ([Campodonico et al., 2010](#)).

Se pueden observar tres fenómenos de movimiento “*swarming*, *swimming* y *twitching*”, por un lado, tanto el “*swarming*” como el “*swimming*” son mediados por la actividad del flagelo, como se mencionó previamente, esta bacteria posee uno o varios flagelos polares. Por otro lado, el “*twitching*” es un movimiento dependiente de la extensión y retracción del pili tipo IV. El flagelo es una estructura móvil rotatoria que asemeja a una hélice, los movimientos rotatorios son los que le permiten a *P. aeruginosa* moverse, por un lado de forma de nado, la cual es dependiente de una ligera capa de agua en la superficie o en forma de enjambre (*swarming*) la diferencia radica en que en éste último, la movilidad es un movimiento social coordinado ([Newman, Floyd, & Fothergill, 2017](#)). Asimismo, mediante el “*swimming*” *P. aeruginosa* es capaz de evadir la acción lítica de los compuestos extracelulares de los neutrófilos y de la acción de la fagocitosis por los macrófagos, le sirve de escape ante las acciones de defensa de las células del hospedero ([Newman et al., 2017](#)).

Se ha demostrado en diversos estudios en modelos animales, que el flagelo, además de ser un factor de virulencias, es un blanco potencial para el desarrollo de vacunas, con ello, coadyuvar con el sistema inmune y clarear los procesos infecciosos asociados a *P. aeruginosa* ([Campodonico et al., 2010](#)). Esta disminución de la virulencia se ha observado en modelos de ratones quemados, infectados con mutantes flagelares de *P. aeruginosa*, en este modelo, se ha visto, también, que el flagelo es necesario para la diseminación y se asoció a las muertes asociadas a choque séptico (imagen 3) ([Arora, Neely, Blair, Lory, & Ramphal, 2005](#); [Montie, Doyle-Huntzinger, Craven, & Holder, 1982](#)).

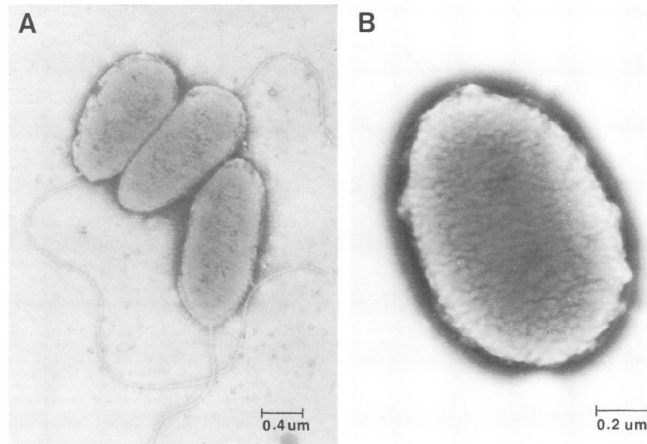


Imagen 3. Microfotografía electrónica de *P. aeruginosa*. En la imagen A se observan células con el flagelo polar, en la imagen B, mutante *fliC*, se observa la célula desprovista del flagelo. Imagen tomada de ([Montie et al., 1982](#))

### 1.7.3 Elastasa

La actividad de la elastasa resulta de una acción sinérgica entre LasA (proteasa estafilolítica) y LasB. LasA corta la elastina haciéndola más accesible a la acción proteolítica de otras proteasas como LasB. La elastasa LasB, es una metaloproteasa de zinc codificada por *lasB*, la cual se encuentra en locus PA3724 y tiene una longitud de 1497 pb (imagen 4) ([Winsor et al., 2016](#)) y posee un peso molecular de 33 KDa ([D. R. Galloway, 1991](#)). El mecanismo de secreción de la elastasa involucra escisión de la secuencia señal cuando la forma preproelastasa, pasa del citoplasma al periplasma. La elastasa madura se forma al pasar a través de la membrana externa al exterior de la célula, en este paso el propéptido se pierde. La forma prepro consta de una secuencia de 498 aminoácidos, mientras que la forma madura está constituida por 301 aminoácidos ([D. R. Galloway, 1991](#); [Kamath, Kapatral, & Chakrabarty, 1998](#)).

Es uno de los factores de virulencia más importante de *P. aeruginosa* con una actividad biológica bastante amplia ([Cicmanec & Holder, 1979](#); [van der Plas et al., 2016](#)). Como ya se mencionó, tiene la capacidad de hidrolizar la elastina, pero también es capaz de inactivar elementos importantes de inmunidad del hospedero como el complemento, IgA e IgG y citocinas como el interferón gama (INF- $\gamma$ ) y factor

de necrosis tumoral (TNF) IL-2, IL-8, péptidos antibacterianos, opsonina C3, C4, C5, C8, C9, lisozima, SP-A, SP-B (proteína surfactante, por sus siglas en ingles “**surfactant protein**”), fibronectina, laminina, vitronectina componentes de la matriz del epitelio pulmonar como la elastina, colágeno (tipo III y IV) y fibrina ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [Kuang et al., 2011](#); [J. Li et al., 2019](#)). En comparación con otras metaloproteasas, la elastasa muestra una amplia actividad frente a diferentes sustratos ([A. C. M. Galdino et al., 2019](#); [Saulnier, Curtil, Duclos, & Wallach, 1989](#)).

Al igual que en el flagelo, se han utilizado modelos de quemadura en ratones en los cuales se ha encontrado que existe una correlación positiva entre la virulencia y la presencia de elastasa en las *P. aeruginosa* que se probaron, en comparación con aquellas que carecían de dicha proteína ([Pavlovskis & Wretling, 1979](#)).

En estudios realizados por Kazuyuki y colaboradores determinaron, también, el papel inhibitor de elastasa sobre el inhibidor de proteasa- $\alpha$ 1 en plasma humano. El rol de este inhibidor de proteinasa es controlar la destrucción tisular mediada por proteasas de serina endógena ([Moriyama, Tsuzuki, & Oda, 1979](#)).

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PA3724 (lasB)

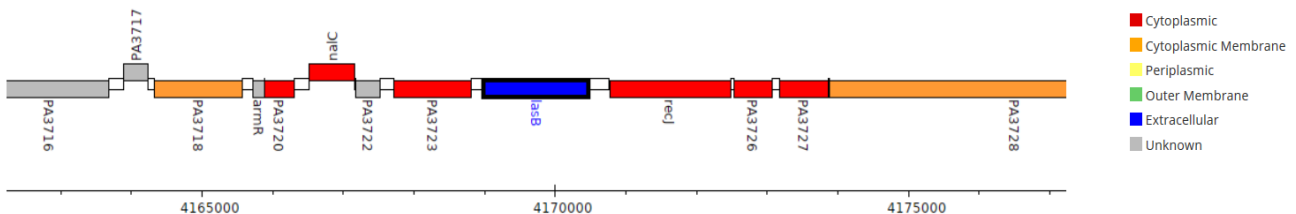


Imagen 4. Localización del gen *lasB* en *P. aeruginosa* PAO1 ([Winsor et al., 2016](#)). Cytoplasmic: citoplasmático, Cytoplasmic membrane: membrana citoplasmática, Periplasmic: periplásmico, Outer membrane: membrana externa, Extracellular: extracelular, Unknown: desconocido.

van der Plas y colaboradores demostraron que la elastasa es capaz de romper el extremo carboxilo terminal de la trombina humana, al hacerlo, esta porción se une a elementos inmunógenos como el LPS, de esta manera, *P. aeruginosa* con acción de la elastasa encuentra otra forma de evadir el sistema inmune del hospedero ([van der Plas et al., 2016](#)).

Cabe mencionar que existen otros estudios que demuestran la acción cooperativa de la elastasa, por ejemplo con la proteasa alcalina para poder evitar el reconocimiento del sistema inmune del hospedero de uno de los elementos más inmunogénicos que tiene la estructura celular de *P. aeruginosa* como lo es la flagelina ([Casilag et al., 2016](#)).

Ante este importante rol fisiológico, se ha considerado a la elastasa como un blanco con posibilidades terapéuticas ante el aumento de infecciones asociadas a *P. aeruginosa* ([A. C. M. Galdino et al., 2019](#)).

#### 1.7.4 Alginato

El alginato es un polisacárido importante en *P. aeruginosa*, es rico en grupos funcionales con carga negativa y por lo tanto afecta las características de superficie de la bacteria como la propia carga, hidrofobicidad, interacciones electrostáticas célula-superficie, etc ([Orgad, Oren, Walker, & Herzberg, 2011](#)). Estas moléculas están constituidas por proporciones variables de 1-4 ligado ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y a su epímero C-5 ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (imagen 5). El alginato está naturalmente acetilado y pierde residuos consecutivos de G (bloques GG) ([Moradali, Donati, Sims, Ghods, & Rehm, 2015](#); [Sonderholm et al., 2017](#)). En la síntesis de este polisacárido se ven involucradas trece proteínas y excepto por la codificada por el gen *algC*, el cual se ha visto que participa en la síntesis de ramnolípidos ([Olvera, Goldberg, Sanchez, & Soberon-Chavez, 1999](#)), esas proteínas se encuentran agrupadas en el operón de biosíntesis del alginato: *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF* y *algA*. ([Iain D. Hay, Ur Rehman, Ghafoor, & Rehm, 2010](#); [Moradali et al., 2015](#)). El alginato tiene la particularidad de proteger a *P.*



*aeruginosa*, tanto de los efectos de los macrófagos, como de citocinas del hospedero. Juega un papel importante en el estado de inflamación crónica, así como en crear una barrera física que separa al macroambiente de un microambiente de conglomerado celular llamado biopelícula. Esta biopelícula permite: 1) una limitada penetración de los leucocitos y sus productos antimicrobianos al interior de la biopelícula, 2) inactivación o supresión de procesos leucocito-específicos por la matriz de la biopelícula o componentes bacterianos, 3) disminución de la capacidad fagocítica de los leucocitos para erradicar la biopelícula bacteriana, 4) presencia de reguladores de respuesta globales y sistema de percepción de quorum que incrementan la resistencia a los leucocitos en la biopelícula y 5) cambios genéticos que permiten incrementar la resistencia a los componentes del sistema inmune humano (Leid et al., 2005).

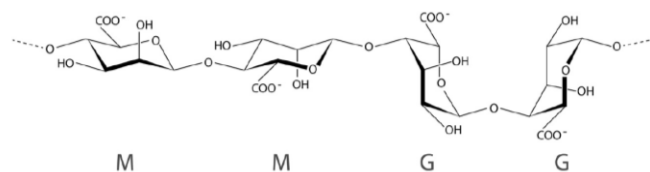


Imagen 5. Estructura química del alginato. M: residuos de manuronato, G residuos de gulonato.

La biosíntesis puede resumirse en 4 pasos: síntesis de precursores, polimerización, modificaciones/tránsito periplásmico y exportación (imagen 6 y 7).

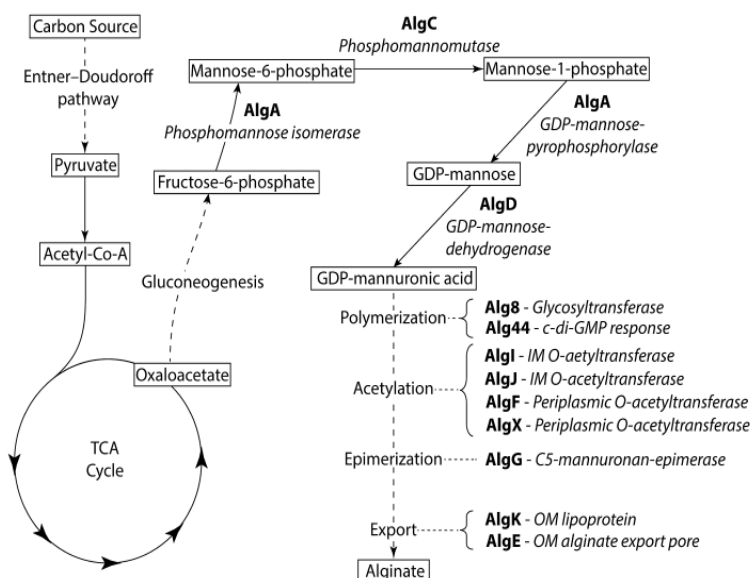


Imagen 6. Representación de la biosíntesis de alginato.



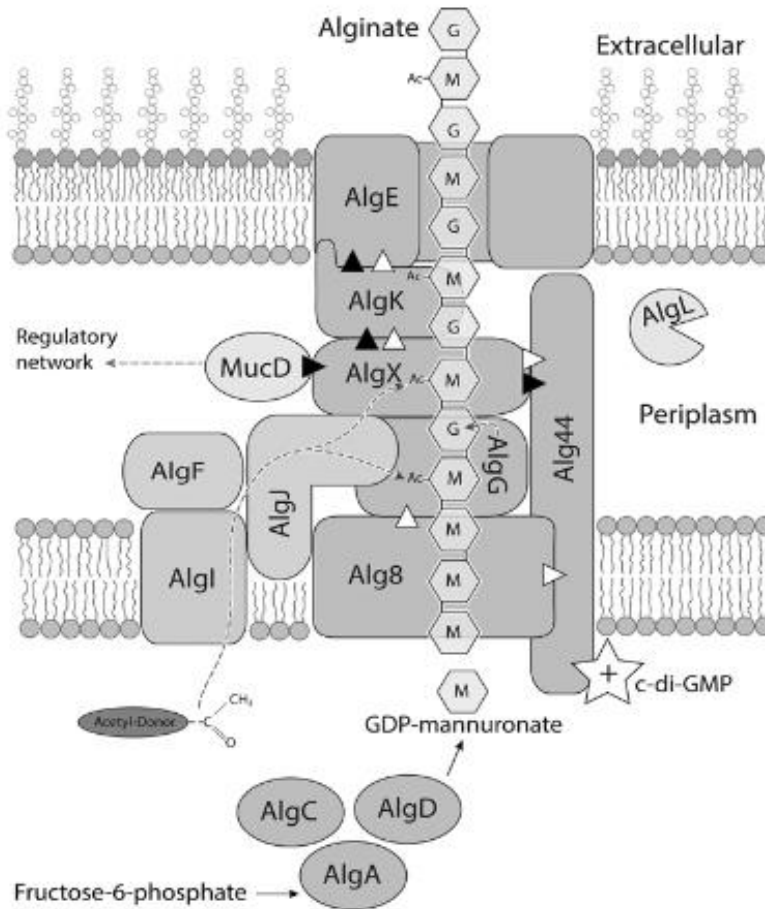


Imagen 7. Representación esquemática de la secreción/complejo de secreción. Acetilación: AlgI, AlgJ, AlgF y AlgX, epimerización AlgG representada por líneas punteadas. Las interacciones e representan en triángulos. Blancos relaciones de estabilidad mutua, negro interacciones directas. Imagen tomada de ([I. D. Hay, Ur Rehman, Moradali, Wang, & Rehm, 2013](#))

### 1.7.5 Proteasa alcalina

Otro de los exoproductos con los que cuenta *P. aeruginosa* es la proteasa alcalina. Esta proteína es una metaloproteasa de zinc con un peso de 50 KDa. La proteasa alcalina es un miembro de la subfamilia B de la familia M10 peptidasa y la súperfamilia metzicina ([Anna Clara M. Galdino, Branquinha, Santos, & Viganor, 2017](#)). AprA, proteasa alcalina, es codificada por *aprA*, posee una señal de secreción en la región del carboxilo terminal localizada dentro los últimos residuos de aminoácidos necesarios para ser traslocada y secretada por las proteínas de membrana AprD, AprE y AprF a través de la maquinaria del sistema de secreción tipo I ([Anna Clara M. Galdino et al., 2017](#)). El gen *aprA* se encuentra en el locus PA1249, en la cepa tipo PAO1, su localización genética se encuentra entre los nucleótidos 1355631-1357070 (hebra +) (imagen 8) ([Winsor et al., 2016](#)). La síntesis

de esta proteína comienza en la fase estacionaria temprana y la proteína es liberada al macroambiente sin ninguna acumulación intracelular importante ([Lazdunski, Guzzo, Filloux, Bally, & Murgier, 1990](#)).

La proteasa alcalina tiene la capacidad de degradar una amplia gama de proteínas del hospedero, incluyendo fibronectina y laminina, componentes importantes de la lámina basal y del endotelio ([Anna Clara M. Galdino et al., 2017](#)), por lo que posee un papel importante en el proceso invasivo y necrosis tisular hemorrágica ([Y. Hong & Ghebrehiwet, 1992](#)). Posee una mayor actividad en la degradación de elementos del complemento como C1q, C2 y C3 en comparación con la elastasa ([Y. Hong & Ghebrehiwet, 1992](#); [Laarman et al., 2012](#)), por lo tanto, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de interferir con la activación clásica del complemento y la inhibición por la ruta de lectina, esto logrado por la inactivación de C2 ([Laarman et al., 2012](#)). Además de estos elementos del complemento también es capaz de degradar citocinas y quimiocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, lo que sugiere que esta enzima tiene una gran actividad en la inmunomodulación de la infección ([Horvat & Parmely, 1988](#); [Laarman et al., 2012](#)).

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PA1249 (aprA)

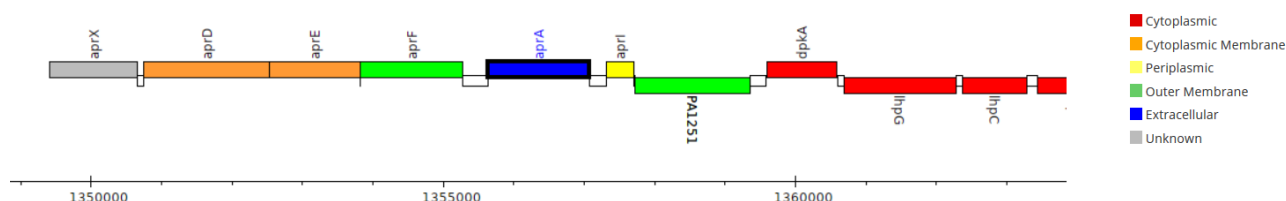


Imagen 8. Localización del gen *aprA* en *P. aeruginosa* PAO1 ([Winsor et al., 2016](#)).

Esta proteasa se ha encontrado frecuentemente en aislados clínicos de *P. aeruginosa* recuperada de diversos sitios anatómicos, sin embargo, se ha observado que se encuentra una hiperproducción en aislados recuperados de ojos, tracto gastrointestinal, heridas mucosas exacerbada en pacientes con fibrosis quística ([Bainbridge & Fick, 1989](#); [Ballok & O'Toole, 2013](#); [Anna Clara M. Galdino et al., 2017](#)).

Se ha encontrado, también, que tanto la proteasa alcalina como la elastasa B poseen la capacidad de inhibir la quimiotaxis neutrofílica y por lo tanto bloquear la fagocitosis de una forma eficiente, esta habilidad le confiere al microorganismo la capacidad de escapar de la fagocitosis, la cual constituye una de las primeras líneas de defensa del hospedero. Por otro lado, esta proteína también puede inhibir la interacción de la flagelina con TLR5 mediante la degradación de monómeros libres, permitiendo que las células de *P. aeruginosa* evadan la respuesta inmune. Otro de los papeles fisiológicos de la proteasa alcalina, se observa en los estadios de disminución de hierro, cuando los niveles son bajos, la proteasa alcalina puede romper la transferrina, lo que libera hierro y de esta forma se garantiza la captación de dicho metal ([Ballok & O'Toole, 2013](#); [Kharazmi, Hoiby, Doring, & Valerius, 1984](#); [Thibodeau & Butterworth, 2013](#)). En experimentos en modelo murino de queratitis bacteriana, se observó que *P. aeruginosa* incrementa su capacidad de unión a la superficie epitelial ([Fleiszig, Zaidi, Fletcher, Preston, & Pier, 1994](#); [Anna Clara M. Galdino et al., 2017](#)).

#### 1.7.6 Pioverdina

*P. aeruginosa* produce 4 pigmentos, piocianina, piorrubina, piomelanina y pioverdina ([Allydice-Francis & Brown, 2012](#); [Hunter & Newman, 2010](#)). El papel fisiológico tanto de piorrubina como piomelanina no se encuentra del todo dilucidado, para el caso de piomelanina, pocos trabajos se encuentran disponibles. Algunas frecuencias reportadas para la producción de piorrubina van desde el 3.5 al 6%, mientras que para piomelanina es < 1%, en otros estudios alcanzó el 2.5% y otro hasta el 10%. Para el caso de piorrubina, es un punto debatible debido a que algunos autores mencionan que es posible que exista una sobreestimación de aislados productores de este pigmento, esto se menciona con base en que piocianina, en presencia de la luz y al aire, se oxida dando como resultado un pigmento rojizo ([Ogunnariwo & Hamilton-Miller, 1975](#)). Pero, por otro lado, se cuenta con información sobre los roles que juegan tanto piocianina (mencionado en el punto 1.7.7) y el de pioverdina.

La pioverdina fue descubierta en 1892 por Gessard quien observó pigmentos amarillo verdosos en aislados bacterianos. A partir de este hallazgo el pigmento recibió diversos nombres como fluoresceína y pseudobactinas, hasta que finalmente Turfreijer acuñó el término pioverdina en 1941 ([Ringel & Bruser, 2018](#)). Los trabajos de King y colaboradores fueron los primeros en proporcionar información sobre el papel fisiológico de la pioverdina. Determinaron que la inducción y subsecuente producción de este pigmento estaba supeditado a las concentraciones de hierro, de tal manera que a bajas concentraciones de hierro, la producción de pioverdina era evidente a simple vista ([King, Campbell, & Eagles, 1948](#)). A estos trabajos le siguieron los realizados por Totter y Moseley, quienes en 1952 encontraron que la producción de pioverdina correlacionaba inversamente con la concentración logarítmica de hierro en un amplio rango ([Totter & Moseley, 1953](#)). Fue hasta 1978, cuando Meyer y colaboradores determinaron la alta afinidad que tenía la pioverdina al hierro, la cual está en el rango de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  y el mismo grupo definió el papel de este pigmento en la captación de hierro ([Meyer & Abdallah, 1978](#); [Meyer & Hornsperger, 1978](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)). Con esta información se concluyó que la pioverdina era un sideróforo y que estaba involucrado, por lo tanto, con el transporte del hierro al interior de la célula ([Lankford & Byers, 2008](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)).

*Pseudomonas spp.* poseen diversas estrategias para la obtención de hierro, a) a través de la síntesis de sideróforos extracelulares (pequeñas moléculas queladoras de  $\text{Fe}^{3+}$ ), denominadas pioverdina y pioquelina, las cuales, toman el hierro y lo introducen a través de un transportador TonB, b) vía la captación de un exosideróforo, el cual no es sintetizado por la bacteria, c) a través de la captación de una molécula tipo hemo a través de los sistemas Phu y Has y d) mediante la reducción extracelular de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  ([Cezard, Farvacques, & Sonnet, 2015](#)).

Se sabe que además de pioverdina y pioquelina, *Pseudomonas spp.* producen otras moléculas similares a sideróforos como ácido salicílico o quinolobactina, aunque estos compuestos son producidos en menor cantidad y además poseen una afinidad

menor por el hierro ([Cezard et al., 2015](#); [Cox, Rinehart, Moore, & Cook, 1981](#); [Meyer, Azelvandre, & Georges, 1992](#); [Mossialos et al., 2000](#)).

Se conocen más de 100 variantes de pioverdina, las cuales han sido identificadas en diferentes especies de *Pseudomonas*, lo que representa, aproximadamente, el 20% de los sideróforos caracterizados

Las pioverdinas generalmente están compuestas por: 1) un fluoróforo característico 2,3-diamino-6,7-hidroxiquinolina, 2) una cadena acilada variable unida al grupo 3-amino del fluoróforo y 3) un esqueleto péptido específico, generalmente unido al grupo carboxilo C<sub>1</sub> del anillo ([Meyer, 2000](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)). El fluoróforo se conserva entre todas las cepas y especies de *Pseudomonas* y fija el Fe<sup>3+</sup> a través de su catecol.

La biogénesis de la pioverdina inicia en el citoplasma, donde la péptido no ribosomal sintetasa (NRPS por sus siglas en inglés) como PvdL, PvdI y PvdD (dependiendo de la cepa) ensambla una ferribactina acilada inicial (imágenes 9, 10 y 11) ([Ackerley, Caradoc-Davies, & Lamont, 2003](#); [Hohlneicher, Schafer, Fuchs, & Budzikiewicz, 2001](#); [Lehoux, Sanschagrín, & Levesque, 2000](#); [Merriman, Merriman, & Lamont, 1995](#); [Mossialos et al., 2002](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)). El papel de las NRPS es agregar aminoácidos específicos para ir elongando el péptido. Cada módulo se adenila por su aminoácido cognado en un dominio de adenilación y posteriormente son transferidos a un grupo tiol libre de un cofactor unido a fosfopanteteína. Las uniones de los péptidos están formadas por la condensación de los dominios de los módulos, de esta forma se transfiere el péptido creciente sobre la fosfopanteteína unida a los aminoácidos del siguiente módulo. Por último una tioesterasa rompe la unión del tioéster y libera al péptido del cofactor fosfopanteteína del último módulo ([Bloudoff & Schmeing, 2017](#)). El módulo uno de PvdL incorpora tanto un ácido mirístico o ácido miristoleico al primer bloque de construcción en lugar de un aminoácido, a un lado de la cadena ([Drake & Gulick, 2016](#); [Hannauer et al., 2012](#)). Los tres primeros aminoácidos de la ferribactina, que son incorporados por PvdL, siempre son ácido L-glutámico (L-Glu), emparejado vía su grupo γ carboxi a D-tirosina (D-Tyr) y L-2,4-diaminobutirato (L-Dab) ([Ringel & Bruser, 2018](#)).

Los aminoácidos en la ferribactina son sintetizados por enzimas específicas de pioverdina. L-Dab es producida por PvdL a partir de L-aspartato- $\beta$ -semialdehído (L-ASA) ([Vandenende, Vlasschaert, & Seah, 2004](#)), mientras que L-N<sup>5</sup>-hidroxi ornitina (L-fOHOrn) es producida en dos pasos a partir de L-ornitina por hidroxilación dependiente de PvdA ([Ge & Seah, 2006](#); [Meneely, Barr, Bollinger, & Lamb, 2009](#); [Visca, Ciervo, & Orsi, 1994](#); [Visca, Serino, & Orsi, 1992](#)) y de la formidación dependiente de PvdF ([McMorran, Kumara, Sullivan, & Lamont, 2001](#)). Todo este conjunto de enzimas, incluyendo los NRPS, forman un complejo asociado a membrana conocido como siderosoma el cual podría evitar la toxicidad citoplasmática ([Gasser, Guillon, Cunrath, & Schalk, 2015](#); [Imperi & Visca, 2013](#)). Asimismo, se ha encontrado que una pequeña proteína tipo MbtH, se encuentra asociada con los NRPS en la síntesis de la ferribactina citoplasmática y también que juega un papel importante en la producción y secreción de pioverdina en *P. aeruginosa* ([Felnagle et al., 2010](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)). Por otro lado, se ha encontrado también que PvdG, una tioesterasa soluble, está involucrada en la producción de pioverdina. PvdD ha mostrado que posee su propio sitio motive de tioesterasa, quizá PvdG provee la funcionalidad *in trans* para PvdL y posiblemente para PvdI ([Drake et al., 2007](#); [Ravel & Cornelis, 2003](#)) (imagen 9. Biosíntesis, secreción, captación y reciclaje de pioverdinas en *Pseudomonas fluorescens* A506).

La ferribactina acilada se trasloca inmediatamente través de la membrana citoplasmática dentro del periplasma por el transportador tipo ABC, PvdE ([McMorran, Merriman, Rombel, & Lamont, 1996](#); [Ringel & Bruser, 2018](#); [Yeterian, Martin, Guillon, et al., 2010](#)). En el periplasma, la acilación de la ferribactina es removida por una hidrolasa tipo Ntn, PvdQ ([Clevenger et al., 2017](#); [Drake & Gulick, 2016](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)).

Posterior a la desacilación de la ferribactina, se genera el sistema del anillo fluorescente dihidroquinolina, el cual transforma a la ferribactina en pioverdina. Este anillo está altamente conservado en las pioverdinas y provee un andamiaje plano para dos oxo-ligando de los sideróforos. La ferribactina es sintetizada con los tres residuos N-terminales de L-Glu/D-Tyr/L-Dab, tanto la tirosina como los residuos

de diaminobutirato forman el fluoróforo ([Hohlneicher, Hartmann, Taraz, & Budzikiewicz, 1992](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)). En la ferribactina, el grupo 4-amino de L-Dab es condensado con el grupo carbonil vecino de D-Tyr. Una cascada oxidativa de ciclaciones resulta en la formación de un fluoróforo de 3 anillos ([Dorrestein, Poole, & Begley, 2003](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)). Como resultado de ese proceso, la tirosina es hidroxilada para formar el grupo catecol el cual posteriormente es oxidado a una *o*-quinona, lo que permite la adición intramolecular e involucra al átomo de nitrógeno del 1-amino del L-Dab y el anillo de quinona, resultando después de la tautomerización en dihidro-dihidroxiquinolina del sistema de dihidropioverdina. Los pasos de hidroxilación y oxidación son catalizados por la tirosinasa PvdP ([Nadal-Jimenez et al., 2014](#)) lo cual promueve la ciclación y formación de la dihidropioverdina ([Jacques et al., 2003](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)).



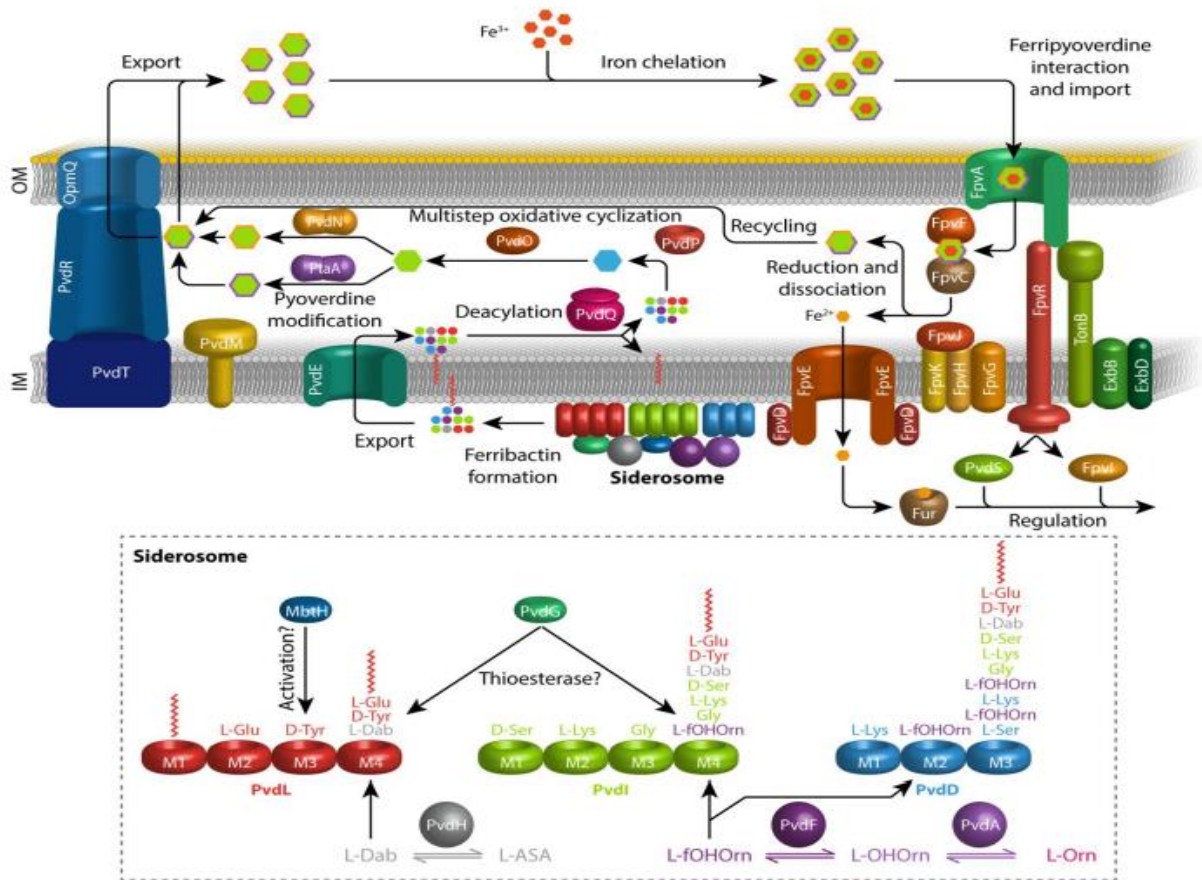


Imagen 9. Modelo actual de biosíntesis, secreción, captación y reciclaje de pioverdinas en *Pseudomonas fluorescens* A506. El precursor acilada ferribactina es sintetizado en el citoplasma por NRPS y auxiliado por enzimas acopladas y organizadas en la membrana definidas como siderosoma. PvdL sintetiza el N-terminal tripéptido conservado con su acilación, las otras NRPS son responsables para el resto de los péptidos y por lo tanto varían entre cepas con distintas secuencias. Las enzimas auxiliares MbtH, PvdG, PvdH, PvdA, PvdF y PvdD juegan con roles indicados. La ferribactina es exportada principalmente por PvdE dentro del periplasma, donde es desacetilado por PvdQ. Subsecuentemente PvdP cataliza la ciclación oxidativa resultando en dihidropioverdina. PvdO posiblemente en participación con otras proteínas, facilita la oxidación final. Después de eso, modificaciones en la cadena ocurren, el ácido L-glutámico pasa a succinamida por catálisis de PvdN o a  $\alpha$ -cetoglutarato por acción de PtaA. Las pioverdinas modificadas son secretadas por varios sistemas transportadores como PvdRT-OmpQ y una vez fuera fija el ion hierro. Posteriormente los complejos son fijados a FpvA y son tomados por TonB. FpvF y FpvC reducen y despegan el hierro, el cual es tomado por el transportador FpvDE. La apioverdina es reclinada. Imagen tomada de (Ringel & Bruser, 2018).



Se sabe que, PvdO y PvdP siempre están presentes juntas y ambas están involucradas directamente con la formación del fluoróforo pioverdina ([Ringel & Bruser, 2018](#); [Ringel, Drager, & Bruser, 2018](#)).

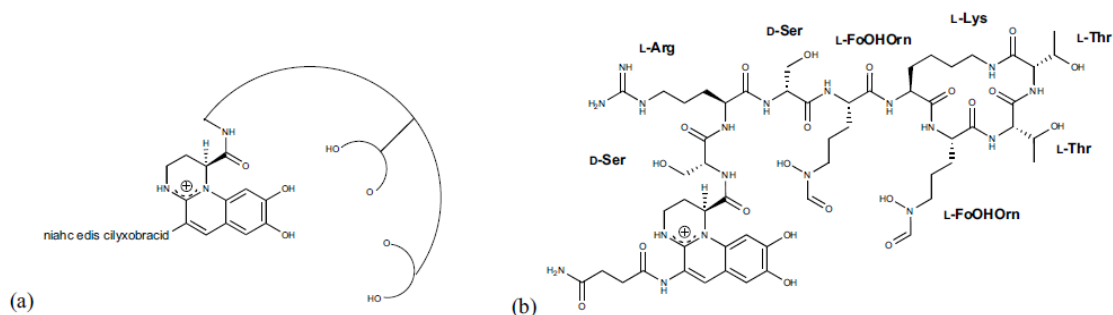


Imagen 10. A) Estructura general de una pioverdina, B) estructura de PvdI, la pioverdina más estudiada que es secretada por *P. aeruginosa* ATCC 15692. Imagen tomada de ([Cezard et al., 2015](#)).

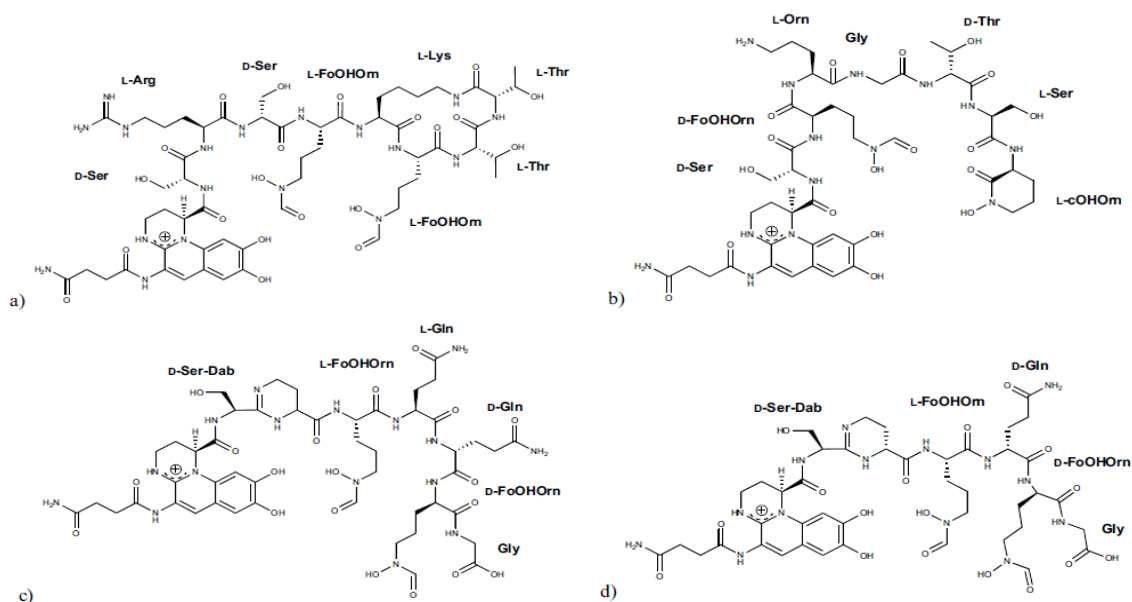


Imagen 11. Estructura molecular de las cuatro pioverdinas producidas por *P. aeruginosa*. A) Pioverdina clase I (PvdI) en la cepa tipo ATCC 15692, B) Pioverdina clase II (PvdII), estructura arqueotipo de la cepa ATCC 27853, C) Pioverdina clase III (PvdIII), estructura arqueotipo de la cepa Pa6, y dD) pioverdina clase IV (PvdIV), estructura de la cepa R'. Imagen tomada de ([Cezard et al., 2015](#)).

La acidificación de los residuos de L-Glu en la posición 1 en las ferribactinas forman un enlace amida a través de sus propios grupos  $\gamma$ -carboxílicos a D-Tyr dejando libre, por lo tanto, los grupos  $\alpha$ -carboxilo y  $\alpha$ -amino. Sin embargo, durante la maduración de las pioverdinas, generalmente no poseen estos residuos, lo cual depende de la cepa a analizarse, estas generalmente poseen succinamida, succinato o  $\alpha$ -cetoglutarato en esta posición y algunas veces melamida o ácido málico son encontrados, incluso trazas de ácido succínico ciclado.

Una vez formada la pioverdina, esta puede ser transportada al exterior por sistemas que consisten de PvdR, PvdT y OpmQ ([Hannauer, Yeterian, Martin, Lamont, & Schalk, 2010](#); [Yeterian, Martin, Lamont, & Schalk, 2010](#)). Sin embargo, PvdRT-OpmQ no son las únicas rutas de exportación, en cepas mutantes se ha visto que la pioverdina es capaz de ser secretada. Asimismo, el sistema de transporte MexAB-OprM también se han visto implicado en la secreción de pioverdina ([X. Z. Li, Nikaido, & Poole, 1995](#); [K. Poole, Heinrichs, & Neshat, 1993](#); [K. Poole, Krebes, McNally, & Neshat, 1993](#)). Sin embargo, esos mismos estudios mencionan que la inactivación de PvdRT-OmpQ disminuye la secreción de pioverdina alrededor de 50-60%. Una vez secretado, es FpvA, el receptor de ferripioverdina, quien reconoce las pioverdinas con hierro ([Meyer, Hohnadel, Khan, & Cornelis, 1990](#); [Keith Poole, Neshat, & Heinrichs, 1991](#)).

FpvA no solo puede unir ferripioverdina, sino también la apo-pioverdina libre de hierro, la cual no es importada ([Schalk, Abdallah, & Pattus, 2002](#)). FpvA puede unir un amplio rango de complejos pioverdina-metal los cuales incluyen al  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , incluso algunos podrían ser importados. Además, los metales quelados  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  pueden inducir la producción de pioverdina al estar unidos a FpvA (imagen 12) ([Braud, Hoegy, Jezequel, Lebeau, & Schalk, 2009](#)).

Después de la importación, la pioverdina no es degradada o modificada ni importada al citoplasma, en lugar de eso,  $\text{Fe}^{3+}$  es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  en el periplasma y entonces se lleva a cabo la liberación de la pioverdina y es tomada por el transportador tipo ABC FpvDE ([Brillet et al., 2012](#)). En la membrana interna las proteínas FpvG y FpvH

son esenciales para la liberación del hierro y existe evidencia que FpvG cataliza el paso de reducción ([Ganne et al., 2017](#); [Ringel & Bruser, 2018](#)).

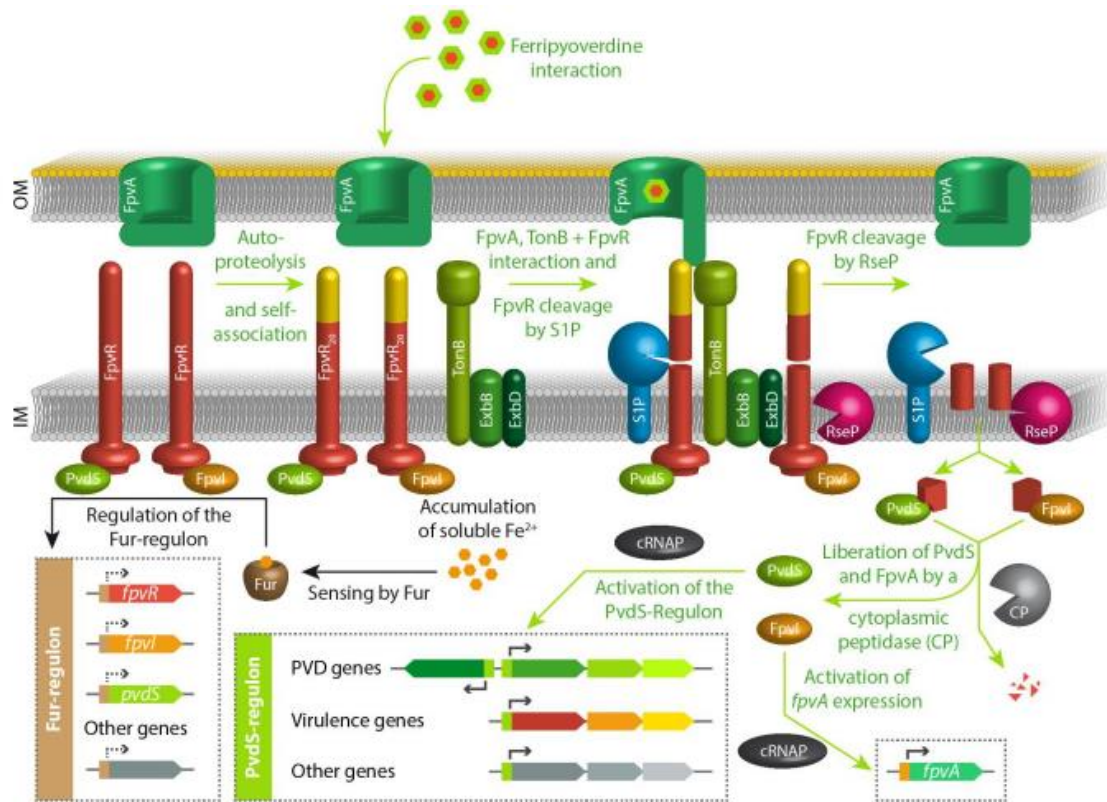


Imagen 12. Vías reguladoras para la producción de pioverdina en limitación de hierro. Imagen tomada de ([Ringel & Bruser, 2018](#)).

### 1.7.7 Piocianina

El género *Pseudomonas* tiene la capacidad de producir una gran variedad de productos extracelulares, los pigmentos entre ellos. Dentro de estos pigmentos extracelulares, las fenazinas poseen la mayor significancia. *P. aeruginosa* produce piocianina, la cual es un pigmento soluble en agua de color azul verdoso, la cual ha sido utilizado como un colorante con potencial redox muy similar a menaquinona ([El-Fouly, Sharaf, Shahin, El-Bialy, & Omara, 2019](#)). Piocianina es un zwitterión (compuesto químico eléctricamente neutro, pero con cargas formales positivas y negativos sobre átomos diferentes) y, de forma fácil, es capaz de penetrar las membranas biológicas (imagen 13) ([Lau, Hassett, Ran, & Kong, 2004](#)). Este factor

de virulencia puede reprimir la respuesta inmunológica del hospedero e inducir apoptosis en los neutrófilos ([Allen et al., 2005](#); [Kipnis, Sawa, & Wiener-Kronish, 2006](#)), además induce la producción de interleucina-8 (IL-8) ([Kipnis et al., 2006](#)), posee características oxidorreductoras, ante ello, oxida el glutatión e inactiva la catalasa de las células epiteliales respiratorias y las células endoteliales, de tal manera que esta acción conduce al estrés oxidativo y de esta forma ocasiona necrosis del tejido respiratorio ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [S. Hall et al., 2016](#); [Lau, Ran, Kong, Hassett, & Mavrodi, 2004](#); [Loarca et al., 2019](#); [Nikaido, 1994](#); [O'Malley, Reszka, Spitz, Denning, & Britigan, 2004](#)). En el caso de pacientes con fibrosis quística, el cual es el modelo de estudio más explorado para infecciones de *P. aeruginosa* y la producción de piocianina, se han documentado concentraciones por arriba de 100  $\mu\text{M}$  ([Caldwell et al., 2009](#); [Castaneda-Tamez et al., 2018](#)), con base en ello, se sabe también, que el efecto de apoptosis es concentración y tiempo dependiente, por lo que una exposición de 5 h a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de piocianina es capaz de manifestar el efecto antes mencionado. Por otro lado, el efecto de la piocianina parece ser célula dependiente, si bien el efecto en neutrófilos es conocido y documentado, macrófagos derivados de monocitos parecen no ser susceptibles a la acción de la piocianina ([Usher et al., 2002](#)).

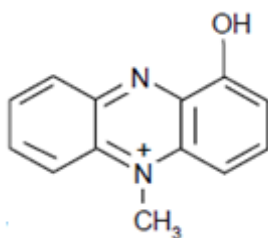


Imagen 13. Estructura química de la piocianina ([Lau, Hassett, et al., 2004](#)).

Así como se cuenta con datos sobre la secreción de piocianina en pulmón, también se han hecho cuantificaciones en otras muestras biológicas como secreción de oído (arriba de 2.7  $\mu\text{M}$ ) ([Reimer, Edvaller, & Johansson, 2000](#)) y heridas (arriba de 8.1  $\mu\text{M}$ ) ([Cruickshank & Lowbury, 1953](#)).

La piocianina está compuesta de 2 subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina. La fenazina es un compuesto heterocíclico que es producido naturalmente como el rojo

intenso 5-metil-7-amino-1-carboxifenazium betaína la cual es posteriormente convertida al amarillo verdoso (limón) fenazina-1-ácido carboxílico y finalmente al azul brillante 1-hidroxi-5-metil fenazina, el cual es la piocianina ([Gohain, Thomashow, Mavrodi, & Blankenfeldt, 2006](#); [Jayaseelan, Ramaswamy, & Dharmaraj, 2014](#)).

La ruta del ácido shikímico es la principal ruta metabólica para la biosíntesis de la fenazina (imagen 14). En la síntesis en *P. aeruginosa* se han identificado siete genes involucrados, nombrados como *phz* C, D, E, F, G, M y S. Éste loci se ha encontrado en todas las especies de *Pseudomonas* ([Ahuja et al., 2008](#); [Gohain et al., 2006](#); [Jayaseelan et al., 2014](#); [Mavrodi et al., 2001](#)). De estos genes, los responsables de convertir fenazina-1-ácido carboxílico a piocianina son *phzM* y *phzS* (imagen 14). Se ha sugerido que para la producción de piocianina a partir de fenazina-1-ácido carboxílico, el cual es el precursor común de las diferentes fenazinas especie-específicas, el proceso consta de dos pasos. En el primer paso se lleva a cabo una catálisis mediada por la enzima PhzM, una S-adenosilmetionina dependiente de metiltransferesara, en donde la fenazina-1-ácido carboxílico es convertido en 5-metilfenazina-1-ácido carboxílico betaína mediante la transferencia de un grupo metilo a un átomo de nitrógeno en el anillo de fenazina. El segundo paso es mediado por la enzima PhzS, una monooxigenasa dependiente de FAD e involucra la descarboxilación hidroxilativa de 5-metilfenazina-1-ácido carboxílico betaína a piocianina ([Jayaseelan et al., 2014](#); [Parsons et al., 2007](#)).

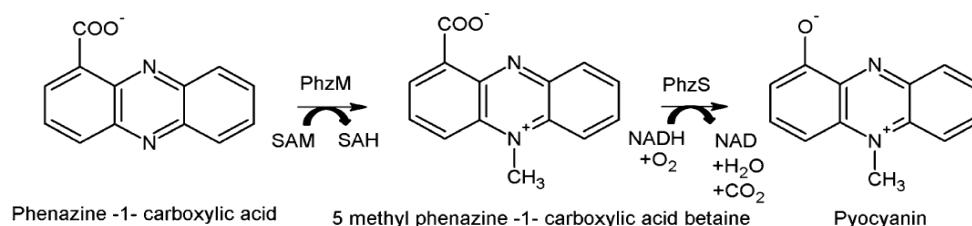


Imagen 14. Ruta biosintética de la piocianina a partir de fenazina-1-ácido carboxílico, 5-metil fenazina-1-ácido carboxílico betaína y finalmente piocianina ([Jayaseelan et al., 2014](#)).

### 1.7.8 HCN

*P. aeruginosa* es una de las pocas bacterias que son capaces de producir cianuro, algunos otros microorganismos son: cianobacterias como *Anacystis nidulans* y *Nostoc muscorum*, rizobacterias como *Rhizobium leguminosarum* y *Solanum tuberosum*, y proteobacterias como *Pseudomonas aureofaciens* y *Pseudomonas fluorescens* ([Blumer & Haas, 2000](#); [Broderick et al., 2008](#); [Carroll et al., 2005](#); [Kremer & Souissi, 2001](#)).

En *P. aeruginosa*, la glicina es descarboxilada a ácido cianhídrico por la enzima HCN sintetasa, como producto de la actividad del clúster de genes *hcnABC* sintetasa ([Blumer & Haas, 2000](#); [Carterson et al., 2004](#)), produciendo cuatro electrones y cuatro iones hidrógeno por cada molécula de glicina ([Blumer & Haas, 2000](#); [Lenney & Gilchrist, 2011](#)). Este proceso se lleva a cabo en condiciones microaerofílicas (O<sub>2</sub> 5%) y se ve inactivado tanto por condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La producción se ve favorecida a temperaturas de 34-37°C ([Blumer & Haas, 2000](#); [Lenney & Gilchrist, 2011](#); [Worlitzsch et al., 2002](#); [Zlosnik & Williams, 2004](#)).

El cianuro es un veneno potente, el cual, a dosis pequeñas como 50 mg, resulta ser letal para los humanos. Tiene la capacidad de fijarse a las metaloenzimas, pero la capacidad responsable de su alta toxicidad se debe a que puede inhibir la citocromo C-oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial) ([Salkowski & Penney, 1994](#); [Way, 1984](#)). A pesar de esta toxicidad, *P. aeruginosa* es resistente al efecto de este potente veneno que ella misma produce, esto debido, entre otros mecanismos, a la producción constitutiva de rodanasa, la cual convierte el cianuro a tiocianato ([Broderick et al., 2008](#); [Cipollone, Bigotti, Frangipani, Ascenzi, & Visca, 2004](#); [Zlosnik et al., 2006](#)).

En los cultivos de *P. aeruginosa* se han alcanzado concentraciones de 300-500 µM de cianuro, asimismo, se ha detectado en muestras de esputo y el HCN se ha detectado en el aliento de pacientes con fibrosis quística y en pacientes con

bronquiectasias infectados con *P. aeruginosa* ([Blumer & Haas, 2000](#); [Lenney & Gilchrist, 2011](#); [Ryall, Davies, Wilson, Shoemark, & Williams, 2008](#); [Sanderson, Wescombe, Kirov, Champion, & Reid, 2008](#); [Worlitzsch et al., 2002](#); [Zlosnik & Williams, 2004](#)).

#### 1.7.9 Ramnolípidos

La producción de ramnolípidos es exclusiva de *P. aeruginosa*, por lo que, ningún otro Pseudomonal es capaz de producirlo. Esta molécula fue reportada por primera vez en 1949 por Jarvis y Johnson ([Jarvis & Johnson, 1949](#); [Soberon-Chavez, Lepine, & Deziel, 2005](#)). Es una molécula anfipática constituida de un lípido hidrofóbico y una fracción hidrofílica del azúcar. Esta característica la hace un molécula con propiedades tensoactivas y le confieren la capacidad de reducir la tensión superficial, formar emulsiones y causar pseudosolubilizaciones de sustratos insolubles, lo que le permite a *P. aeruginosa* utilizar diversas fuentes carbono, por ejemplo, los alcanos ([Beal & Betts, 2000](#); [Caiazza, Shanks, & O'Toole, 2005](#)).

Los ramnolípidos son esenciales para el movimiento tipo “swarming”, están involucrados en la producción de biopelículas y pueden actuar también como hemolisinas ([Davey, Caiazza, & O'Toole, 2003](#); [Köhler, Curty, Barja, van Delden, & Pechere, 2000](#); [Kownatzki, Tümmler, & Döring, 1987](#); [Tremblay, Richardson, Lepine, & Deziel, 2007](#); [Wittgens et al., 2017](#)). Algunos estudios han demostrado que se precisa de defectos de la permeabilidad paracelular del epitelio respiratorio como prerequisite para la invasión por *P. aeruginosa*, sin embargo, también se ha encontrado que los ramnolípidos por sí solos son suficientes y necesarios para afectar la barrera epitelial y permitirle a este microorganismo instalarse ([Zulianello et al., 2006](#)) y con ello promover la invasión del tejido pulmonar ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [Kownatzki et al., 1987](#)).

Los ramnolípidos son capaces de alterar el transporte mucociliar y los movimientos ciliares del epitelio respiratorio humano ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [Kownatzki et](#)



[al., 1987](#)) e inhibir la fagocitosis ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [McClure & Schiller, 1996](#)).

Los ramnolípidos están constituidos típicamente de un dímero de ácido graso 3-hidroxy vinculado a través de un enlace  $\beta$ -glucosídico a un residuo mono o di-ramnosa (imagen 15) ([Soberon-Chavez et al., 2005](#)). En cultivo líquido, *P. aeruginosa* produce principalmente dos formas ramnolípidos: ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (monoramnolípidos) y ramnosil-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (diramnolípidos) los cuales se observan en la imagen 15.

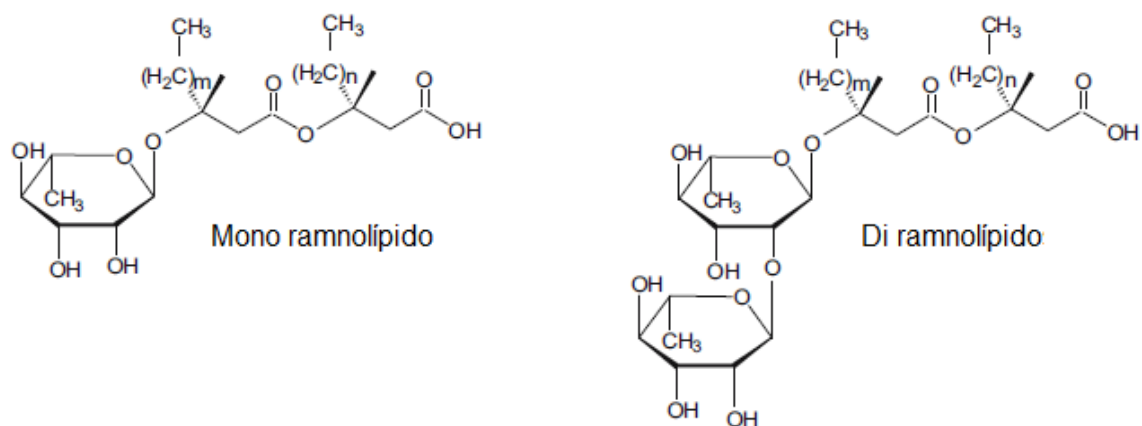


Imagen 15. Estructura química de mono ramnolípidos (izquierda) y di ramnolípidos (derecha).

La biosíntesis de estas moléculas tensoactivas proviene de dos reacciones secuenciales de transferencia de los grupo ramnosil, cada una catalizada por una ramnosiltransferasa específica (Rt1 y Rt2 respectivamente) con deoxi-timidina-difosfo-L-ramnosa (dTDP-L-ramnosa) actuando como el donador ribosil en ambas reacciones y  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato o monoramnolípidos actuando como el recipiente respectivo ([Maier & Soberon-Chavez, 2000](#)).

La enzima Rt1 está compuesta de dos polipéptidos los cuales son codificados por los genes *rhIA* y *rhIB*. RhIA es una proteína de membrana interna, mientras que la subunidad catalítica, RhIB, es periplásmica ([Maier & Soberon-Chavez, 2000](#)). El gen



que codifica Rt2 es *rhIC*. Rt2 es una proteína homóloga de la ramnosiltransferasa involucrada en la síntesis de LPS ([Rahim et al., 2001](#)).

#### 1.7.10 Sistema de secreción tipo III

Para poder establecer la infección, *P. aeruginosa* se vale de todo un arsenal de factores de virulencia, siendo el sistema de secreción tipo 3 (SST3) uno de ellos. Este factor de virulencia se encuentra codificado por 36 genes, los cuales se encuentran agrupados en cinco operones en el cromosoma de *P. aeruginosa*, estos genes son los responsables tanto de la biogénesis como regulación de la maquinaria asociada al SST3, y al menos otros 6 genes se encuentran dispersos en el genoma y son los que codifican proteínas efectoras y sus chaperonas, por lo tanto el complejo regulón puede ser dividido en cinco partes: proteínas que constituyen el complejo de la aguja que transporta los sustratos del citosol bacteriano al ambiente extracelular; proteínas que translocan las proteínas secretadas al interior de la célula del hospedero; proteínas que regulan el proceso de secreción; proteínas chaperonas que facilitan la secreción de sus sustratos y proteínas que son inyectadas al interior de las células del hospedero conocidas como proteínas efectoras (imagen 16) ([Hauser, 2009](#)). Este factor de virulencia comparte un ancestro común con el sistema flagelar y se sugiere que la adquisición de este sistema se debió a un evento de transferencia horizontal de genes ([Hauser, 2009](#); [Hueck, 1998](#); [L. Nguyen, Paulsen, Tchieu, Hueck, & Saier, 2000](#)).

El complejo de la aguja es la estructura supramolecular responsable del transporte específico de proteínas del citosol bacteriano al ambiente extracelular, moviéndolas a través de barreras de la membrana citoplasmática, el peptidoglucano y la membrana externa ([Hauser, 2009](#)), este complejo comparte similitud con los de *Yersinia spp.*, *Salmonella entérica* y *Shigella flexneri* ([Pastor, Chabert, Louwagie, Garin, & Attree, 2005](#)) (imagen 17).

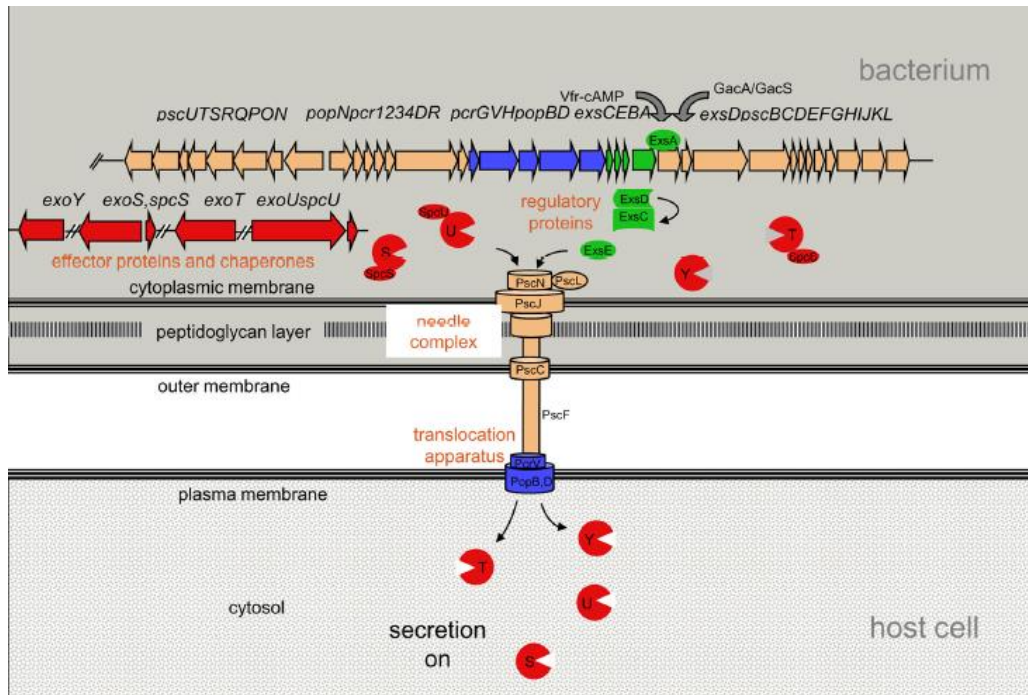


Imagen 16. Sistema de secreción tipo 3. Se observa la localización genética de los operones involucrados y su división en los procesos. Imagen tomada de ([Hauser, 2009](#)).

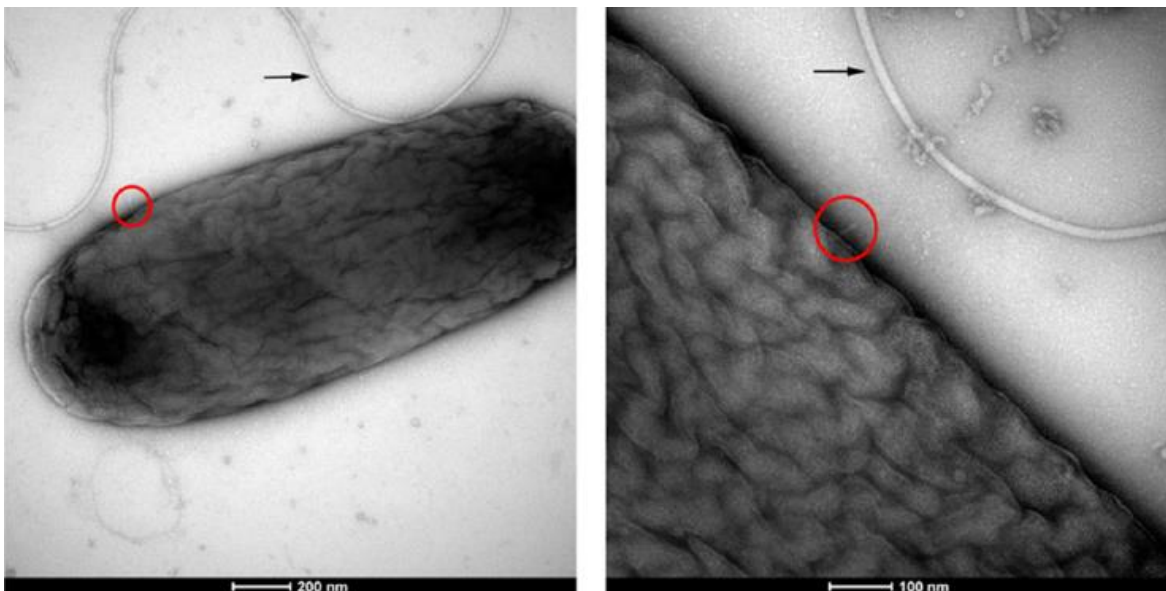


Imagen 17. Visualización del complejo de la aguja del SST3 de *P. aeruginosa*. Imagen tomada de ([Perdu et al., 2015](#))

El aparato de translocación es un poro en la membrana proteica que acepta proteínas efectoras secretadas por el complejo de la aguja y las entrega a través de

la membrana plasmática de la célula del hospedero. El proceso de translocación es eficiente, solo escapa el 0.1% de las proteínas efectoras al medio extracelular ([Hauser, 2009](#); [Sundin, Thelaus, Broms, & Forsberg, 2004](#)). El rol del poro no está limitado exclusivamente al transporte de proteínas efectoras, el poro de translocación, por sí mismo es suficiente para causar la muerte de células del hospedero, ya sea de manera directa, por el aumento de la permeabilidad de la membrana o indirectamente por la activación de respuestas de las células del hospedero ([Dacheux, Goure, Chabert, Usson, & Attree, 2001](#); [Goure et al., 2004](#); [V. T. Lee, Smith, Tummler, & Lory, 2005](#); [Roy et al., 2004](#); [Shafikhani, Morales, & Engel, 2008](#)). De tal manera que la muerte de las células intoxicadas podría constituir un mecanismo de defensa del hospedero. Por ejemplo SST3/aparato de translocación (en ausencia de cualquier proteína efectora conocida) es suficiente para desencadenar la activación de la caspasa-1 por la vía del inflamosoma Ipaf, un receptor similar a Nod ([Franchi et al., 2007](#); [Galle et al., 2008](#); [Hauser, 2009](#); [Miao, Ernst, Dors, Mao, & Aderem, 2008](#); [Sutterwala et al., 2007](#)). La activación del inflamosoma y la caspasa-1 resulta en la producción de IL-1 $\beta$  e IL-8 y piroptosis ([Dacheux et al., 2001](#); [Galle et al., 2008](#); [Hauser, 2009](#); [Sutterwala et al., 2007](#)), una variante de la muerte celular, la cual es proinflamatoria y se puede observar tanto la apoptosis como la necrosis. La inducción de piroptosis podría explicar los reportes previos de muerte de fagocitos, dependiente del SST3 pero independiente de las proteínas efectoras ([Dacheux et al., 2001](#); [Goure et al., 2004](#); [Hauser, 2009](#); [V. T. Lee et al., 2005](#); [Vance, Rietsch, & Mekalanos, 2005](#)).

El SST3 está regulado en dos niveles: a nivel transcripcional y a partir de la iniciación de la secreción del mismo. Estos niveles están ligados a que la transcripción induce la activación del proceso de secreción ([Hauser, 2009](#); [McCaw, Lykken, Singh, & Yahr, 2002](#); [Yahr, Goranson, & Frank, 1996](#)), el cual permite que los componentes de secreción del SST3 sean producidos a altos niveles cuando se le necesite, seguido del contacto con las células del hospedero ([Hauser, 2009](#)). El desencadenamiento de la secreción es complejo y poco entendido, pero el estímulo fisiológico actúa por medio del contacto con las células del hospedero, mientras que

la señal de exposición más comúnmente utilizada en el laboratorio es la utilización de un medio deficiente de calcio ([Hauser, 2009](#); [Rietsch & Mekalanos, 2006](#)).

Algunas, pero no todas las proteínas secretadas por el SST3, tienen chaperonas, las cuales facilitan el almacenamiento de su proteína sustrato en el citosol bacteriano y son apropiadamente entregadas al aparato de secreción ([Hauser, 2009](#); [Parsot, Hamiaux, & Page, 2003](#)). SpsS (anteriormente llamada Orf1) sirve de chaperona tanto para ExoS y ExoT, la cual es requerida para una secreción máxima de estas proteínas ([Hauser, 2009](#); [Shen et al., 2008](#)). La chaperona de ExoU es SpsU, sin embargo, para ExoY no se ha identificado ([Hauser, 2009](#)).

A pesar de una caracterización extensa por diferentes grupos de trabajo, para el SST3 de *P. aeruginosa*, solo se han encontrado cuatro proteínas efectoras: ExoS, ExoT, ExoY y ExoU, estas búsquedas extensas se hacen debido a que en otras bacterias, el SST3 tiene varias proteínas efectoras (>3) por ejemplo, *Yersinia* Yop tiene 6 proteínas efectoras, *Salmonella* SPI1 posee > 13 proteínas efectoras, *Salmonella* SPI2 >10 y el sistema de *Shigella* cuenta con aproximadamente 25 proteínas efectoras ([Hauser, 2009](#)). Teóricamente, todas las *P. aeruginosa* portan los genes que codifican la maquinaria del SST3, sin embargo, la mayoría de las cepas no portan todos los genes codificantes de efectores ([Feltman et al., 2001](#); [Fleiszig et al., 1997](#); [Hauser, 2009](#)). En los aislados procedentes de infecciones agudas, el gen *exoS* se encuentra del 58-72%, *exoU* en 28-42%, *exoY* en 89% y *exoT* del 92-100%, por razones no completamente claras, casi todas las cepas tienen *exoS* o *exoU* pero no ambas ([Hauser, 2009](#)).

ExoS es una toxina bifuncional, tiene actividad de proteína activadora de GTPasa como actividad de adenosin difosfato ribosil transferasa. Esta proteína efectora tiene una estructura en el dominio modular que manifiesta la complejidad con la interacción con las células del hospedero. Como otras proteínas efectoras del SST3, posee en el extremo del amino terminal la información que identifica al aparato del SST3 ([Hauser, 2009](#)). Posterior a la inyección y activación, la actividad de adenin difosfato ribosil transferasa tiene un número de efectos adversos en las células del

hospedero incluyendo muerte celular, disrupción de la actina del citoesqueleto, inhibición de la síntesis de ADN, tráfico vesicular y endocitosis ([Barbieri, Sha, Bette-Bobillo, Stahl, & Vidal, 2001](#); [Fraylick, La Rocque, Vincent, & Olson, 2001](#); [Pederson & Barbieri, 1998](#); [Rocha, Coburn, Rucks, & Olson, 2003](#)). La disrupción irreversible podría suponer una reducción en la adherencia célula-célula y por lo tanto podría facilitar a *P. aeruginosa* la penetración a través de las membranas epiteliales ([Fraylick et al., 2001](#); [Pederson & Barbieri, 1998](#); [Rocha et al., 2003](#)). Se piensa que la muerte de las células inmunes del hospedero ocasionadas por ExoS permite persistir a *P. aeruginosa* en presencia de una respuesta exacerbada de respuesta inmune del hospedero, sin embargo, no queda del todo claro cuáles son las líneas celulares que son blanco de ExoS *in vivo* ([Hauser, 2009](#)).

ExoT comparte el 76% de identidad con la secuencia de aminoácidos de ExoS y, al igual que ella, es una proteína bifuncional con actividad de proteína activadora de GTPasa aminoterminal y adenosin difosfato ribosil transferasa. Similar a ExoS, los residuos de ExoT del 78-235 contienen actividad de GTPasa hacia Rac, Rho y Cdc42 ([Hauser, 2009](#); [Kazmierczak & Engel, 2002](#); [Krall, Schmidt, Aktories, & Barbieri, 2000](#)). Esta actividad parece ser muy similar a la actividad N-terminal de ExoS y por lo tanto, al igual que ella, causa disrupción del citoesqueleto de actina, el cual se manifiesta como redondez celular, también desprendimiento de las células, inhibición de la migración celular y fagocitosis ([Cowell, Chen, Frank, Vallis, & Fleiszig, 2000](#); [Garrity-Ryan et al., 2000](#); [Kazmierczak & Engel, 2002](#)). La actividad de proteína activadora de GTPasa de ExoT también contribuye a la inhibición de la citoquinesis a través de la inactivación de Rho ([Deng, Sun, & Barbieri, 2005](#); [Shafikhani & Engel, 2006](#)).

Estos factores de virulencia de *P. aeruginosa* están controlados por un sistema definido como percepción de quorum.

### 1.8 Percepción de quorum en *Pseudomonas aeruginosa*.

Algunos de los primeros acercamientos sobre el sistema de percepción de quorum se encuentran enlistados en los trabajos de Nealson en bacterias luminosas marinas *Aliivibrio fischeri* y *Vibrio harveyi* ([Hastings & Nealson, 1977](#); [Nealson & Hastings, 1979](#)) comenzando a dilucidar el papel simbiótico y ecológico que tenían estos microorganismos para la producción de bioluminiscencia, si bien, aún no se había otorgado propiamente el nombre a dicho fenómeno, si habían comenzado a dilucidar que en concentraciones altas, bajo condiciones de laboratorio, estas bacterias eran capaces de producir luz mediante la acción de la luciferasa la cual se encontraba codificada en el operón *luxCDABE* ([Engebrecht & Silverman, 1984](#); [Martin, Showalter, & Silverman, 1989](#)) y esto se debía a la acumulación y secreción de una molécula señal autoinductora ([Nealson & Hastings, 1979](#)). Conforme pasó el tiempo nuevos trabajos fueron encontrando otros casos donde la regulación de la expresión de genes estaba basada en la señalización célula-célula, algunos de ellos fueron la producción de antibióticos por *Streptomyces* spp. ([M. B. Miller & Bassler, 2001](#)), conjugación en *Enterococcus faecalis* ([Dunny, Brown, & Clewell, 1978](#)) y la formación de cuerpos fructíferos de *Myxococcus xanthus* ([Dworkin & Kaiser, 1985](#)). Esta forma de comunicación bacteriana fue clasificada, en un inicio, como algo anómalo, desde la perspectiva de que las bacterias no podían comunicarse de célula a célula.

En 1994, el Dr. W. Clayborne Fuqua, asigna el nombre de “*quórum sensing*” o sistema de percepción de quorum, al fenómeno social, el cual se refiere a la comunicación célula-célula dependiente de la densidad poblacional ([C. Fuqua & Greenberg, 1998](#); [W. C. Fuqua, Winans, & Greenberg, 1994](#)). La percepción de quórum, resulta ser un fenómeno adaptativo bacteriano ante la respuesta a un nuevo ambiente y esta característica le permite censar y responder a esas nuevas condiciones, lo cual resulta esencial para la patogénesis o sobrevivencia en determinado nicho ecológico ([Smith & Iglewski, 2003](#)). Para el caso de *Aliivibrio fischeri*, se identificaron los elementos responsables de la producción de bioluminiscencia, y como se mencionó anteriormente, se les denominó *lux*.



Posteriormente se encontraron tres elementos preponderantes en el control asociado de este sistema. Una proteína que sintetiza una molécula acilada específica (molécula autoinductora), que era LuxI, la cual está codificada por *luxI*; una proteína receptora que fija al ligando, denominada LuxR, la cual se encuentra codificada por *luxR* y juntos inician la cascada de inducción transcripcional de los genes de bioluminiscencia (imagen 18). De ahí que todos los homólogos encontrados en bacterias que respondían al sistema de percepción de quorum mediada por moléculas aciladas tengan una nomenclatura similar, donde se puntualiza cual es la sintasa, el regulador transcripcional y la molécula autoinductora. Este, canónicamente, es un mecanismo jerárquico, en donde se precisa la activación de un primer sistema y este a su vez puede controlar otros, además de orquestar la cascada de regulación génica. Dentro de los diversos microorganismos que poseen este sistema, *Aliivibrio fischeri*, *P. aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia carotovora* son los más entendidos y estudiados ([M. B. Miller & Bassler, 2001](#)).

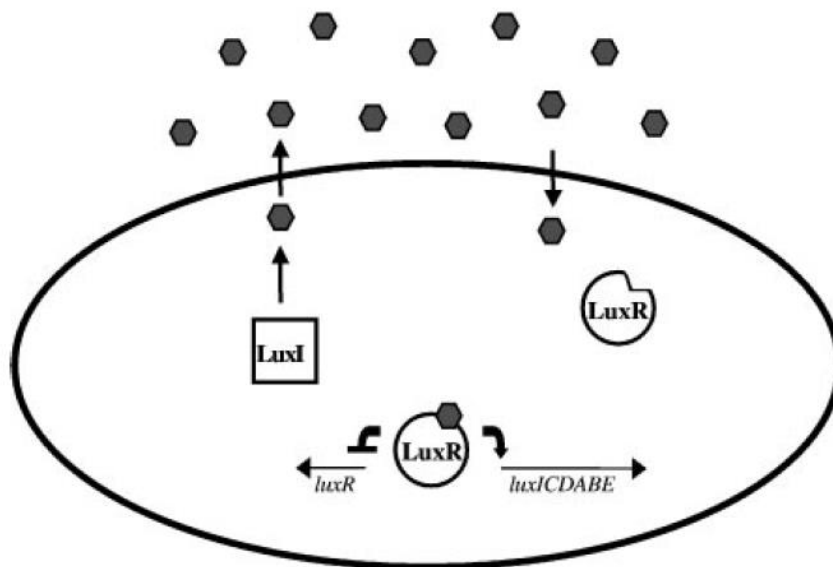


Imagen 18. Circuito del sistema de percepción de quórum de *Aliivibrio fischeri*. Consta de cinco genes estructurales para luciferasa (*CDABE*), dos genes reguladores, *luxI* y *luxR*; con sus respectivas proteínas codificadas. Los hexágonos representan a la molécula acilada producida por *Aliivibrio fischeri*, *N*-(3-oxohexanoil) homoserin lactona ([M. B. Miller & Bassler, 2001](#)).

Con el paso del tiempo, se comenzó a generar evidencia del sistema de percepción de quorum en otros grupos bacterianos, de tal manera que, además de describirse y estudiarse más a fondo el asociado a homoserin lactonas, el cual se encuentra en gran parte de las *Proteobacteria*, se encontraron en Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, mecanismos de comunicación, en donde el autoinductor difiere de las acil homoserin lactonas (AHL), siendo el autoinductor pequeños oligopéptidos, mientras que otras *Proteobacteria*, además del sistema AHL se han encontrado autoinductores denominados autoinductores tipo 2 (AI-2). En la imagen 19 se esquematizan algunos de los autoinductores presentes en diferentes bacterias.

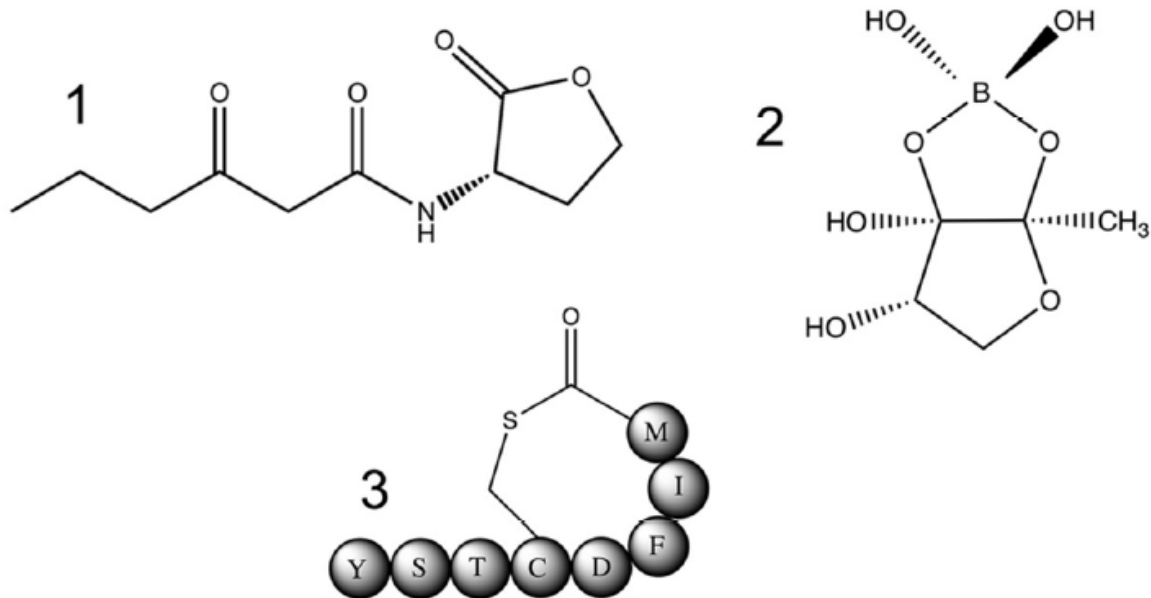


Imagen 19. Ejemplos de autoinductores. 1) *N*-3 oxo-acil-homoserinlactona, autoinductor de *Aliivibrio fischeri*, 2) Autoinductor tipo 2, presente en *Vibrio harveyi* y *Vibrio cholerae*. 3) péptido autoinductor (AIP) presente en *Staphylococcus aureus*. Imagen tomada de ([Abisado, Benomar, Klaus, Dandekar, & Chandler. 2018](#)).

Las bacterias poseen diversos procesos necesarios para su supervivencia: producción de biopelículas, secreción de factores de virulencia, bioluminiscencia, producción de antibióticos, esporulación, competencia para la captación de ADN, entre otros. Es a través del sistema de percepción de quorum que las bacterias



pueden sincronizar la expresión génica en respuesta a los cambios en la densidad celular, complejidad de especies y necesidades del microambiente. Se puede decir que existen dos tipos de programas para la expresión de genes, uno es favorecido a baja densidad celular, este parámetro o esta condición fisiológica es requerida para el comportamiento como individuos, como unidad, por otro lado, para un comportamiento social, el programa seleccionado es aquel que favorece la densidad celular elevada, es aquí donde se sincroniza la expresión génica ([Ng & Bassler, 2009](#); [Parsek & Greenberg, 2005](#)).

Los pasos genéricos involucrados en la respuesta a las fluctuaciones en el número de células bacterianas son análogos en todos los sistemas conocidos del sistema de percepción de quórum.

1. Autoinductores (moléculas de bajo peso molecular) son sintetizados intracelularmente.
2. Los autoinductores son liberados (pasiva o activamente) al exterior de la célula bacteriana. Conforme el número de bacterias aumenta, la concentración de autoinductores en el macroambiente también se irá elevando, y volverán a ingresar al citoplasma de las células.
3. Cuando los autoinductores rebasan el umbral mínimo requerido para su detección, los receptores se unen a los autoinductores y de esta manera se desencadena una cascada de señales de transducción que resulta en cambios poblacionales en toda la expresión génica.

De esta forma, el sistema de percepción de quórum permite a las células de una población actuar de manera unánime y al hacerlo, se lleva a cabo un comportamiento colectivo (imagen 20) ([Ng & Bassler, 2009](#)).

En bacterias Gram negativas, la clase de autoinductores más comunes son las acil homoserin lactonas (AHL), estas poseen un núcleo de anillo de lactona *N*-acilado y una cadena acil de 4-8 átomos de carbono las cuales pueden contener modificaciones (imagen 21, tabla 7). Cientos de especies bacterianas contienen

sintasas del tipo LuxI que producen estas AHL. La longitud de la cadena puede afectar la estabilidad, lo que podría tener consecuencias en las dinámicas de señalización ([Papenfort & Bassler, 2016](#));([Case, Labbate, & Kjelleberg, 2008](#); [W. R. Galloway, Hodgkinson, Bowden, Welch, & Spring, 2011](#); [von Bodman, Willey, & Diggle, 2008](#)).

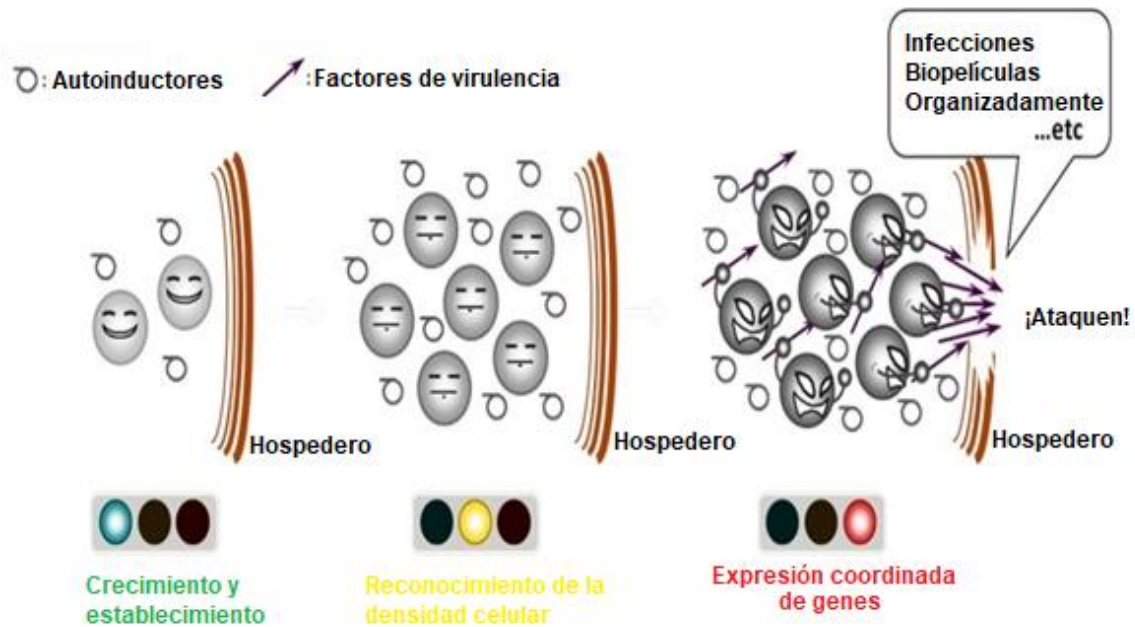


Imagen 20. Expresión de genes dependientes de la densidad celular en el sistema de percepción de quórum (ejemplo: factores de virulencia). Imagen adaptada y tomada de ([Priya, 2018](#))

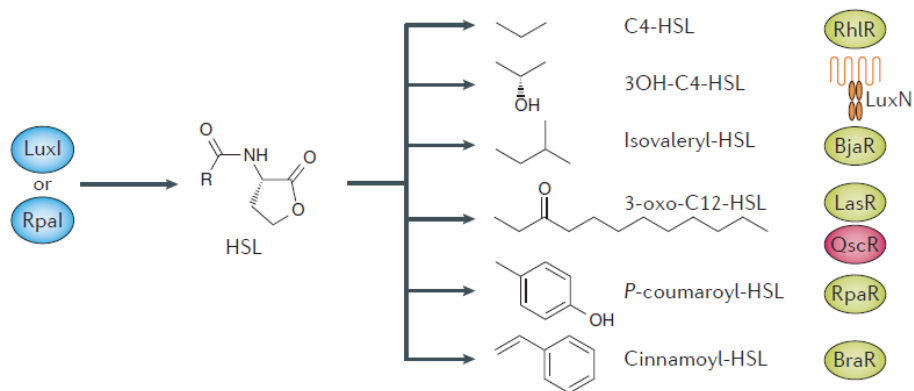


Imagen 21. Sintetas, autoinductores y receptores del sistema de percepción de quórum. Autoinductores AHL que son producidos por diferentes bacterias Gram negativas.

Genoma	No. de homólogos de LuxI	No. de homólogos de LuxR
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> AAC00-1	1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	1	1
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966	1	2
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	1	2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	1	5
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1	3
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	3	4
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	1	1
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	1	3
<i>B. cenocepacia</i> HI2424	1	3
<i>B. cepacia</i> AMMD 2 5	2	5
<i>B. mallei</i> ATCC 23344	2	5
<i>B. mallei</i> NCTC 10229 2 5	2	5
<i>B. mallei</i> NCTC 10247	2	4
<i>B. mallei</i> SAVP1	1	2
<i>B. pseudomallei</i> 1106a	3	5
<i>B. pseudomallei</i> 1710b	3	6
<i>B. pseudomallei</i> 668	3	5
<i>B. pseudomallei</i> K96243	3	6
<i>Burkholderia</i> sp. 383	1	2
<i>B. thailandensis</i> E264	3	7
<i>B. vietnamiensis</i> G4	3	3
<i>B. xenovorans</i> LB400	2	3
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	1	1
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Atroseptica</i> SCRI1043	1	2
<i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4 <i>Jannaschia</i> sp. CCS1	1	1
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	4	4
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	1	2
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	2	3
<i>Aliivibrio fischeri</i> ES114	1	1
<i>Y. pestis</i> Antiqua	2	2
<i>Y. pestis</i> CO92	2	2
<i>Y. pestis</i> Nepal516	2	2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 32953	2	2

Genoma	No. de homólogos de LuxI	No. de homólogos de LuxR
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	3	3
<i>N. winogradskyi</i> Nb-255	1	1
<i>Nitrospira multififormis</i> ATCC 25196	1	1
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	1	2
<i>P. aeruginosa</i> PA7	2	3
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	2	4
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	2	4
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448 <sup>a</sup>	1	3
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	1	3
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	1	3
<i>Ralstonia solanacearum</i> GM11000	2	2
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	3	9
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	3	7
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	1	2
<i>R. sphaeroides</i> ATCC 17025	1	2
<i>R. sphaeroides</i> ATCC 17029	1	4
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	1	2
<i>R. palustris</i> BisB18	2	3
<i>R. palustris</i> BisB5	2	2
<i>R. palustris</i> CGA009	1	1
<i>R. palustris</i> HaA2	2	2
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	1	1
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114	1	2
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	1	1
<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3	2	5
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	3	7
<i>S. meliloti</i> 1021	1	5
<i>Sodalis glossinidius morsitans</i>	1	2
<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	1	3
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>Enterocolitica</i> 8081	1	2
<i>Y. pestis</i> bv. <i>Microtus</i> 91001	2	2
<i>Y. pestis</i> KIM	2	2
<i>Y. pestis</i> <i>Pestoides</i> F	1	2

Tabla 7. Genomas bacterianos que poseen redes del sistema de percepción de quórum portadores de AHL. Tabla adaptada de (Case et al., 2008).

*P. aeruginosa* posee dos autoinductores AHL canónicos (3-oxo-dodecanoil homoserin lactona y butiril homoserin lactona) y otros autoinductores no asociados al sistema AHL. Dipéptidos cíclicos (2, 5-dicetopiperazinas; KPDs) son generados por t-ARN dependiente de la ciclopéptido sintasa. Una quinolona (2-heptil-3hidroxi-4-quinolona, conocida como PQS) es utilizada también como autoinductor. Esta última es producida por proteínas que codifican los genes *pqsABCDH* y en conjunto con los dos autoinductores AHL, controlan la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia ([J. Lee & Zhang, 2015](#)).

En *P. aeruginosa*, LasR, homóloga de LuxR, fue inicialmente descrita como un regulador de la expresión del gen *lasB* que codifica para la elastasa ([Gambello & Iglewski, 1991](#); [J. Lee & Zhang, 2015](#)). Posteriormente, se descubrió que LasR es requerida también para la transcripción de *aprA*, *lasA* y *toxA*, por lo que se pensó que el papel que tenía LasR era el de un regulador global de los genes de virulencia ([Gambello & Iglewski, 1991](#); [Gambello, Kaye, & Iglewski, 1993](#); [J. Lee & Zhang, 2015](#)). Por otro lado, LasI, la sintasa (equivalente de LuxI en *P. aeruginosa*) se propuso como la responsable de la síntesis de las moléculas de AHL con propiedades autoinductoras y además con la capacidad de regular la elastasa ([Jones et al., 1993](#)). Un año después, Pearson y colaboradores describieron la molécula autoinductora, definida inicialmente como PAI (por sus siglas en inglés *Pseudomonas autoinducer*), la cual, mediante caracterización por espectrometría de masas correspondía a *N*-3-oxo-dodecanoil homoserin lactona (3OHSL) ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Pearson et al., 1994](#)). Hoy sabemos, puntualmente, donde se encuentran localizados los genes que codifican, tanto para *lasR* como para *lasI* en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1. Para el caso de la sintasa, *lasI*, la localización es en la hebra positiva con coordenadas genómicas que van del nucleótido 1559254-1559859, el gen estructural tiene una longitud de 605 pb. El locus con el cual se identifica es el PA1432 (imagen 22). La proteína codificada, LasI, tiene un peso molecular de 22.7 kDa y un punto isoeléctrico de 6.52 ([Winsor et al., 2016](#)). Por otro lado, el gen que codifica para el regulador transcripcional, *lasR*, se encuentra identificado como el locus PA1430, tiene una longitud de 720 pb y se

encuentra localizado en la hebra positiva entre los nucleótidos 1558171-1558890. La proteína que es codificada, LasR, tiene un peso molecular de 26.6 kDa y un punto isoeléctrico de 6.51 ([Winsor et al., 2016](#)).

No pasó mucho tiempo, cuando se descubrió una segunda molécula autoinductora, la cual se observó que no interactuaba con la proteína LasR directamente, la cual fue caracterizada como *N*-butiril homoserin lactona (4HSL) ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Pearson, Passador, Iglewski, & Greenberg, 1995](#)). En estos experimentos se demostró que 4HSL no tenía la capacidad de interactuar con LasR directamente para la expresión de *lasB* ni su regulación ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Pearson et al., 1995](#)).

En ese mismo año se describió el receptor de 4HSL por el grupo de Ochsner. Se determinó que la proteína reguladora era RhlR, la cual era codificada por la ramnolípido sintetasa, la cual se encuentra en el clúster de genes *rhlABR* ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Ochsner & Reiser, 1995](#)). En cuanto a la localización de la sintasa que produce la molécula autoinductora, corresponde a un homólogo de *luxI* y *lasI*, mientras que su localización genética se encuentra río arriba del operón *rhlABR* ([Ochsner & Reiser, 1995](#)).

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1

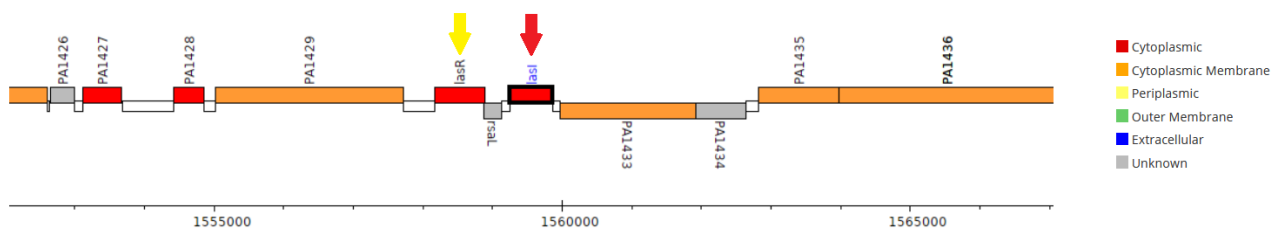


Imagen 22. Localización genética de los genes codificantes para las proteínas LasI (sintasa, flecha roja) y LasR (regulador transcripcional, flecha amarilla). Imagen tomada de ([Winsor et al., 2016](#)).

En lo que corresponde a la localización de los genes que codifican para las proteínas del sistema Rhl, para el caso de la sintasa, esta se encuentra localizada en la hebra negativa, entre los nucleótidos 3889139-3889744, posee una longitud de 606 pb y se encuentra identificada como el locus PA3476. La proteína codificada

tiene un peso de 22.6 kDa y un punto isoeléctrico de 5.29, por otro lado, el gen *rhIR* se encuentra identificado como el locus PA3477 en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, posee una longitud de 726 pb y se encuentra entre los nucleótidos 3889925-3890650. Codifica una proteína de 27.6 kDa cuyo punto isoeléctrico es de 7.19 (imagen 23) ([Winsor et al., 2016](#)).

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1

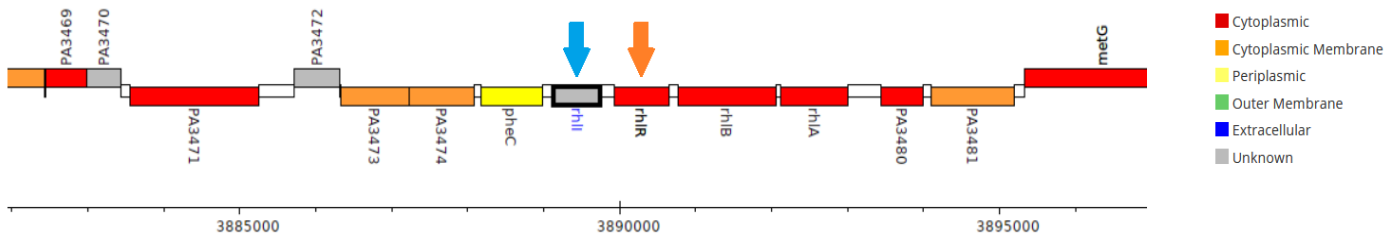


Imagen 23. Localización genética de los genes codificantes para las proteínas RhII (sintasa, flecha azul) y RhIR (regulador transcripcional, flecha naranja). Imagen tomada de ([Winsor et al., 2016](#)).

Con el advenimiento de estos descubrimientos, nuevas investigaciones se comenzaron a realizar, poniendo énfasis en la función, regulación y mecanismos moleculares por los cuales los sistemas Las y Rhl activan la expresión de genes que responden al sistema de percepción de quórum. Se observó la formación de complejos entre los autoinductores con las respectivas proteínas reguladoras (LasR-3OC12HSL y RhIR-C4HSL). Estos complejos se unen a cajas *las-rhl*, las cuales son regiones conservadas y que residen en los promotores de los blancos, llevándose de esta manera la expresión transcripcional ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Schuster & Greenberg, 2007](#); [Whiteley & Greenberg, 2001](#); [Whiteley, Lee, & Greenberg, 1999](#)). La realización de estudios transcriptómicos basados en mutantes de *lasI* y *rhII* revelaron que los regulones están continuos (imágenes 22 y 23) con algunos genes que responden a 3OC12HSL (ej. *lasA*), algunos con especificidad a C4HSL (ej. *rhlAB*) y algunos otros responden bien a ambos ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Schuster & Greenberg, 2006](#); [Schuster, Lostroh, Ogi, & Greenberg, 2003](#)). Estos genes constituyen cerca del 10% del genoma de *P. aeruginosa* e incluyen una gran parte de los procesos fisiológicos y fenotipos de virulencia ([J. Lee & Zhang, 2015](#);

[Schuster & Greenberg, 2006](#)). En la tabla 8 se enlistan algunos de los genes de virulencia controlados por el sistema de percepción de quórum.

<i>Genes regulados por el sistema de percepción de quórum</i>	<i>Proteína o factor de virulencia</i>	<i>Efectos en el hospedero durante la infección</i>	<i>Beneficios para P. aeruginosa.</i>
<i>lasB</i>	Elastasa	Degradación de la elastina, colágeno y otras proteínas de la matriz.	Adquisición de hierro extracelular proveniente de las proteínas del hospedero.
<i>lasA</i>	Proteasa	Ruptura de la barrera epitelial	Actividad estafilolítica, evasión de la respuesta inmune del hospedero, permite la colonización.
<i>toxA</i>	Exotoxina A	Muerte celular	Establecimiento de la infección, permite la colonización.
<i>aprA</i>	Proteasa alcalina	Degradación del complemento y citosinas.	Evasión de la respuesta inmune, persistencia de la colonización.
<i>rhlAB</i>	Ramnosil transferasas (ramnolípidos)	Necrosis de los macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos del hospedero.	Evasión de la respuesta inmune, desarrollo de biopelículas.
<i>lecA</i>	Lectina (lectina galactofílica)	Parálisis de los cilios de la vía respiratoria	Establecimiento de la infección, permite la colonización.
<i>hcnABC</i>	Ácido cianhídrico	Arresto de la respiración celular, disminución de la función pulmonar	Permite la colonización
<i>phzABCDEFG, phzM</i>	Piocianina	Efectos oxidativos en la respiración celular del hospedero, estrés oxidativo.	Establecimiento de la infección, permite la colonización, evasión de la respuesta inmune.

Tabla 8. Algunos genes que codifican factores de virulencia en *P. aeruginosa* y que se encuentran regulados por el sistema de percepción de quórum. ([J. Lee & Zhang, 2015](#)).

El sistema de percepción de quorum en *P. aeruginosa*, canónicamente, responde a un sistema jerárquico, con LasR en la cima de la cascada. El complejo formado por LasR-3OC12HSL también activa la expresión de *rhlR* y *rhlI*, los cuales codifican para la segunda ruta del sistema de percepción de quórum, asimismo los genes *pqsR* y el operón *pqsABCDH*, los cuales codifican para el segundo sistema (no asociado a las acil homoserin lactonas), PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) ([J. Lee & Zhang, 2015](#); [Papenfert & Bassler, 2016](#); [Ventre et al., 2003](#)). En la imagen 24 se puede



observar el sistema canónico de *P. aeruginosa* y el circuito de interacción entre los regulones.

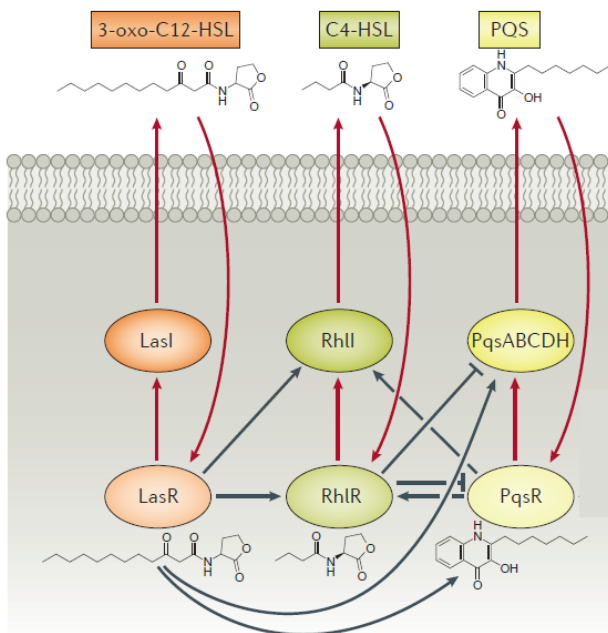


Imagen 24. A) Perspectiva general de los circuitos del sistema de percepción de quórum en *P. aeruginosa* (Papenfort & Bassler, 2016).

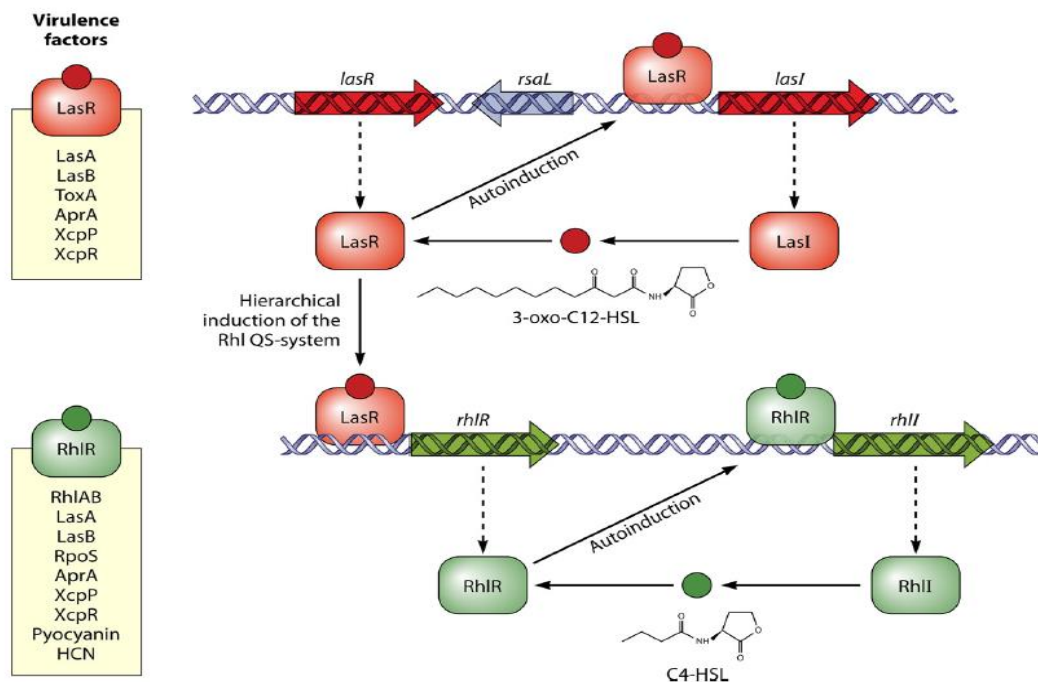


Imagen 24. B) Interacción de los sistemas Las y Rhl y proteínas involucradas en su control (Jimenez et al., 2012).



## 1.9 Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*.

*P. aeruginosa* posee, como ya se ha comentado previamente, un amplio arsenal y estrategias para poder subsistir en un nicho determinado, adecuándolo a sus necesidades, pero también tiene la capacidad de responder con diversas estrategias a microambientes nocivos para su existencia. Una de esas estrategias es poder responder a la presencia de antibióticos. La resistencia en *P. aeruginosa* la podemos estudiar en dos formas:

1. Resistencia intrínseca
2. Resistencia adquirida

### 1.9.1 Resistencia intrínseca.

#### 1.9.1.1 Permeabilidad de la membrana externa

Una de las características fisicoquímicas de los antibióticos es tener la capacidad de poder atravesar la membrana externa para poder llevar a cabo su acción en los sitios blancos ([Lambert, 2002](#)). Antibióticos como aminoglicósidos (tobramicina, gentamicina y amikacina) poseen esta capacidad, una vez que atraviesan la membrana, estos antibióticos se unen a la subunidad ribosomal 30S ([Mingeot-Leclercq, Glupczynski, & Tulkens, 1999](#)). Al hacer esto la síntesis de proteínas queda interrumpida. Por otro lado, las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) interfieren con la replicación del ADN mediante la inhibición de ADN girasa y la topoisomerasa IV ([Aldred, Kerns, & Osheroff, 2014](#); [Pang et al., 2019](#)). Por otro lado, una de las familias más conocidas y utilizadas, los  $\beta$ -lactámicos, donde se encuentra la penicilina, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámico, contiene un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura molecular, esta familia bloquea la síntesis de la pared celular debido a que se une con la proteína fijadora de penicilinas (PBP por sus siglas en inglés) las cuales se encuentran involucradas en la síntesis de peptidoglucanos ([Pang et al., 2019](#); [K. Poole, 2004](#)). Otro de los antibióticos con actividad antipseudomónica son los pertenecientes a la familia de las polimixinas, estos antibióticos son polipéptidos que se unen al LPS sobre la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas,

permitiendo que se incremente la permeabilidad de la membrana causando lisis celular ([Pang et al., 2019](#); [Zavascki, Goldani, Li, & Nation, 2007](#)).

La membrana externa funciona como una barrera selectiva que previene que los antibióticos entren, es una bicapa fosfolipídica asimétrica y LPS, se encuentra embebida por porinas que forman canales de barriles  $\beta$  ([Delcour, 2009](#)), las cuales se pueden dividir en 4 clases:

- a) Porinas no específicas: permiten la difusión de la mayoría de las pequeñas moléculas hidrofílicas.
- b) Porinas específicas: poseen sitios específicos para unir a un conjunto particular de moléculas.
- c) Porinas cerradas: proteínas de membrana externa que son reguladas por iones y son responsables de la captación de complejos iónicos.
- d) Porinas de eflujo: componentes importantes de las bombas de flujo.

En *P. aeruginosa*, la proteína OprF es la mayor porina no específica. OprB, OprD, OprE, OprR y OprP son porinas específicas; OprC y OprH pertenecen a la clase de porinas cerradas, por último, las porinas de eflujo reportadas son OprM, OprN y OprJ ([Hancock & Brinkman, 2002](#); [Pang et al., 2019](#); [Welte, Nestel, Wacker, & Diederichs, 1995](#)).

La permeabilidad de la membrana de *P. aeruginosa* es extremadamente restrictiva, es entre 12-100 veces menor que en el caso de la que tiene *Escherichia coli* ([Bellido, Martin, Siehnel, & Hancock, 1992](#); [Hancock & Brinkman, 2002](#); [Pang et al., 2019](#)). OprF, homóloga de la proteína de membrana externa, proteína A (OmpA) en *Escherichia coli*, es la porina predominante en *P. aeruginosa* y es la responsable para la captación no específica de iones, sacáridos (incluyendo trisacáridos y tetrasacáridos), pero tiene baja eficiencia para la permeabilidad de antibióticos ([Bellido et al., 1992](#); [Nikaido, Nikaido, & Harayama, 1991](#); [Pang et al., 2019](#)). OprF es capaz de plegarse en dos confórmeros: el confórmero cerrado de dos dominios, el cual consiste en un barril  $\beta$  N-terminal transmembranal y un dominio globular

periplásmico C-terminal, y el confórmero de dominio abierto el cual contiene un simple dominio transmembranal. El confórmero cerrado es la estructura dominante de los canales de OprF y solo una pequeña fracción de la forma de OprF (5% de la población) como canal abierto ([Nestorovich, Sugawara, Nikaido, & Bezrukov, 2006](#); [Pang et al., 2019](#)). La presencia, mayormente, de canales OprF cerrados podría explicar por qué la permeabilidad de la membrana externa de *P. aeruginosa* es menor en comparación con otras bacterias, adicionalmente, la ausencia de OprF permite que se incremente la formación de biopelículas a través de regulación a la alza de bi-(3'-5') monofosfato de guanosina cíclico dimérico, el cual es un importante mensajero para el control en la formación de biopelículas ([Bouffartiques et al., 2015](#); [Pang et al., 2019](#)). Como se mencionó previamente, *P. aeruginosa* posee un número de porinas específicas, entre las que se incluyen: porina carbohidrato específica OprB, aminoácido básico específico OprD, porina fosfato específico OprP y la porina pirofosfato específico OprO ([Hancock & Brinkman, 2002](#)). De estas porinas, OprD se encuentra involucrada en la captación de antibióticos, esta contiene sitios para la unión de carbapenémicos, por lo que la ausencia de esta porina en *P. aeruginosa* incrementa la resistencia a esta clase de antibióticos ([H. Li, Luo, Williams, Blackwell, & Xie, 2012](#); [Pang et al., 2019](#)). Además, OprH es la porina más pequeña y la sobreexpresión de la misma, como consecuencia de deficiencia de Mg<sup>2+</sup>, se ha visto asociada con un incremento en la resistencia a polimixina B y gentamicina como resultado de la estabilización de la membrana externa por modificaciones en el LPS ([Bell, Bains, & Hancock, 1991](#); [Macfarlane, Kwasnicka, Ochs, & Hancock, 1999](#); [Pang et al., 2019](#)).

#### 1.9.1.2 Bombas de eflujo

Las bombas de flujo juegan un papel importante en la expulsión de compuestos tóxicos para las células bacterianas, estas pueden ser clasificadas en cinco familias: 1) familia resistencia-nodulación-división (RND), súper familia facilitador mayor (MFS por sus siglas en inglés *major facilitator superfamily*), súper familia casete de unión al ATP (ABC por sus siglas en inglés *ATP-binding cassette*), familia pequeña multidrogresistencia (SMR por sus siglas en inglés *small multidrug resistance*) y

familia de extrusión de compuestos multidrogo y tóxicos (MATE por sus siglas en inglés *multidrug and toxic compound extrusion*) (imagen 25) ([Pang et al., 2019](#); [Sun, Deng, & Yan, 2014](#)).

En particular, las proteínas que pertenecen a la familia de bombas de flujo RND, juegan un rol importante en la resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* ([X. Z. Li et al., 1995](#); [Pang et al., 2019](#)). Estas consisten en transportadores de membrana citoplasmática, proteínas enlazadoras periplásmicas y proteínas externas del canal de porina de membrana ([Daury et al., 2016](#)). Los componentes periplásmicos y citoplasmáticos de las bombas RND de *P. aeruginosa* son llama multidrogo eflujo (Mex por sus siglas en inglés, *multidrug efflux*) y la proteína de membrana externa es llamada Opr, *P. aeruginosa* expresa 12 bombas de la familia RND, cuatro de las cuales contribuyen a la resistencia de antibióticos (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM). MexAB-OprM es responsable de la expulsión de  $\beta$ -lactámicos y quinolonas, MexCF-OprJ es responsable del eflujo de  $\beta$ -lactámicos, MexEF-OprN expulsa quinolonas mientras que MexXY-OprM es capaz de sacar aminoglicósidos. En *P. aeruginosa* se han reportado la presencia de varias bombas de eflujo de manera simultánea y la sobreexpresión de la misma se ha asociado desde la resistencia ampliada hasta la multidrogorresistencia ([Cabot et al., 2011](#); [Dreier & Ruggerone, 2015](#); [Dupont, Hocquet, Jeannot, Chavanet, & Plesiat, 2005](#); [Hocquet et al., 2003](#); [Llanes et al., 2011](#); [Masuda et al., 2000](#); [Okamoto, Gotoh, & Nishino, 2002](#); [Pang et al., 2019](#)).

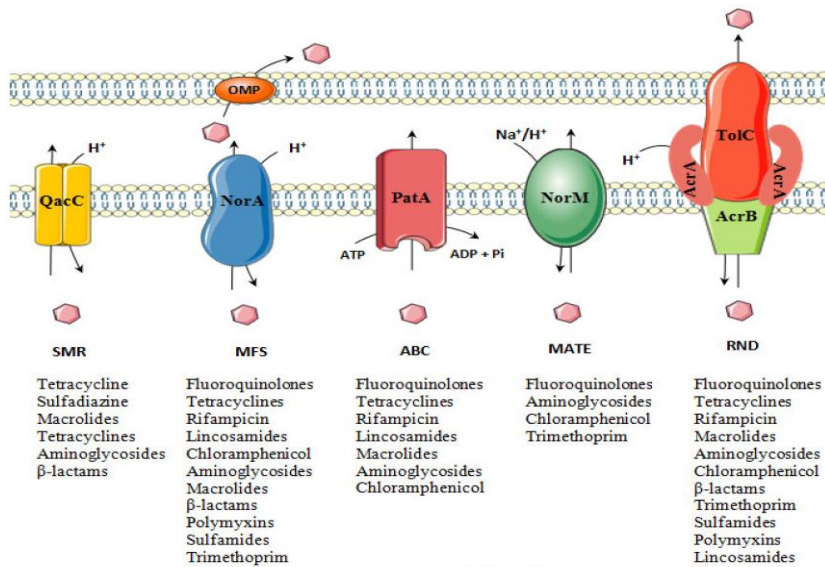


Imagen 25. Representación de las 5 familias de bombas de eflujo presentes en bacterias y familias de antibióticos que son expulsadas por ellas. Imagen tomada de ([Yilmaz & Ozcengiz, 2017](#)).

### 1.9.1.3 Enzimas inactivadoras de antibióticos

La producción de enzimas que hidrolizan o modifican los antibióticos es uno de los principales mecanismos de resistencia intrínseca que tienen las bacterias. Muchos de los antibióticos tienen enlaces químicos como amidas o ésteres que son susceptibles a la hidrólisis ([Pang et al., 2019](#); [G. D. Wright, 2005](#)) por enzimas comúnmente producidas por *P. aeruginosa* como lo son β-lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglicósidos ([Pang et al., 2019](#); [K. Poole, 2005](#); [Wolter & Lister, 2013](#)).

Al igual que otros Gram negativos, *P. aeruginosa* posee *ampC* inducible, el cual codifica para una β-lactamasa AmpC, esta enzima es capaz de romper el anillo β-lactámico, de esta manera se inactivan algunos antibióticos de esta familia ([Pang et al., 2019](#); [G. D. Wright, 2005](#)). De acuerdo a la clasificación de Ambler, la cual se basa en la homología de secuencias de las β-lactamasas, estas se clasifican en 4 grupos, A, B, C y D. las de clase A, C y D tienen un residuo de serina como sitio hidrolítico de los β-lactámico, llamadas también serino β-lactamasas, mientras que las de clase B requieren Zn<sup>2+</sup> como cofactor para realizar su acción hidrolítica ([Bush & Jacoby, 2010](#); [Pang et al., 2019](#)). AmpC de *P. aeruginosa*, pertenece al grupo C, la clase D está integrada por enzimas tipo OXA, las cuales fueron inicialmente identificadas en *P. aeruginosa* ([Rawat & Nair, 2010](#)). Las β-lactamasas de espectro

extendido se encuentra mayoritariamente clasificadas en el grupo A y tienen un amplio rango de resistencia a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas y aztreonam ([Paterson & Bonomo, 2005](#); [Rawat & Nair, 2010](#)). Para combatir la actividad de las  $\beta$ -lactamasas, se crearon estrategias con inhibidores de estas enzimas en combinación con un  $\beta$ -lactámico para hacer un efecto sinérgico. Algunos de los inhibidores son ácido clavulánico y tazobactam ([Drawz & Bonomo, 2010](#); [Pang et al., 2019](#)).

Los aminoglicósidos, los cuales contienen un anillo amociclitol unido al azúcar amino por enlaces glucosídicos ([Pang et al., 2019](#); [Ratjen, Brockhaus, & Angyalosi, 2009](#)) son un grupo de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, la resistencia asociada a esta familia de antibiótico es ocasionada por múltiples factores como la reducción en la permeabilidad de la membrana, incremento de las bombas de flujo, cambios ribosomales y enzimas modificadoras. Entre estos mecanismos, la modificación enzimática de los grupos amino y glicósido en la estructura molecular juega un importante papel en la resistencia a este grupo de antibióticos ([Pang et al., 2019](#); [Ratjen et al., 2009](#)). Los tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglicósidos que han sido descubiertas en bacterias son: aminoglicósido fosfotransferasa (APH por sus siglas en inglés), aminoglicósido acetiltransferasa (AAC) y aminoglicósido nucleotidiltransferasa (ANT) ([Ramirez & Tolmasky, 2010](#)). En *P. aeruginosa* APH es quien se encarga de la transferencia de un grupo fosforil a el 3'-hidroxil de los aminoglicósidos como kanamicina, neomicina y estreptomina permitiendo de esta forma la inactivación de estos antibióticos ([Hachler, Santanam, & Kayser, 1996](#); [Hainrichson et al., 2007](#); [Pang et al., 2019](#); [K. Poole, 2005](#)). Por otro lado las AAC de *P. aeruginosa* transfieren un grupo acetil por un grupo amino en la posición 3' y 6' de los aminoglicósidos, dicho cambio es el responsable de la inactivación de la gentamicina, tobramicina, netilmicina, kanamicina y amikacina ([Pang et al., 2019](#); [K. Poole, 2005](#)), por otro lado ANT confiere resistencia a gentamicina, amikacina y tobramicina mediante la transferencia de un adenililo al grupo amino o hidroxilo de los aminoglicósidos ([Jacoby et al., 1990](#); [Pang et al., 2019](#); [Subedi, Vijay, & Willcox, 2018](#)).

### 1.9.2 Resistencia adquirida.

Las bacterias pueden ganar resistencia a antibióticos a través de cambios mutacionales o adquisición de genes de resistencia mediante la transferencia horizontal de los mismos ([Munita & Arias, 2016](#); [Pang et al., 2019](#)). Aunado a la alta resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* la presencia de resistencia adquirida origina aislados clínicos multidrogoresistentes, lo cual complica la erradicación de estos microorganismos y permite el aumento de casos de infecciones persistentes ([Henrichfreise, Wiegand, Pfister, & Wiedemann, 2007](#); [Pang et al., 2019](#)).

#### 1.9.2.1 Resistencia por mutaciones

Los cambios mutacionales son capaces de reducir la captación de antibióticos, por modificación de los genes blancos, sobreexpresión de bombas de eflujo y enzimas inactivadoras de antibióticos, permitiendo la supervivencia de las bacterias en presencia de moléculas antimicrobianas ([Munita & Arias, 2016](#); [Pang et al., 2019](#)). Mutaciones espontáneas pueden afectar la expresión o función de porinas, reduciendo la permeabilidad de la membrana y aumentando la resistencia en la célula bacteriana ([Fernandez & Hancock, 2012](#); [Pang et al., 2019](#)). Una deficiencia en OprD en *P. aeruginosa* confiere altos niveles de resistencia a carbapenémicos, especialmente a imipenem ([Fang et al., 2014](#); [X. Z. Li & Nikaido, 2009](#); [Pang et al., 2019](#); [Wolter, Hanson, & Lister, 2004](#)).

La sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM ocurre como consecuencia de mutaciones en los represores transcripcionales *mexR*, *nalB*, *nalC* o *nalD*, y permite la resistencia bacteriana contra los  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas ([Braz, Furlan, Fernandes, & Stehling, 2016](#); [Pang et al., 2019](#); [Saito, Yoneyama, & Nakae, 1999](#); [Srikumar, Paul, & Poole, 2000](#); [Tian, Yi, Cho, O'Gara, & Wang, 2016](#)). La mutación de *mexZ* produce la sobreexpresión de MexXY-OprM se asocia con el incremento en la resistencia a aminoglicósidos,  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas en aislados clínicos de *P. aeruginosa* ([Baum et al., 2009](#); [Guenard et al., 2014](#)), mientras que las mutaciones en *nfxB*, el cual codifica para un regulador transcripcional propicia la sobreexpresión de MexCD-OprJ reduciendo la



susceptibilidad a  $\beta$ -lactámicos y carbapenémicos ([Okamoto et al., 2002](#); [Pang et al., 2019](#); [K. Poole et al., 1996](#)). Existen otras mutaciones asociadas a la modificación de los sitios blanco como lo es el caso de resistencia a fluoroquinolonas, estas mutaciones están presentes en los genes que codifican para la DNA girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) lo que provoca una disminución en el sitio de unión de las fluoroquinolonas ([Aldred et al., 2014](#); [Bruchmann, Dotsch, Nouri, Chaberny, & Haussler, 2013](#); [Munita & Arias, 2016](#); [Pang et al., 2019](#)). Asimismo, existen aislados con mutaciones ribosomales las cuales producen altos niveles de resistencia a aminoglicósidos dado que esta familia de antibióticos inhibe la síntesis de proteínas debido a que el blanco es la subunidad ribosomal 30S ([El'Garch, Jeannot, Hocquet, Llanes-Barakat, & Plesiat, 2007](#); [Pang et al., 2019](#)). La resistencia a miembros de la familia de las polimixinas se debe a mutaciones en el sistema de dos componentes PhoPQ/PhoA lo que promueve la adición de aminoarabinosa al lípido A ([Boll, Radziejewska-Lebrecht, Warth, Krajewska-Pietrasik, & Mayer, 1994](#); [A. K. Miller et al., 2011](#); [Owusu-Anim & Kwon, 2012](#); [Pang et al., 2019](#)).

Como ya se había mencionado previamente, *P. aeruginosa* tiene intrínsecamente una  $\beta$ -lactamasa del grupo C, codificada por el gen *ampC*, las mutaciones en este gen conllevan a la hiperproducción de AmpC lo que promueve la resistencia a las cefalosporinas ([Berrazeg et al., 2015](#); [Pang et al., 2019](#)), mientras que mutaciones en el represor de la expresión de *ampC*, *ampD*, también conlleva a la hiperproducción de esta  $\beta$ -lactamasa ([Juan et al., 2005](#); [Pang et al., 2019](#)).

#### 1.9.2.2 Resistencia por genes adquiridos

Los genes de resistencia pueden estar presente y ser portados por plásmidos, transposones, integrones y profagos. Las bacterias pueden adquirir estos genes por transferencia horizontal y una vez que los poseen pueden pasarlos a las siguientes generaciones de manera vertical (imagen 26) ([Breidenstein, de la Fuente-Nunez, & Hancock, 2011](#); [Pang et al., 2019](#)). Sin duda alguna, estas cualidades de las bacterias para adquirir este tipo de genes representan uno de los retos más grandes



en salud pública, esto debido a la facilidad con la que estos genes pueden diseminarse de especie a especie.

Los integrones son elementos genéticos que se insertan en casetes genéticos móviles dentro de sitios específicos vía recombinación sitio-específica ([R. M. Hall & Collis, 1995](#); [Pang et al., 2019](#)) los cuales tienen un rol importante en la diseminación de resistencia a antibióticos entre *P. aeruginosa* ([J. Chen et al., 2009](#); [Khosravi, Motahar, & Abbasi Montazeri, 2017](#); [Odumosu, Adeniyi, & Chandra, 2013](#); [Pang et al., 2019](#)). Los principales mecanismos de transferencia de gene involucran la transformación, transducción y conjugación, estos procesos no son exclusivos de *P. aeruginosa* sino es una estrategia de la mayoría de las bacterias, es por eso que la transferencia horizontal de genes de resistencia constituyen una preocupación en el control de infecciones ([Arber, 2014](#); [Dzidic & Bedekovic, 2003](#); [Pang et al., 2019](#)). Se han descrito eventos de transferencia horizontal que confiere resistencia a aminoglicósidos y  $\beta$ -lactámicos en diversas bacterias, incluyendo *P. aeruginosa* ([Bonomo & Szabo, 2006](#); [Cavalcanti et al., 2015](#); [D. J. Hong et al., 2015](#); [Nikokar et al., 2013](#); [Odumosu et al., 2013](#); [Pang et al., 2019](#); [Yan et al., 2006](#)). Seis tipos de metalo- $\beta$ -lactamasas se han encontrado en elementos genéticos, estas enzimas tienen la habilidad de hidrolizar la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos incluyendo los carbapenémicos, estas enzimas son: imipenemasa (IMP), metalo- $\beta$ -lactamasa integrón-codificada Verona (VIM por sus siglas en inglés *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*), Sao-Paulo metalo- $\beta$ -lactamasa (SPM), imipenemasa Alemania (GIM Germany imipenemase), Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa (NDM) y Florencia imipenemasa (FIM) ([D. J. Hong et al., 2015](#); [Pang et al., 2019](#)). Estos genes se han encontrado en integrones y plásmidos. ([Bonomo & Szabo, 2006](#); [Castanheira, Toleman, Jones, Schmidt, & Walsh, 2004](#); [Cavalcanti et al., 2015](#); [Khajuria, Praharaj, Kumar, & Grover, 2013](#); [Pang et al., 2019](#); [Yan et al., 2006](#))

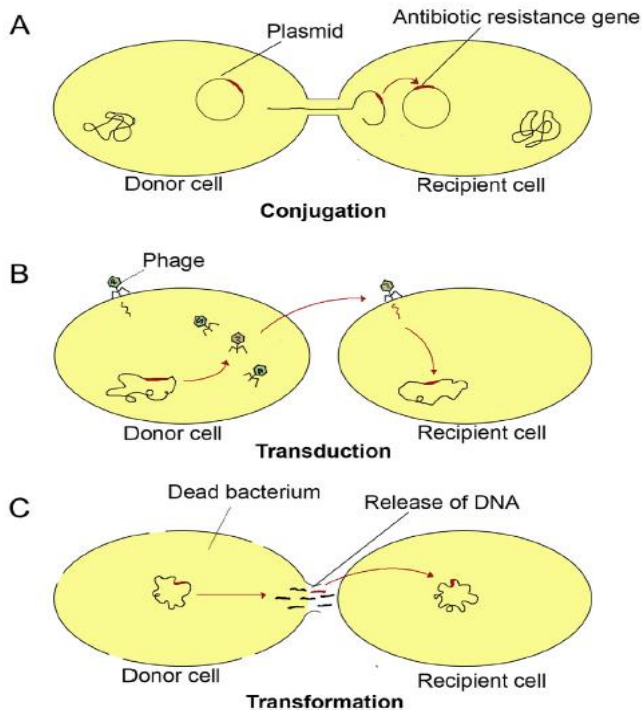


Imagen 26. Mecanismos de transferencia horizontal de genes. A) Conjugación, B) transducción y C) transformación. Imagen tomada de ([Pang, Raudonis, Glick, Lin, & Cheng, 2019](#)).

### 1.10 Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

A pesar de que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista bien documentado alrededor del mundo, en nuestro país no existe información gubernamental actual sobre la distribución de este microorganismo, de igual manera, las tasas de resistencia, desde la perspectiva oficial, se desconocen. Sin embargo, la información existente relacionada a frecuencia de aislamiento y patrones de susceptibilidad nacen como resultado de proveer esa información a todos los actores nacionales que la necesiten, de tal manera que la información existente nace de la iniciativa de los investigadores mexicanos para subsanar dicha problemática.

Actualmente existen dos grupos en el país que, en un intento titánico, comienzan a mostrar el alcance de este microorganismo. Ambas redes de multidrogorresistencia se encuentran amparadas bajo dos casas de estudios importantes en el país, por un lado, la red PUCRA (Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana), la cual pertenece al Programa Universitario de Investigación en Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr.

Samuel Ponce de León Rosales. El reporte de la red PUCRA correspondiente al 2018, en el cual participaron 22 instituciones de salud correspondientes a 8 entidades federativas, las cuales son: Ciudad de México, Estado de México, Puebla, Guanajuato, Durango, Jalisco, Guerrero y Nuevo León, mostró que el tercer bacilo Gram negativo más reportado en hemocultivos fue *Pseudomonas aeruginosa* con una cantidad de 1,417 cepas clínicas aisladas de dichas muestras ([Rosales, 2019](#)). Por otro lado, la red temática INVIFAR (Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia) bajo el liderazgo de la Dra. Elvira Garza González del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León, convocó a 47 instituciones de salud, tanto públicas como privadas, pertenecientes a 19 estados de la república. Las entidades federativas participantes son: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán ([Garza-Gonzalez et al., 2019](#)). Al igual que con la red PUCRA, *Pseudomonas aeruginosa* representó el tercer bacilo Gram negativo con más cepas reportadas en el estudio. Se reportaron al estudio un total de 1,995 aislados clínicos, dentro de esas muestras se analizaron las que provenían de muestras respiratorias (370), orina (342), sangre (197) y líquido cefalorraquídeo (28) ([Garza-Gonzalez et al., 2019](#)). En la imagen 27 se observa las entidades federativas que participan en ambas redes. Si bien, existe cierto sesgo de selección debido a que ambas redes solicitaron puntualmente los datos referentes a los aislados reportados, se debe tomar en consideración que existen factores que influyen y posicionan a *P. aeruginosa* como el tercer bacilo Gram negativo con el mayor número de cepas estudiadas. Algunos de los factores a considerar son el tipo de centro de salud participantes, la mayoría son centros de salud de primer y segundo nivel, asimismo, la presencia de hospitales privados, lo que permite que se estén reportando más microorganismos asociados a comunidades. Evidentemente un porcentaje de las *E. coli* y *K. pneumoniae* pueden estar asociados a infecciones nosocomiales, sin embargo, debido al objetivo de ambas redes, y al diseño del estudio, no es posible discernir en la naturaleza de dichos aislados, por otro lado, es pertinente tomar en

consideración que cierto porcentaje pueda constituir parte de la microbiota propia de cada institución de salud.



Imagen 27. Entidades federativas participantes en las redes PUCRA e INVIFAR (Rosales, 2019).

En Estados Unidos, en el 2017, *P. aeruginosa* multidrogorresistente ocasionó un estimado de 32,600 infecciones en pacientes hospitalizados y 2,700 muertes asociadas a dicho microorganismo (gráfico 2) (CDC, 2019b). Por otro lado, los costos asociados al tratamiento ocasionado por *P. aeruginosa* ascendió a los 767 millones de dólares en el 2017 (CDC, 2019a, 2019b). Con los datos publicados en México y la información gubernamental de Estados Unidos, llama la atención el impacto que tiene la multidrogorresistencia en *P. aeruginosa*.

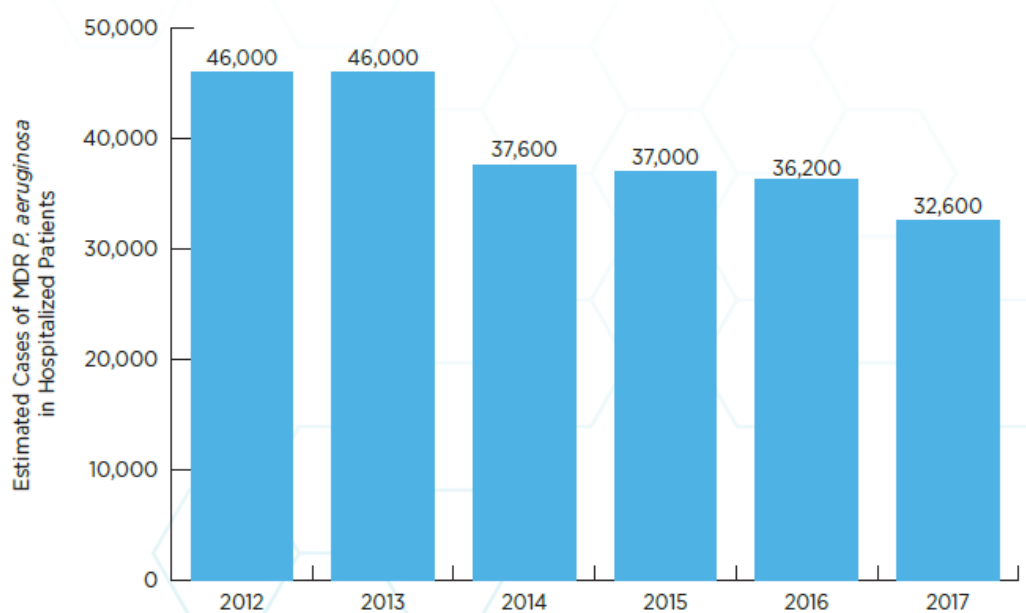


Gráfico 2. Casos de *P. aeruginosa* sobre tiempo. Información de los centros de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos ([CDC, 2019a](#)).

Estudios publicados por Jim O’Neill estiman que para el 2050 habrá más muertes asociadas a infecciones por microorganismos multidrogorresistentes que por otras patologías, las cuales ya tienen asociada una tasa de mortalidad *per se*, como cáncer o diabetes, por ejemplo. Se estima una tasa de mortalidad de alrededor de los 10 millones, mientras que para el caso de cáncer la estimación es de aproximadamente 8.2 millones y diabetes 1.5 millones (imagen 28) ([O’Neill, 2016](#)). Si bien la tasa de mortalidad asociada es el factor más relevante por el impacto que representa en salud pública la vida de las personas, también es necesario mencionar que se realizaron estimaciones sobre el impacto económico que representará la multidrogorresistencia alrededor del mundo, se menciona que existirá una pérdida del producto interno bruto que va de 60-100.2 billones de dólares (gráfico 3). Las estimaciones también se enfocan en la tasa de mortalidad por cada 10,000 habitantes y se visualizan en los 5 continentes. Se espera que el continente asiático presente 4,730,000 defunciones asociadas a la multidrogorresistencia, en segundo lugar, el continente africano con 4,150,000, mientras que para el continente americano las estimaciones alcanzan los 709,000 decesos (317,000 para Norteamérica, donde se encuentra incluido México y 392,000 para Sudamérica). En Europa se estiman 390,000 pérdidas de vidas humanas y en Oceanía 22,000 (imagen 29) ([O’Neill, 2014](#)).

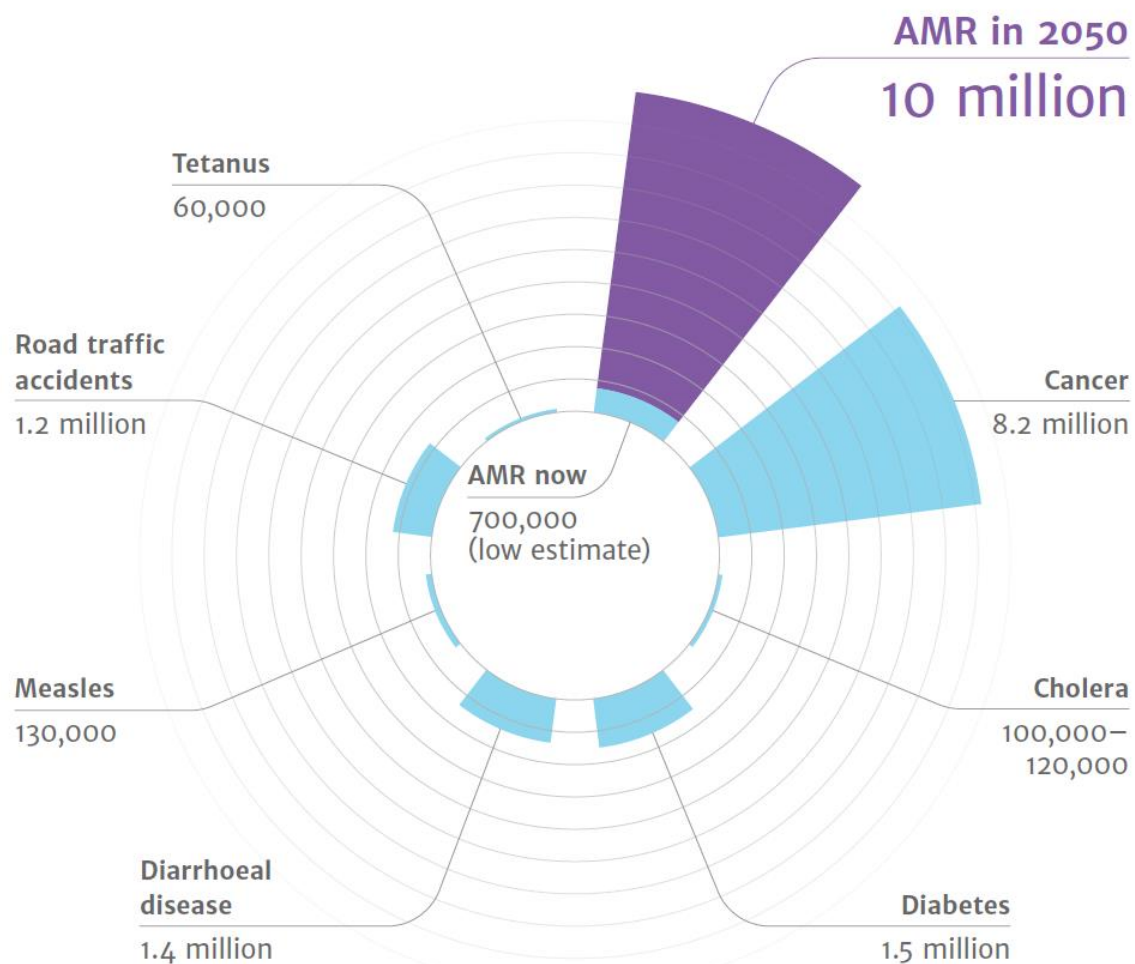


Imagen 28. Representación esquemática de muertes atribuibles a microorganismos multidrogosresistentes para el 2050, comparación con otras causas de decesos. Imagen tomada de ([O'Neill, 2016](#)).

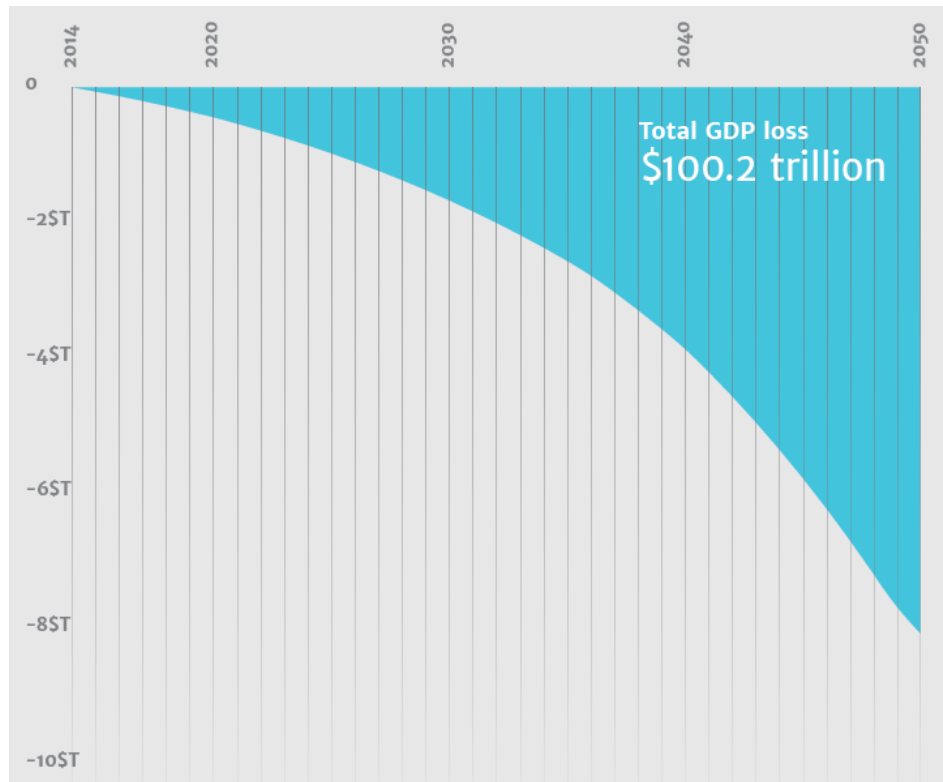


Gráfico 3. Impacto de la multidrogorresistencia en el producto interno bruto mundial. Pérdida acumulada para el 2050 de 100.2 billones de dólares. Gráfico tomado de (O'Neill, 2014)

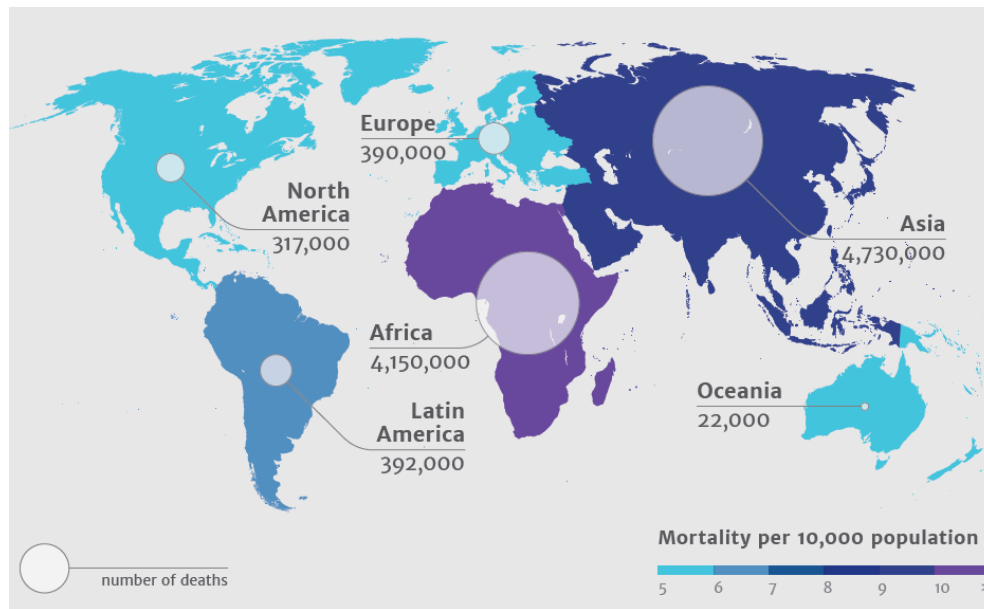


Imagen 29. Muertes atribuibles a la multidrogorresistencia alrededor del mundo. Proyecciones para el 2050. Imagen tomada de (O'Neill, 2014).

Ante esta problemática mundial y el posible panorama que podría presentarse, aunado a la creciente tasa de resistencia alrededor del mundo, la organización mundial de la salud (OMS), en febrero del 2017 publicó una lista en la que da a conocer cuáles son los patógenos prioritarios para realizar investigaciones y crear antibióticos, esto derivado a la multidrogorresistencia que presentan y el impacto a la salud que poseen (imagen 30) ([Tacconelli, 2017](#)).

### Priority 1: CRITICAL<sup>#</sup>

*Acinetobacter baumannii*, carbapenem-resistant  
*Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant  
*Enterobacteriaceae*<sup>\*</sup>, carbapenem-resistant, 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant

### Priority 2: HIGH

*Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant  
*Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant  
*Helicobacter pylori*, clarithromycin-resistant  
*Campylobacter*, fluoroquinolone-resistant  
*Salmonella spp.*, fluoroquinolone-resistant  
*Neisseria gonorrhoeae*, 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

### Priority 3: MEDIUM

*Streptococcus pneumoniae*, penicillin-non-susceptible  
*Haemophilus influenzae*, ampicillin-resistant  
*Shigella spp.*, fluoroquinolone-resistant

<sup>#</sup> *Mycobacteria* (including *Mycobacterium tuberculosis*, the cause of human tuberculosis), was not subjected to review for inclusion in this prioritization exercise as it is already a globally established priority for which innovative new treatments are urgently needed.

<sup>\*</sup> *Enterobacteriaceae* include: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, and *Providencia spp.*, *Morganella spp.*

Imagen 30. Lista de patógenos prioritaria por la Organización Mundial de la salud para investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. En rojo prioridad crítica. *Enterobacteriaceae* incluye *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* y *Morganella spp.* Naranja prioridad alta y amarillo prioridad media. Imagen tomada de ([Tacconelli, 2017](#)).



Ante esta problemática, se han descubierto y desarrollado algunas moléculas antibióticas, unas *de novo* y otras combinaciones de nuevas moléculas con algunas ya conocidas.

Uno de los nuevos antibióticos descubiertos posee actividad contra los Gram positivos (principalmente *Staphylococcus aureus*), es un compuesto nuevo, el cual es producido por una  $\beta$ -proteobacteria a la cual se le asignó el nombre *Eleftheria terrae*, dicha molécula se denominó como Teixobactina y la cual después de hacer varios pases no generó resistencia al mismo ([McCarthy, 2019](#); [G. Wright, 2015](#); [Zong et al., 2019](#)).

Darobactina es una de las más recientes moléculas descubiertas, nuevamente, antes de apostar a la derivatización química, en la cual a partir de las moléculas ya existente se crean nuevas moléculas semisintéticas por adición de diversos grupos funcionales en su estructura química. Además, los investigadores regresaron a la fuente primaria, a aislar microorganismos quienes poseen el armamento para defenderse de otros microorganismos. Darobactina se logró aislar de *Photorhabdus kharii*, la cual es una  $\gamma$ -proteobacteria perteneciente al orden de los *Enterobacterales* y a la familia *Morganellaceae*. El diseño comparativo tiene sesgos debido a que se compara con el antibiótico ampicilina y se observan concentraciones muy altas para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, hay que tomar en cuenta que particularmente estas dos bacterias poseen resistencia intrínseca para este antibiótico, sin embargo, aparentemente presenta actividad contra bacterias resistentes. Esta molécula aún se encuentra en fase experimental dado que el artículo fue recientemente publicado ([Imai et al., 2019](#)). Pero se une al requerimiento de la OMS para buscar nuevas moléculas para investigar y desarrollar nuevos antibióticos ([Tacconelli, 2017](#)).

Por otro lado, en la carrera contra la multidrogorresistencia en Gram negativos, algunos antibióticos han aparecido, tal es el caso de ceftazidima/avibactam, si bien la ceftazidima es un antibiótico con el que ya se contaba, la cual pertenece a la

familia de las cefalosporinas y es de tercera generación, este antibiótico es de amplio espectro con acción contra Gram positivos y Gram negativos, incluida *P. aeruginosa*, se desarrolló un nuevo inhibidor denominado Avibactam. Este inhibidor fue patentado en el 2011, es un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas no  $\beta$ -lactámico (diazabicyclooctano) el cual posee actividad inhibitoria contra enzimas  $\beta$ -lactamasas (incluidas carbapenemasas) de la clase A, C y algunas de la clase D (OXA-48) pero no contra clase B (metalo- $\beta$ -lactamasas) ([Karaiskos, Lagou, Pontikis, Rapti, & Poulakou, 2019](#); [Zhanel et al., 2013](#)). Este antibiótico es exitoso para atacar aislados clínicos de *P. aeruginosa* multidrogosresistentes no productores de metalo- $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, en aislados de *P. aeruginosa* productoras de NDM, VIM, IMP, la ceftazidima es hidrolizada por estas enzimas a las cuales el inhibidor avibactam no es capaz de inhibir.

Meropenem/vaborbactam es otro antibiótico híbrido que combina un antibiótico conocido como lo es el carbapenémico meropenem más un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas no  $\beta$ -lactámico ([Hecker et al., 2015](#)). El vaborbactam es un derivado cíclico del ácido borónico, el cual es capaz de inhibir las serin  $\beta$ -lactamasas. Este inhibidor actúa mediante la formación de un enlace covalente entre el residuo del boro con la serina ([Lapuebla et al., 2015](#)). Posee actividad contra  $\beta$ -lactamasas del grupo A (KPC-2, KPC-3, BKC-1, FRI-1 y SME-2 del grupo de las carbapenemasas, del grupo de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV, y TEM), clase C (CMY, P99) y mínima frente a la clase D (OXA-48). Para la clase B (metalo- $\beta$ -lactamasa) su actividad es técnicamente nula ([Karaiskos et al., 2019](#)).

Ceftolozano/Tazobactam, es nuevamente una molécula híbrida que conjuga a un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas ya conocido como lo es el tazobactam con una nueva molécula que es el ceftolozano la cual es una oxiiimino-cefalosporina. Posee una alta actividad en *P. aeruginosa* susceptibles y con mecanismos de resistencia como bombas de flujo y porinas, pero es fácilmente hidrolizable por carbapenemasas del grupo A (KPC y GES) y del grupo B (NDM, IMP, VIM). Posee poca actividad contra el grupo D (OXA-48).

Dado que la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas son las que limitan el uso de ciertos antibióticos como ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborbactam y ceftolozano/tazobactam, se ha recomendado la mezcla de aztreonam/avibactam como estrategia para hacer frente a los aislados multidrogoresistentes productores de metalo- $\beta$ -lactamasas. El aztreonam es una molécula que no se ve hidrolizada por las enzimas de clase B, por lo que esta mezcla, en principio restauraría el fenotipo susceptible ([Sader et al., 2018](#)).

Por último, existe una molécula que sugiere ser una promesa, es el caballo de Troya que utiliza los procesos fisiológicos de las bacterias, principalmente *P. aeruginosa* para poder entrar a la célula bacteriana y llevar a cabo su mecanismo de acción. Este antibiótico es el cefiderocol. Es una nueva cefalosporina sideróforo con el grupo catecol sustituido el cual posee una potente actividad contra Enterobacterales y bacilos Gram negativos no fermentadores multidrogoresistentes y productores de carbapenemasas. La estructura química del cefiderocol es muy similar a la que tiene la ceftazidima y el cefepime más la presencia de un catecol que funciona como sideróforo, es decir, le permite captar hierro. Este catecol además de engañar a la célula bacteriana, quien produce sideróforos para poder llevar a cabo parte de su metabolismo, en el caso de *P. aeruginosa* es la pioverdina y un segundo sideróforo es la pioquelina, le proporciona estabilidad contra las  $\beta$ -lactamasas ([Zhanel et al., 2019](#)). Al captar el hierro, el sideróforo internaliza al mismo por transporte activo, en el caso de *P. aeruginosa* es mediante el transporte de hierro PiuA, una vez dentro libera el hierro en el periplasma y la cefalosporina es la que hace el efecto bactericida al unirse a la PBP3, inhibiendo de esta forma la síntesis del peptidoglucano, es por esto que a la molécula se le conoce como caballo de Troya, porque engaña al propio sistema bacteriano haciéndole creer que el sideróforo forma parte de los que el produce ([Zhanel et al., 2019](#)).

Ante estos mecanismos de acción la presencia de genes de resistencia en los aislados clínicos de *P. aeruginosa* la convierte cada día en un microorganismo de

compleja erradicación en el hospedero humano debido a que los antibióticos existentes comienzan a ser limitados. La última línea de acción sigue siendo las polimixinas, en particular la colistina (polimixina E). Este es un antibiótico descubierto en 1940, sin embargo, su introducción como tratamiento fue hasta 1950. Derivado del aumento en la resistencia de Gram negativos, se ha comenzado a utilizar nuevamente a pesar de que es una molécula con varios efectos adversos, entre los que podemos enumerar la nefro y neurotoxicidad ([Lim et al., 2010](#)). Sin embargo, cada vez, debido a su uso y por ende a la presión de selección, se están encontrando aislados clínicos resistentes. En el caso de los *Enterobacterales* como *K. pneumoniae* se han visto la presencia de genes de resistencia que agregan grupo fosfato al LPS, el gen es el *mcr* ([Bialvaei & Samadi Kafil, 2015](#)). Si bien los mecanismos de resistencia se siguen investigando, el principal mecanismo de resistencia en Gram negativos involucra una disminución del antibiótico en la membrana externa de las bacterias. Esto debido a la modificación del LPS por sistemas de dos componentes como *PhoPQ* y *PmrAB*. Ambos producen un LPS menos aniónico ([Bialvaei & Samadi Kafil, 2015](#)).

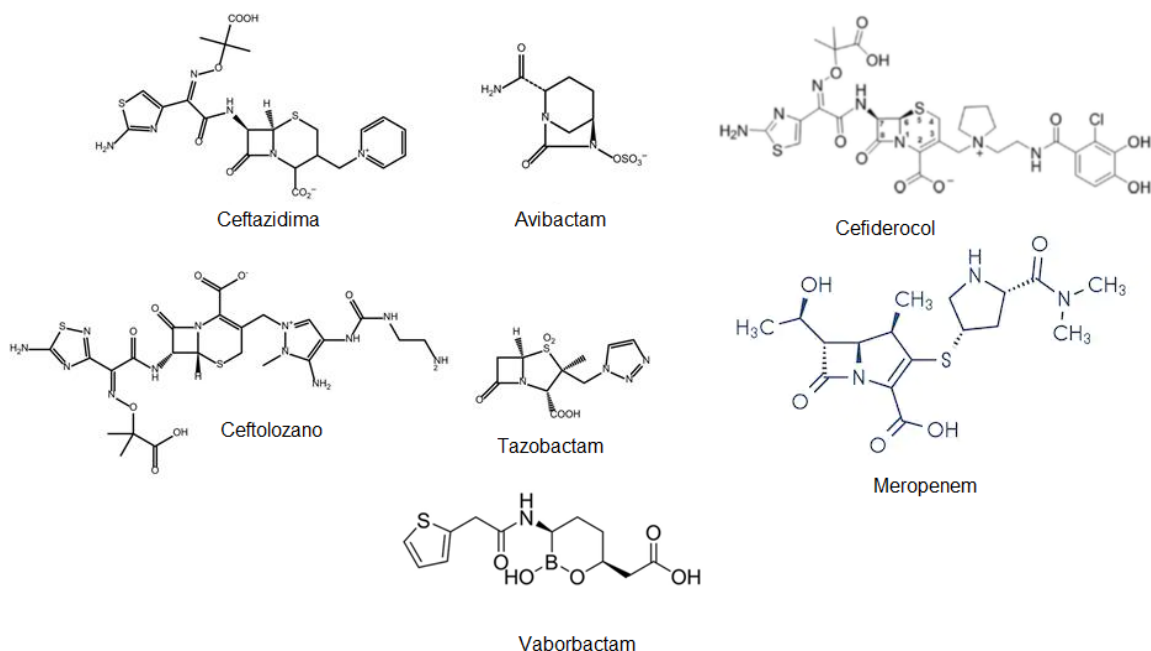


Imagen 31. Estructuras químicas de las nuevas moléculas antibióticas.

Ante estos problemas de salud pública y mundial que supone la multidrogorresistencia se han dividido los abordajes en tres rubros principales.

1. Generación de nuevos antibióticos o antibióticos híbridos (moléculas nuevas con moléculas existentes para tener un efecto sinérgico) (imagen 31).
2. Reutilización de moléculas existentes que, en principio fueron concebidas para el tratamiento de diferentes patologías como lo es el caso de un antitumoral con actividad antimicrobiana como lo es la mitomicina ([Cruz-Muniz et al., 2017](#)) o galio, el cual tiene un mimetismo con el hierro, pero a diferencia de este último, no sufre cambios óxido-reductivos ([E. Lopez-Jacome et al., 2019](#)).
3. Estrategias anti-percepción de quórum.

#### 1.11 Estrategias Anti-percepción de quórum.

Como ya se ha mencionado anteriormente el sistema de percepción de quórum coordina de forma social una gran cantidad de factores de virulencia que la célula bacteriana necesita para asegurar su existencia en determinados nichos biológicos. De tal manera que, inhibiendo este sistema de comunicación bacteriana, el supuesto a cumplirse es que los microorganismos no tendrán oportunidad de desplegar toda la respuesta génica coordinada y, en principio, el hospedero, en este caso el humano, con la ayuda de su respuesta inmune debería ser capaz de combatir o clarear el proceso infeccioso coadyuvando con tratamientos médicos conservadores. Algo que ha sonado interesante de estas estrategias es que, en principio, esto no implica una presión de selección que obligue al microorganismo a montar una respuesta al ver comprometida su existencia de manera directa, esto debido a que los blancos son factores de virulencia, que como ya se mencionó, necesitan las bacterias para permanecer en nichos biológicos, el humano incluido ([Fleitas Martinez et al., 2018](#)).

Debido a que en bacilos Gram negativos, el sistema de comunicación predominante es el derivado de las AHL, se han propuesto algunas estrategias que tiene como blanco algunos de los elementos que constituyen este sistema. En la imagen 32 se esquematizan las estrategias propuestas.

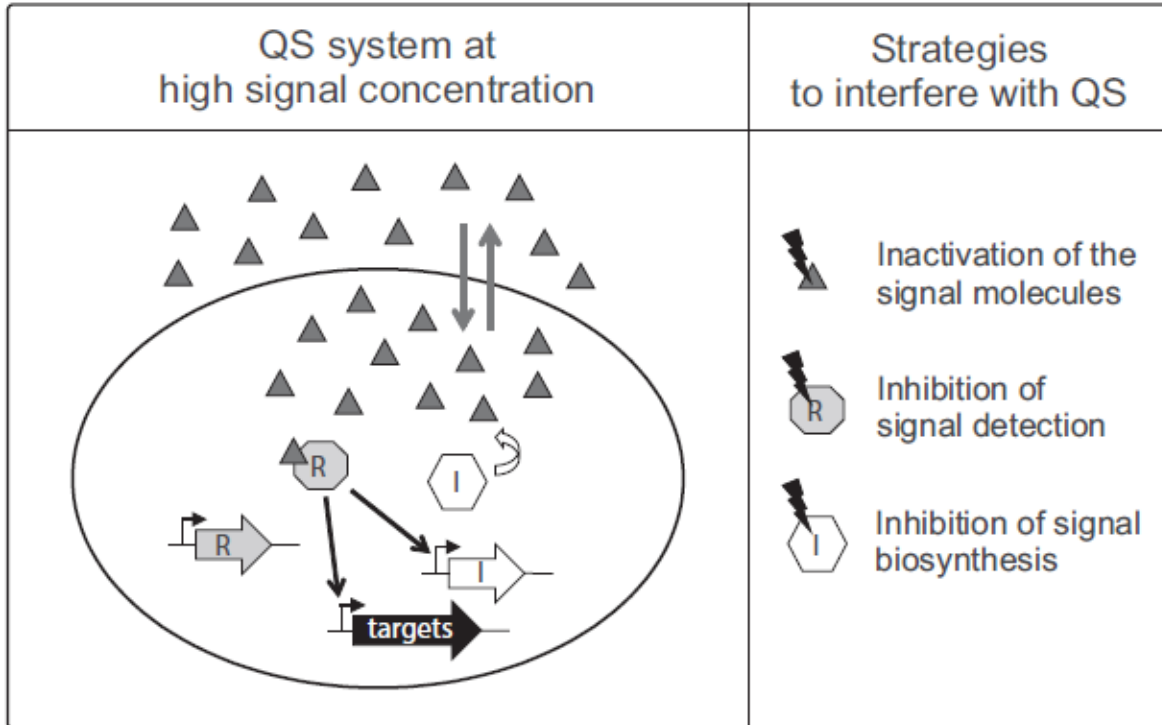


Imagen 32. Esquematación general del sistema de las AHL y las estrategias de inhibición de cada uno de los componentes. Flecha negra con triángulo: inactivación de la molécula señal (autoinductor), flecha con octágono y R: inactivación del regulador transcripcional, flecha con hexágono blanco e I: inactivación de la sintasa. Imagen tomada de ([Fetzner, 2015](#)).

De manera general se proponen 3 blancos para el diseño de estrategias inhibitorias del sistema de percepción de quórum asociado a las AHL:

1. Inhibición de la sintasa. La selección de este blanco se basa en que, al inhibir la sintasa, la célula bacteriana no es capaz de producir autoinductores y por lo tanto se trunca, desde la biosíntesis, la respuesta génica.
2. Inhibición del regulador transcripcional. Esto se basa en que la sintasa puede estar activa produciendo autoinductores, sin embargo, al estar inhibido el receptor transcripcional tampoco se podría llevar a cabo la respuesta génica coordinada.
3. Degradación del autoinductor. La sintasa tiene acción y se producen autoinductores, sin embargo, este es degradado, impidiendo de esta manera la dimerización con el regulador transcripcional y de esta forma se trunca, nuevamente, la respuesta génica coordinada, y, por lo tanto, la célula no es

capaz de producir los factores de virulencia necesarios para acondicionar el microambiente.

#### 1.11.1 Inhibición de la biosíntesis de AHL.

La principal estrategia consiste en inhibir la biosíntesis de la S-adenosilmetionina, esto ocasionaría la interferencia con la generación de acil-proteína acarreadora de acil (ACP) o la inactivación de la enzima sintasa ([Gilson, Kuo, & Dunlap, 1995](#); [Parsek, Val, Hanzelka, Cronan, & Greenberg, 1999](#)). Sin embargo, este rubro no ha sido explorado a profundidad, por lo que la información al respecto es limitada ([LaSarre & Federle, 2013](#)).

La enzima FabI (dinucleótido de nicotinamida reducido (NADH)-dependiente de enoil-ACP reductasa) es la enzima bacteriana responsable del paso final de la catálisis en la biosíntesis de acil-ACP, proveyendo de esta forma las cadenas aciladas para la síntesis de las AHL ([LaSarre & Federle, 2013](#)). Hong y Schweizer demostraron que la FabI es una de las múltiples enoil-ACP presentes en *P. aeruginosa* y la cual está involucrada directamente con la síntesis de C4HSL. Determinaron que triclosán mostró una supresión importante en la síntesis de C4HSL en un sistema *in vitro*. Sin embargo, *P. aeruginosa* es resistente a triclosán debido a sus bombas de eflujo ([Hoang & Schweizer, 1999](#)).

#### 1.11.2 Inhibición de la detección de la señal.

Diversos grupos han examinado las interacciones de las proteínas receptoras LuxR-similar, TraR y LasR, tanto con moléculas AHL naturales o no naturales (diseñadas, sintetizadas) y han evaluado las actividades subsecuentes. Además de las variaciones en la longitud de la cadena AHL, saturación y oxidación de los estados naturales de AHL, un gran número de compuestos análogos no naturales han sido sintetizados y probados a la fecha, entre ellos tiolactonas ([McInnis & Blackwell, 2011](#); [Passador et al., 1996](#)), lactámicos ([Malladi et al., 2011](#)), triazolilhidrofuranonas ([Brackman et al., 2012](#)) y análogos de la urea ([Brackman et al., 2012](#); [LaSarre & Federle, 2013](#)).

Los análogos han demostrado tener un amplio rango de actividad, incluyendo aquellos que no tienen, aquellos que manifiestan puro agonismo o antagonismo puro, agonismo parcial y agonismo sinérgico ([Eberhard, Widrig, McBath, & Schineller, 1986](#); [Geske, O'Neill, Miller, Mattmann, & Blackwell, 2007](#); [LaSarre & Federle, 2013](#); [Malladi et al., 2011](#)).

Entre las primeras moléculas pequeñas, naturales, descritas se encuentran las furanonas bromadas, sin embargo, debido a su toxicidad aún siguen con problemas comerciales para su aplicación terapéutica. Las furanonas se han utilizado para entender la señalización y las consecuencias de la inhibición ([LaSarre & Federle, 2013](#)).

De 1974 a 1981, el instituto de investigación Roche de farmacología marina recolectó muestras marinas con el propósito de encontrar nuevas moléculas con actividades antimicrobianas. Encontraron diversas algas, incluidas las del género *Delisea*, con actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias Gram negativas y Gram positivas ([LaSarre & Federle, 2013](#); [Reichelt & Borowitzka, 1984](#)). Estudios subsecuentes se centraron en *Delisea pulcra*, la cual no solo presentaba metabolitos secundarios, sino que tampoco presentaba colonización bacteriana, asimismo, se documentó que los compuestos caracterizados de esta alga eran halogenados, y furanonas bromadas. A partir de este momento, nuevas furanonas fueron sintetizadas químicamente y se encontraron 2 con actividades anti-percepción de quórum, furanona C30 y C56. Este compuesto se probó contra *P. aeruginosa*, *Aliivibrio fischeri* y *E. coli* ([Christensen et al., 2007](#); [Hentzer et al., 2002](#); [LaSarre & Federle, 2013](#); [Manefield et al., 2002](#)).

Este compuesto ha mostrado buenos resultados en la inhibición del sistema de la percepción de quórum, pero el tema de la toxicidad se mantiene como limitante para la utilización amplia de esta estrategia. C30 y C2 resultan letales en 4 h en truchas (se probaron (1  $\mu\text{M}$  de C30 y 24  $\mu\text{M}$  de C2). En otros experimentos, se utilizaron



fibroblastos humanos y se encontró que C56 es tóxico a 10  $\mu$ M, C30 no mostró toxicidad en células de cáncer humano HeLa ([LaSarre & Federle, 2013](#); [Rasch et al., 2004](#); [Tinh et al., 2007](#)). Además, a pesar de la efectividad en la disminución de los factores de virulencia en aislados clínicos de *P. aeruginosa*, se ha informado de la presencia de mecanismos de resistencia a este compuesto, esto atribuible a las bombas de flujo MexAB-OpmR ([Garcia-Contreras et al., 2013](#)).

### 1.11.3 Inhibición de la señal.

Comparado con las estrategias antibióticas, ya sean bactericidas o bacteriostáticas, la inhibición del sistema de percepción de quórum no interfiere, generalmente, con el la cinética de crecimiento del microorganismo, esto disminuiría la posibilidad de generar resistencia debido a la presión de selección ([Defoirdt, Boon, & Bossier, 2010](#); [Fetzner, 2015](#)).

Esta estrategia consiste en la degradación o inhibición de la señal, de tal manera que, aunque la sintasa esté trabajando y produciendo la molécula autoinductora, y, por otro lado, el regulador transcripcional sea funcional, el hecho de eliminar el inductor liberado impedirá su interacción con el regulador transcripcional y por lo tanto no la inducción génica.

Este rubro puede llevarse por una lactonólisis. Mediante reacciones químicas, en un ambiente alcalino, el anillo de lactona sufre un ataque nucleofílico y se rompe, quedando inactivada la molécula. Las condiciones de pH deben ser mayores a 7 y si existe algún cambio que acidifique el ambiente la lactolización puede revertirse ([Turan & Engin, 2018](#)). Por otro lado, esta estrategia está liderada por la utilización de enzimas que degradan la molécula autoinductora.

La degradación enzimática que conlleva a la inactivación de la molécula de AHL puede llevarse a cabo mediante 3 clases conocidas de enzimas: lactonasas, acilasas y oxidorreductasas ([LaSarre & Federle, 2013](#)).

### 1.11.3.1 Lactonasas

Las lactonasas presentan actividad frente a muchas moléculas señal AHL y se han encontrado en una gran diversidad de microorganismos y pertenecen a diferentes familias de proteínas.

La primera enzima lactonasa con actividad inhibitoria de quórum identificada fue la AiiA, aislada de *Bacillus sp.* de la cepa 240B1, esta proteína pertenece a la súper familia de las metalo- $\beta$ -lactamasas, identificada en el 2000 ([Dong, Xu, Li, & Zhang, 2000](#); [LaSarre & Federle, 2013](#)). Otras proteínas lactonasas son similares a las fosfotriesteradas o son miembros de la familia paroxonasa. Sin embargo, se han identificado, recientemente, la AiiM y la AidH, las cuales son producidas por microorganismos asociados a las hojas de las plantas; *Microbacterium testaceum* StLB037 y *Ochrobactrum sp.* T63, respectivamente ([LaSarre & Federle, 2013](#); [Mei, Yan, Turak, Luo, & Zhang, 2010](#); [W. Z. Wang, Morohoshi, Ikenoya, Someya, & Ikeda, 2010](#)). Esto indica que la lactonólisis puede llevarse a cabo por miembros de la súper familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa ([LaSarre & Federle, 2013](#)).

Las lactonasas que pertenecen a la super familia de las metalo- $\beta$ -lactamasas tienen como cofactor al  $Zn^{+2}$  unido al motivo HXHXDH. Para el caso de AiiA de *Bacillus sp.* 204B1 existen análogos en *Bacillus sp.* A24, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus grupo cereus* ([Dong et al., 2000](#); [LaSarre & Federle, 2013](#); [S. J. Lee et al., 2002](#); [Liu et al., 2005](#); [Reimann et al., 2002](#)).

Los miembros de esta familia tienen especificidad para una amplia gama de sustratos y pueden hidrolizar moléculas AHL con o sin sustituciones en el C3, asimismo, tienen preferencia por moléculas de cadena mediana a larga de AHL ([LaSarre & Federle, 2013](#)).

Las lactonasas similares a fosfotriesterasas (PLL por sus siglas en inglés *phosphotriesterase-like*) son miembros de la súper familia amidohidrolasa, poseen un centro metálico binucleado dentro de un andamiaje estructural tipo barriles ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>

(también llamados barriles Tim). Las PLLs tienen, generalmente, un amplio espectro por el sustrato, con preferencia por lactonas hidrofóbicas. Algunas PLLs fueron originalmente aisladas en virtud a su actividad de pesticidas organofosforados similares al paraoxón y fueron descritas, inicialmente, como paraoxonasas, sin embargo, estudios químicos revelaron que estas enzimas son lactonasas con actividad organofosfato hidrolasa promiscua ([Amitai, Gupta, & Tawfik, 2007](#); [LaSarre & Federle, 2013](#)). Las PLLs además de ser lactonasas naturales, también tienen actividad contra otras lactonas no AHL ([Xiang et al., 2009](#)).

Otro miembro del grupo de las lactonasas son las paraoxonasas (PONs) las cuales comprenden principalmente lactonasas de mamíferos. Las PONs tienen una conformación de hélices  $\beta$  de seis palas con un ion  $\text{Ca}^{2+}$  estructural y catalítico ([LaSarre & Federle, 2013](#); [Suzuki et al., 2010](#)). La asignación del nombre se deriva de la habilidad de la PON1 de mamífero de hidrolizar el paraoxón, el metabolito activo del pesticida organofosforado paratión ([LaSarre & Federle, 2013](#)). Existen reportes de que las células de la vía aérea humana son capaces de hidrolizar la 3OC12HSL, estudios subsecuentes determinaron que los queratinocitos humanos producen PON2, la cual también posee la habilidad de hidrolizar la 3OC12HSL ([Chun, Ozer, Welsh, Zabner, & Greenberg, 2004](#); [LaSarre & Federle, 2013](#); [Simanski, Babucke, Eberl, & Harder, 2012](#)).

#### 1.11.3.2 Acilasas

Las acilasas fueron descubiertas poco después de la lactonasa AiiM. La primera acilasa fue aislada de *Variovorax paradoxus* la cual, se observó, utilizaba las AHL como fuente de energía y nitrógeno. La degradación por una acilasa rompe la AHL y separa la cadena correspondiente de ácidos grasos. La porción del ácido graso proporciona la fuente de energía mientras que el anillo de lactona proporciona la fuente de nitrógeno. Estas acilasas han sido identificadas en *P. aeruginosa*, *Ralstonia spp.*, *Comamonas spp.*, *Pseudomonas syringae*, *Shewanella spp.*, *Ochrobactrum spp.*, en la cianobacteria *Anabaena spp.*, y en las actinobacterias *Rhodococcus erythropolis W2* y en *Streptomyces spp M664* ([Czajkowski et al.,](#)

[2011](#); [Chen, Chen, Liao, & Lee, 2009](#); [Huang, Han, Zhang, & Leadbetter, 2003](#); [LaSarre & Federle, 2013](#); [Leadbetter & Greenberg, 2000](#); [Lin et al., 2003](#); [Morohoshi, Nakazawa, Ebata, Kato, & Ikeda, 2008](#); [Park et al., 2005](#); [Romero, Diggle, Heeb, Camara, & Otero, 2008](#); [Shepherd & Lindow, 2009](#); [Sio et al., 2006](#); [Uroz et al., 2007](#); [Wahjudi et al., 2011](#)).

A diferencia de las lactonasas, las cuales han sido identificadas en varias familias de proteínas, la mayoría de las acilasas caracterizadas a la fecha son miembros de la súper familia hidrolasa con un nucleófilo N-termina (Ntn). La excepción a la regla es la proteína AiiO de *Ochrobactrum sp.* A44 la cual tiene plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa ([Czajkowski et al., 2011](#)). El plegamiento Ntn hidrolasa es característico de las acilasas  $\beta$ -lactámicas como el de la penicilina G acilasa. La penicilina acilasa de *Kluyvera citrophila* es capaz de hidrolizar AHL C6 a C8 con o sin sustituciones 3-oxo pero con una eficiencia catalítica baja ([Mukherji, Varshney, Panigrahi, Suresh, & Prabhune, 2014](#)). La mayoría de las acilasas AHL presentan actividad hidrolítica, preferentemente por las moléculas AHL de cadena larga (sin importar si tienen sustituciones en el C3 de la cadena acilada). Sin embargo, AiiC de *Anabaena sp* PCC7120 ([Romero et al., 2008](#)) hidroliza una amplia gama de AHL, incluyendo cadenas cortas como C4HSL, la señal del sistema Rhl de *P. aeruginosa*. La actividad inhibitoria enzimática de las acilasas ha sido demostrada en varios sistemas, indicando que estas enzimas podrían ser utilizadas para el control de la patogenicidad mediada por las AHL. Comparadas con las lactonasas, se considera que las acilasas tienen una ventaja en la aplicación biotecnológica debido a que, en contraste con el producto derivado de las lactonasas, la N-acil homoserin, puede recircularse en pH ácido, mientras que la reacción hidrolítica de las acilasas no puede regenerarse espontáneamente en una señal funcional de percepción de quórum. Sin embargo, el ácido graso generado por la acilasa usualmente está listo para metabolizarse (imagen 33).

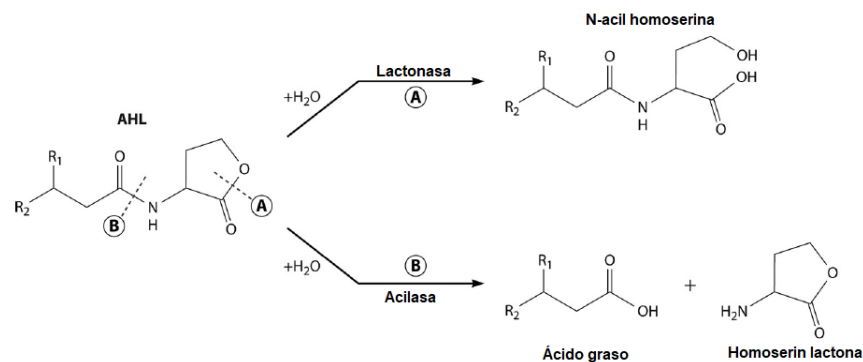


Imagen 33. Representación esquemática de la actividad hidrolítica de lactonasas y acilasas. El blanco de las lactonasas es el anillo de lactona (a), mientras que la de las acilasas es la porción de la cadena acilada produciendo un ácido graso y una molécula de homoserina lactona no funcional (b). imagen tomada de ([LaSarre & Federle, 2013](#)).

En la tabla 9 se enlistan algunas de las enzimas con actividad anti-percepción de quorum descritas y que han sido utilizadas solo en cepas tipo (no clínicas) para determinar su actividad inhibitoria.

Proteína	Fuente	Familia de proteína	Localización/ péptido señal	Sustrato
<b>Lactonasa AHL</b>				
<b>AiiA</b>	<i>Bacillus spp</i> (grupo <i>Bacillus cereus</i> )	Súper familia Metallo-β-lactamasa	Citoplasmática	C4-, C6-, C8-, C10-HSL; 3OC4-, 3OC6-3OC8-, 3OC12HSL; 3-OH-C4HSL
<b>AhIS</b>	<i>Solibacillus silvestris</i> StLB046	Súper familia Metallo-β-lactamasa	No PS	C10-HSL
<b>AhID</b>	<i>Arthrobacter sp.</i> IBN110	Súper familia Metallo-β-lactamasa	No PS	C6-, C8-, C10-HSL; 3OC6-, 3OC12-HSL
<b>AttM (AiiB)</b>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58, M103	Súper familia Metallo-β-lactamasa	No PS	C4-, C6-, C7-, C8-, C10-HSL; 3OC6-, 3OC8-HSL
<b>QsdR1</b>	<i>Rhizobium sp.</i> NGR234	Súper familia Metallo-β-lactamasa	No PS	3OC8-HSL
<b>AhIK</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC2241	Súper familia Metallo-β-lactamasa	No PS	C6-HSL, 3OC6-HSL
<b>AidC</b>	<i>Chryseobacterium sp.</i> StRB126	Súper familia Metallo-β-lactamasa	PS	C6-, C8-, C10-, C12-HSL; 3OC6-, 3OC8-, 3OC10-, 3OC12-HSL
<b>QlcA</b>	<i>Metagenoma de suelo</i> (origen acidobacteria)	Súper familia Metallo-β-lactamasa	No PS	C6-HSL
<b>PPH, identical to Php of strain H37Rv</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lactonasa similar a fosfotriesterasa (PLL); súper familia amidohidrolasa	No PS	C4-, C10-HSL; 3OC8-HSL
<b>MCP (MAP3668c)</b>	<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i> K-10	PLL	No PS	C6-, C7-, C8-, C10-, C12-HSL; 3-oxo-C8-HSL
<b>QsdA (AhIA)</b>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2, SQ1, Mic1, MP50, CECT3008; <i>Rhodococcus sp.</i> BH4	PLL	No PS; asociado a célula	C4-HSL, C6- a C14-HSLs, con o sin sustituciones en el C3
<b>SsoPox</b>	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 (ATCC 35092)	PLL	No determinado	C4-, C6-, 8-, C12-HSL; 3OC6-, 3OC8-, 3OC10-, 3OC12-HSL

<b>SisLac</b>	<i>Sulfolobus islandicus M. 16.4</i>	PLL	No determinado	C4-, C8-, C12-HSL; 3OC8-, 3OC10-, 3OC12-HSL
<b>PON1</b>	Hígado y Suero de mamíferos	Paraoxonasa (PON)	Proteína secretada, asociada con la lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero	C7-, C12, C14-HSL 3OC6-, 3OC10-, 3OC12-HSL
<b>PON2</b>	Todos los tejidos de mamíferos	PON	Proteína no secretada transmembranalmente, sitio activo extracelular	C7-, C12-, C14-HSL; 3OC6-, 3OC10-, 3OC12-HSL
<b>PON3</b>	Hígado de mamíferos (y riñones), suero	PON	Proteína secretada, asociada con HDL en suero	C7-, C12-, C14-HSL 3OC12-HSL
<b>AiiM</b>	<i>Microbacterium testaceum StLB037</i>	Súper familia $\alpha/\beta$ hidrolasa	No PS	C6-, C8-, C10, C12-HSL; 3OC6-, 3OC8-, 3OC10, 3OC12-HSL
<b>AidH</b>	<i>Ochrobactrum sp. T63</i>	Súper familia $\alpha/\beta$ hidrolasa	No PS	C4-, C6-, C10-HSL; 3OC6-, 3OC8-HSL; 3-OH-C6-HSL
<b>DIhR</b>	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	Dienelactona hidrolasa	PS	3OC8-HSL
<b>QsdH</b>	<i>Pseudoalteromonas byunsanensis 1A01261</i>	Familia GDSSL (SGNH) hidrolasa (dominio N-terminal)	Dominio frente al periplasma, dominio transportador bomba de flujo tipo RND	C14-HSLs; 3OC6-, 3OC8-HSL

Proteína	Fuente	Familia de proteína	Localización/ péptido señal	Sustrato
<b>Acilasa AHL</b>				
<b>AhIM</b>	<i>Streptomyces sp. M664</i>	Familia NTn hidrolasa	Extracelular	C6-, C8-, C10-HSL; 3OC6-, 3OC8-, 3OC12-HSL
<b>AibP</b>	<i>Brucella melitensis 16M (ATCC 23456)</i>	NTn hidrolasa	No PS	C12-HSL; 3OC12-HSL
<b>PvdQ (PA2385)</b>	<i>P. aeruginosa PAO1</i>	NTn hidrolasa	PS	C7-, C8-, C10-, C11-, C12-, C14-HSL; 3OC10-, 3OC12-, 3OC14-HSL; 3OH-C12-, 3OH-C14-HSL
<b>QuiP (PA1032)</b>	<i>P. aeruginosa PAO1</i>	NTn hidrolasa	PS	C6-, C7-, C8-, C10-, C12-, C14-HSL; 3OC10-, 3OC12-,
<b>AiiC</b>	<i>Anabaena sp. PCC7120</i>	NTn hidrolasa	Asociada a célula, PS	C4-, C6-, C8-, C10-, C12-, C14-HSL; 3OC4-, 3OC6-, 3OC8-, 3OC10-, 3OC12-, 3OC14-HSL y correspondiente 3OH-Cx-HSLs
<b>AiiO</b>	<i>Ochrobactrum sp. A44</i>	$\alpha/\beta$ hidrolasa	Citoplasmática	C4-, C6-, C10-, C12-, C14-HSL; 3OC4-, 3OC6-, 3OC8-, 3OC10-, 3OC12-, 3OC14-HSL y correspondiente 3OH-Cx-HSLs
<b>Oxidoreductasa</b>				
<b>CYP102A1 (P450BM-3)</b>	<i>Bacillus megaterium</i>	Citocromo P54 monooxigenasa	Citoplasmática	C12- a C16-HSL; 3OC12-HSL ( $\omega$ -1, $\omega$ -2, $\omega$ -3-hidroxilación)
<b>BpiB09</b>	<i>Metagenoma de suelo</i>	Familia Cadena pequeña dehidrogenasa/reductasa (SDR)	Citoplasmática	3OC12-HSL (NADPH-reducción dependiente para 3OH-C12-HSL)

Tabla 9. Enzimas con actividad hidrolítica anti-percepción de quórum empleada en aislados tipos (no clínicos). Cuadra traducida y tomada de ([LaSarre & Federle, 2013](#)). PS: péptido señal predicho, No PS: no péptido señal predicho de la secuencia de aminoácidos.

### 1.11.3.3 Oxidorreductasas

Comparado con la abundancia de datos y lactonasas y acilasas, para el caso de las enzimas oxidorreductasas con actividad inhibitoria del sistema de comunicación bacteriana, se han descrito muy pocos reportes de la inactivación de AHL vía oxidación o reducción. Este tipo de inactivación de AHL fue descrito inicialmente en *Rhodococcus erythropolis*, una bacteria capaz de utilizar un rango de AHL tanto como fuente de carbono como fuente de nitrógeno ([Uroz et al., 2005](#)). El mecanismo de acción de estas enzimas es igual que el de las lactonasas, inciden en el anillo de lactona ([Zhang, Feng, Wang, Wang, & Zhang, 2019](#)). Entre las primeras oxidorreductasas descritas se encuentra la CYP102A1, una citocromo P450 monooxigenasa aislada de *Bacillus megaterium* la cual es capaz de oxidar las AHL tanto aquellas con estereoquímica natural o no. Esta misma enzima se encontró como agente hidrolítico de 3OC12HSL. La acción de las oxidorreductasas sobre las moléculas no inactiva su función como autoinductores disminuyendo la señalización, por lo que esta estrategia no resulta convincente para su aplicación ([Bijtenhoorn et al., 2011](#); [Chowdhary et al., 2007](#); [Chowdhary, Stewart, Lopez, & Haines, 2008](#); [LaSarre & Federle, 2013](#); [Uroz et al., 2005](#)).

La mayoría de las enzimas enlistadas en la tabla 9 se han probado únicamente en cepas tipo como la PAO1 o cepas ATCC, por lo que no evalúan el comportamiento en aislados clínicos, que es donde se desea migrar este tipo de estrategias. Por lo que el presente trabajo se enfoca en la enzima AiiM.

### 1.12 Enzima AiiM.

En el 2009, Tomohiro Morohoshi y colaboradores, aislaron de las hojas del cultivo de papa una bacteria que era capaz de degradar moléculas AHL. Mediante la secuenciación del gen 16S identificaron a la bacteria responsable, *Microbacterium testaceum* ([Morohoshi, Someya, & Ikeda, 2009](#)). *Microbacterium* es un bacilo Gram positivo, delgado, no capsulado, no formador de esporas. Pertenece al filum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Micrococcales*, familia *Microbacteriaceae* ([NCBI, 2020](#)). *Microbacterium testaceum* es una bacteria

endófitas que residen dentro de las plantas sin causar síntomas de enfermedad ([Morohoshi, Wang, Someya, & Ikeda, 2011](#); [Zinniel et al., 2002](#)).

Posteriormente, también el grupo de trabajo que lidera Tsukasa Ikeda, comenzó a realizar los estudios para caracterizar bioquímicamente la enzima responsable de la hidrólisis de las moléculas de AHL. El gen responsable fue identificado como *aiiM* (*autoinducer inactivation gene from Microbacterium*). En el trabajo realizado probaron C6-, C8-, C10- y C12- HSL como sustratos de la enzima, observando que la proteína AiiM era capaz de hidrolizarlas, determinaron, también, que la actividad relativa, expresada en porcentaje es del 80% a un pH 6.5, mientras que a pH neutro y de 8 se alcanza la mayor actividad (100%), asimismo, la temperatura de acción va de aproximadamente 18°C a 60°C con una actividad relativa del 100% (gráfico 4) ([W. Z. Wang et al., 2010](#)).

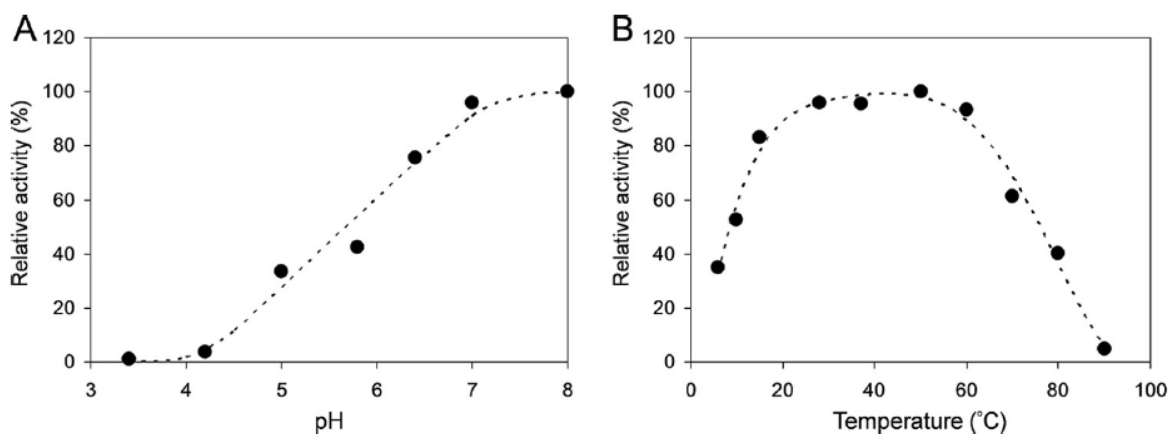


Gráfico 4. Actividades relativas en condiciones de pH (a) y temperatura (B) de la enzima AiiM ([W. Z. Wang et al., 2010](#)).

AiiM es una proteína compuesta por 243 aminoácidos, con un peso molecular de 26,081.77 Da y un punto isoelectrico de 6.9. Posee un coeficiente de extinción de Abs 0.1% (=1 g/L) 0.861 (tabla 10) ([ProtParam, 2020](#)).



Amino acid composition:			Atomic composition:		
Ala (A)	29	11.9%	Carbon	C	1159
Arg (R)	19	7.8%	Hydrogen	H	1840
Asn (N)	0	0.0%	Nitrogen	N	336
Asp (D)	15	6.2%	Oxygen	O	338
Cys (C)	0	0.0%	Sulfur	S	6
Gln (Q)	6	2.5%			
Glu (E)	11	4.5%	<b>Formula:</b>	$C_{1159}H_{1840}N_{336}O_{338}S_6$	
Gly (G)	23	9.5%	<b>Total number of atoms:</b>	3679	
His (H)	12	4.9%			
Ile (I)	10	4.1%			
Leu (L)	29	11.9%			
Lys (K)	3	1.2%			
Met (M)	6	2.5%			
Phe (F)	7	2.9%			
Pro (P)	16	6.6%			
Ser (S)	17	7.0%			
Thr (T)	15	6.2%			
Trp (W)	3	1.2%			
Tyr (Y)	4	1.6%			
Val (V)	18	7.4%			
Pyl (O)	0	0.0%			
Sec (U)	0	0.0%			
(B)	0	0.0%			
(Z)	0	0.0%			
(X)	0	0.0%			

Tabla 10. Composición química de la proteína AiiM, a la izquierda la composición porcentual de aminoácidos presentes. A la derecha la composición atómica. Datos tomados de ProtParam ExpASy. ([ProtParam, 2020](#))

Referente a la homología de secuencias, AiiM comparte menos del 15% de identidad con otras lactonasas. Con AiiA de *Bacillus sp.* 240B1 9.6%, AttM de *Agrobacterium tumefaciens* C58 9.6%, AhID de *Arthrobacter sp* IBN110 12.5%, OsdA de *Rhodococcus erythropolis* W2 12.5% y QlcA 14.9%, BpiB01 12.9%, BpiB04 13.3% y BpiB07 12.4% (metagenoma de suelo) ([W. Z. Wang et al., 2010](#)). Carece del motivo de unión a zinc HXHXDH presente en lactonasas metalo- $\beta$ -lactamasa el cual está presente en AiiA, AttM, AhID y QlcA pero no en Bpi01, Bpi04, Bpi07 y AiiM ([W. Z. Wang et al., 2010](#)).

El plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa es una de las arquitecturas proteínicas más diversas y distribuidas, esta familia incluye una diversidad enzimática como esterasas, proteasas, lipasas, deshalogenasas, haloperoxidasas, liasas y epóxido hidrolasas. Aunque pertenecen a la misma familia, estas enzimas no comparten mucha similitud de secuencia. La estructura común compartida es el plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa, el cual proporciona el andamiaje para los residuos catalíticos ([Holmquist, 2000](#); [Ollis et al., 1992](#); [W. Z. Wang et al., 2010](#)). A pesar de los avances con esta enzima, al momento se desconoce su estructura cristalográfica.

## 2. Justificación

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de trascendencia mundial, dinámico y creciente. Es por eso que instancias internacionales como la Organización Mundial de la Salud, desde el 2017, ha hecho el llamado a la comunidad científica para el desarrollo de nuevos antibióticos o estrategias que permitan tener un control sobre los microorganismos multidrogorresistentes ([Tacconelli, 2017](#)). Esta organización enlistó a las bacterias de acuerdo a prioridades. Entre las bacterias de prioridad alta se encuentran *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, productoras de carbapenemasas, *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas y *A. baumannii*, también resistente a carbapenémicos ([Tacconelli, 2017](#)).

De acuerdo al último reporte del CDC de Estados Unidos, el cual corresponde al 2019, reportaron en el año 2017 un estimado de 32,600 hospitalizaciones asociadas a *P. aeruginosa* multidrogorresistente ([CDC, 2019a](#)).

En México, en el trabajo coordinado por la Dra. Elvira Garza, en el cual participaron 46 centros pertenecientes a 22 entidades federativas del país, analizó el comportamiento en la susceptibilidad de diversos microorganismos, entre los que se destacan *P. aeruginosa*, encontrando tasas de resistencia de alrededor > 40% (se incluyeron aislados del 2009 a 2018) para carbapenémicos (meropenem e imipenem), siendo imipenem el antibiótico con mayor porcentaje de resistencia ([Garza-Gonzalez et al., 2020](#)). Asimismo, se observó un incremento en la resistencia a aztreonam, lo cual resulta particularmente interesante debido a que en México este antibiótico no se comercializa, lo que podría sugerir, en combinación con el aumento marcado en imipenem la posibilidad de que los mecanismos involucrados pudieran ser pérdida de la permeabilidad de la membrana asociada a porinas, bombas de eflujo e inclusive la presencia de carbapenemasas, dado que meropenem tenía un porcentaje de resistencia de alrededor del 40%. Sin embargo, la naturaleza del estudio no permite saber cuáles son los mecanismos ni cual es el porcentaje de aislados clínicos productores de carbapenemasas. Es por ello que se

precisa generar nuevas estrategias para frenar o detener la progresión de resistencia bacteriana.

A pesar de que se han creado algunas nuevas estrategias, como el uso de ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborbactam y el más reciente, cefiderocol se ha observado que la identificación del mecanismo de resistencia de cada bacteria es algo prescindible debido a que estas moléculas, excluyendo cefiderocol, tienen actividad bajo ciertas enzimas, pero la pierden frente a otras (metalo- $\beta$ -lactamasas) ([Berrazeg et al., 2015](#); [Haenni et al., 2017](#); [Karaikos et al., 2019](#); [Lapuebla et al., 2015](#); [Sader et al., 2018](#); [Zhanel et al., 2019](#); [Zhanel et al., 2013](#)).

El hecho de someter a un microorganismo a un ambiente que resulta nocivo para su supervivencia hace que se vea obligado a tratar de responder generando mecanismos que le permitan evadir esta adversidad, a este efecto se le conoce como presión de selección y es el causante de la aparición de mecanismos de resistencia inducidos por acción humana. Ante esto, diversos grupos han propuesto incidir en este problema de salud pública mundial mediante otras estrategias que disminuyan la presión de selección y por lo tanto no hagan que las bacterias monten una respuesta que la pueda evadir, esto debido a que el supuesto es que no se ve afectada la cinética de crecimiento.

Dentro de estas estrategias se encuentran la inhibición del sistema de percepción de quorum. Esta estrategia permite inhibir la comunicación bacteriana sin afectar su crecimiento *in vitro* y por lo tanto, la bacteria no es capaz de responder de manera social a los mensajes que se envían para el despliegue de la cascada génica de factores de virulencia ([Ben Haj Khalifa et al., 2011](#); [Case et al., 2008](#); [C. N. Chen et al., 2009](#); [Dong et al., 2000](#); [Fetzner, 2015](#); [Fleitas Martinez et al., 2018](#); [Mei et al., 2010](#); [Morohoshi et al., 2008](#); [Turan & Engin, 2018](#); [Zhang et al., 2019](#)). Este rubro se ha comenzado a abordar como posibilidad en su aplicación en diversas áreas, entre ellas en la de salud. Aunque se ha descrito diversas enzimas con actividad

inhibitoria de la comunicación bacteriana al momento la migración de las enzimas a aislados clínicos es técnicamente inexistente, basándose principalmente en cepas tipo o ATCC. Asimismo, se han hecho acercamientos a la evaluación en algunos modelos *in vivo*, por ejemplo, modelos de neumonía aguda en ratones utilizando *P. aeruginosa* PAO1 (cepa tipo) o modelos de quemadura e infección con *P. aeruginosa* PAO1 ([Gupta, Chhibber, & Harjai, 2015](#)). En ambos casos, se observó una disminución de la progresión, mayor sobrevida en las estrategias con lactonasa ([Gupta et al., 2015](#); [Migiyama et al., 2013](#)). El detalle o particularidad en estos ensayos, que, si bien abonan información para diseños ulteriores, es que se basan en cepas tipo, las cuales son cepas de laboratorio y se omite o escapa la diversidad de los aislados clínicos, quienes se han acondicionado para sobrevivir a la adversidad mediada por antibióticos.

A partir del 2017, se comenzó la migración de lo que se conocía de la estrategia de inhibición de la percepción de quorum, a través de enzimas, de cepas tipo a aislados clínicos, los cuales son los que representan el reto microbiológico. Guendouze y colaboradores ([Guendouze et al., 2017](#)) comenzaron a trabajar con aislados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes con pie diabético. Determinaron los factores de virulencia con o sin una lactonasa obtenida de *Sulfolobus solfataricus*, una arquea hipertermófila. La proteína en cuestión es denominada SsoPox, una lactonasa que pertenece a la familia similar a fosfotriesterasa (PLL). Esta enzima sufrió una modificación de su centro catalítico para poder aumentar la hidrólisis de AHL, de tal forma que se hizo la sustitución de un aminoácido, específicamente en el residuo 263, donde se sustituyó un triptófano por una isoleucina (SsoPox-W263I) ([Guendouze et al., 2017](#)). La concentración de enzima utilizada en los experimentos fue de 500 µg/mL. De manera general se encontró una disminución de los valores pertenecientes a la determinación de los factores de virulencia, y en comparación con otros inhibidores probados en el estudio como lo es la furanona C-30 y 5-fluoracilo, la enzima mostró un mejor desempeño que ellos, dado que existieron aislados clínicos que fueron resistentes a las últimas dos moléculas inhibitorias, lo cual ya ha sido previamente reportado ([Garcia-Contreras et al., 2013](#)). Si bien, en

general, este trabajo mostró una marcada disminución de los factores de virulencia y un mejor desempeño en comparación con los otros inhibidores probados, también mostró algunos aislados con una tolerancia al efecto de la enzima (gráfico 5), sin embargo, en el trabajo no se especifica el porqué de este comportamiento, por otro lado, es necesario mencionar que la concentración de la enzima utilizada, los 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , resultan un valor alto para una enzima que en principio se modificó para

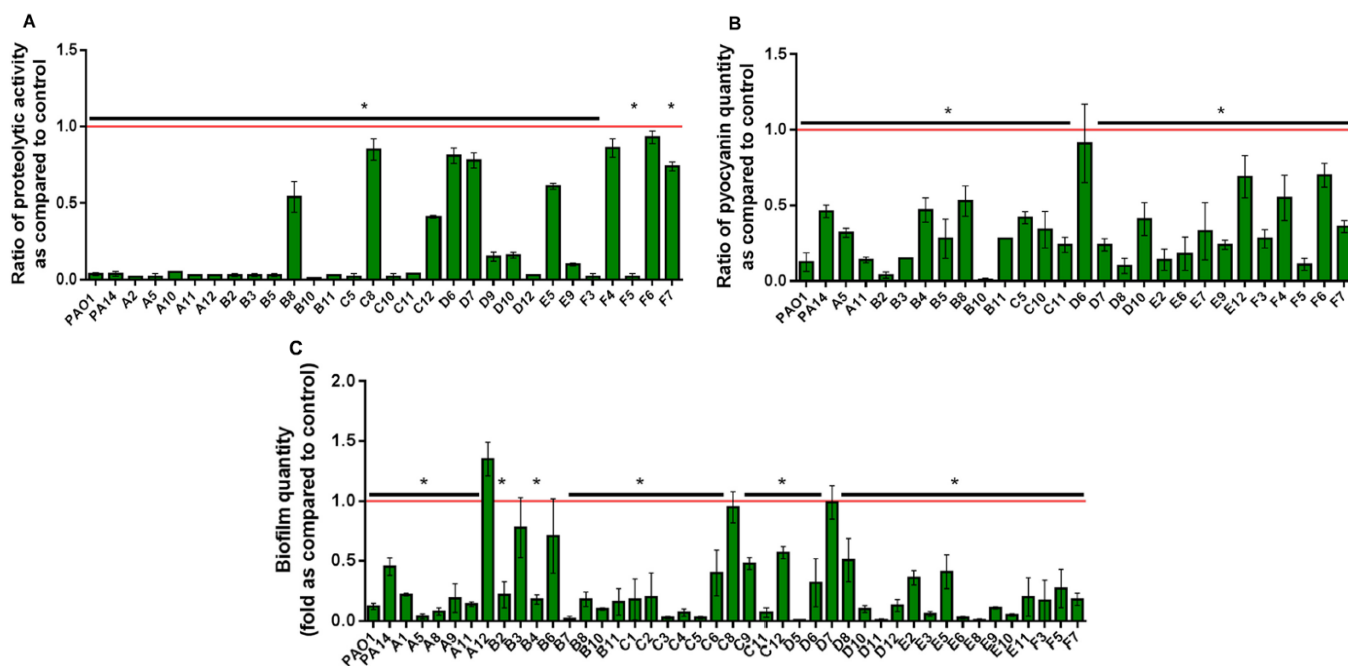


Gráfico 5. Inhibición de factores de virulencia utilizando SsoPox-W263I. para cada cepa, las barras representan la proporción media de los niveles de proteasa (A), piocianina (B) y biopelículas (C) entre los cultivos tratados con 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de SsoPox vs cultivos sin tratar. Imágenes tomadas de ([Guendouze et al., 2017](#)).

AiiM se ha empleado en el tratamiento de lodo residual generado en plantas de tratamiento, para entender la disminución de metano, uno de los gases principales en el efecto invernadero, el cual se encuentra genera por un consorcio microbiano. Phuong y colaboradores trataron con AiiM el lodo y determinaron la producción de metano con y sin la proteína. Encontraron una disminución sustancial en la producción de este gas con el tratamiento con AiiM a diversas concentraciones (gráfico 6) ([P. D. T. Nguyen et al., 2019](#)).

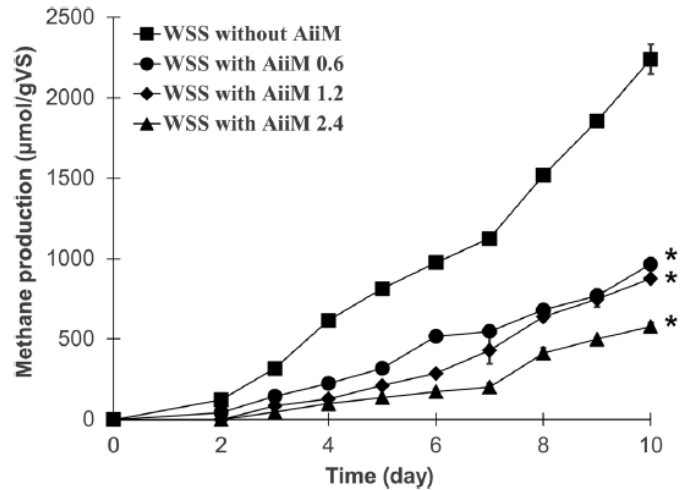


Gráfico 6. Impacto del uso de AiiM en la producción de metano en lodo residual con diferentes concentraciones de la proteína. En cuadros es lodo residual sin AiiM, en círculo es con 0.6 µg/mL, en rombo lodo residual con 1.2 µg/mL, finalmente, en triángulo, lodo residual con 2.4 µg/mL. Gráfico tomado de ([P. D. T. Nguyen et al., 2019](#)).

Con base en estos avances y la evidencia con el uso de lactonasa como estrategia inhibitoria de la percepción de quórum, nuestro grupo de trabajo desea saber si la lactonasa AiiM es capaz de inhibir la comunicación bacteriana y con ello disminuir los factores de virulencia en cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con quemaduras graves.

### 3. Diseño experimental

El presente trabajo es un estudio experimental de dos grupos, comparativo.

### 4. Hipótesis

#### 4.1 Hipótesis alterna.

La lactonasa AiiM será capaz de inhibir la percepción de quórum y factores de virulencia de cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con quemaduras graves.

#### 4.2 Hipótesis nula.

El tratamiento con lactonasa AiiM a los aislados clínicos de *P. aeruginosa* no disminuirá los factores de virulencia.

### 5. Objetivos

#### 5.1 Objetivo general.

Determinar la capacidad inhibitoria de la percepción de quórum de la proteína lactonasa AiiM en cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con quemaduras graves asociadas a procesos infecciosos.

#### 5.2 Objetivos específicos.

- Determinar la producción de factores de virulencia regulados por el sistema de percepción de quórum: plicianina, elastasa, proteasa alcalina y HCN.
- Determinar la presencia de los genes asociados al sistema Las (*lasI/lasR*) y sistema Rhl (*rhlI/rhlR*).
- Determinar la presencia de autoinductores de cadena larga mediante la cepa biosensora *Agrobacterium tumefaciens* NT1 pZLR4.
- Determinar la actividad inhibitoria de la percepción de quórum de la enzima AiiM.

## 6. Metodología

### 6.1 Aislados clínicos.

Se seleccionaron aleatoriamente 200 aislados clínicos del cepario del laboratorio de infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra en un periodo que comprendió de julio del 2011 a diciembre del 2016 mediante aleatorización ([Dallal, 2008](#)). Fueron seleccionadas aquellos aislados clínicos recuperados de muestras con valor microbiológico. Muestras con bajo poder microbiológico fueron excluidas (heridas, hisopados, expectoraciones). Los aislados clínicos fueron identificados inicialmente con el sistema semiautomatizado Vitek 2 Compact (Biomérieux, Francia). Las cepas fueron sembradas en agar sangre de carnero al 5% y agar MacConkey y se realizaron pruebas de escrutinio para corroborar la concordancia con la identificación inicial. Las pruebas de escrutinio fueron morfología macroscópica, morfología microscópica mediante la tinción de Gram, lactosa, indol rápido y oxidasa.

### 6.2 Electroforesis en gel por campos pulsados.

Con la finalidad de quitar el sesgo de selección, realizamos electroforesis en gel por campo pulsado para hacer un cribado con base en su perfil de restricción. Los aislados se pusieron a crecer toda la noche (18 h) en caldo BHI. Posteriormente, se tomaron 500  $\mu$ L de caldo con crecimiento bacteriano y se centrifugaron en tubos de 1.5 mL en microcentrífuga a 14,000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y el botón se resuspendió en 150  $\mu$ L de PIV (Tris 1 M (Sigma Aldrich 93362), NaCl 1M (Sigma Aldrich S3014), pH 7.6) y se incubaron a 50°C por no más de 15 minutos. Posterior a la incubación se agregó 1  $\mu$ L de lisostafin (1 mg/mL, Sigma Aldrich L7386), posteriormente se tomaron 150  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión y se mezcló por inversión con los 150  $\mu$ L del botón bacteriano. Se formaron bloques de agarosa embebidos con bacterias y se dejó gelificar durante 30 min. Los bloques fueron removidos de los moldes y se depositaron en microtubos de 1.5 mL, a cada se les agregaron, 500  $\mu$ L de buffer de lisis (Tris 1 M pH 7.6 (Sigma Aldrich 93362), NaCl 1 M (Sigma Aldrich S3014), EDTA 100mM (Sigma Aldrich EDS), Brij58 0.5% (Sigma Aldrich P5884), desoxicolato de sodio al 0.2% (Sigma Aldrich 30970),



N-laurilsarcosinato de sodio al 0.5% (Sigma Aldrich L5777), RNAsa A 2.5  $\mu$ L (20 mg/mL, Sigma Aldrich R4875) y lisostafin 2.5  $\mu$ L (1 mg/mL, Sigma Aldrich L7386)), los tubos fueron incubados a 50°C durante toda la noche. Concluida la incubación el buffer fue eliminado con micropipetas y se adicionaron 500  $\mu$ L de buffer ESP (EDTA 0.4M (Sigma Aldrich EDS), N-laurilsarcosinato de sodio al 0.1% (Sigma Aldrich L5777), pH 9-9.5 y proteinasa K 2.5  $\mu$ L (20 mg/mL, Sigma Aldrich P2308)), los tubos fueron incubados a 50°C durante toda la noche, posteriormente se hicieron 3 lavados con buffer TE (Tris 5  $\mu$ M (Sigma Aldrich 93362), EDTA 5  $\mu$ M (Sigma Aldrich EDS) pH 7.5) de 10 minutos cada uno. Se realizó un último lavado con TE 0.1X durante 10 minutos. Posteriormente, se rotuló un tubo por cada muestra, se colocó un bloque y 300  $\mu$ L de buffer de restricción 1X durante 15 minutos. Pasado el tiempo, se eliminó el buffer que se encontraba en cada tubo y se colocaron nuevamente 300  $\mu$ L de buffer de restricción 1X con 30 U de enzima de restricción *Spe* I (New England BioLabs Inc. R0133M). La digestión enzimática se dejó a 37°C durante 18 h. Los geles fueron corridos utilizando agarosa certificada para campos pulsados al 1% (BioRad 1620138) y se corrieron en un CHEF Mapper System (BioRad, EEUU) con 2 L de buffer de corrimiento TBE 0.5X. Las condiciones de corrimiento fueron: Sw inicial 5.3 s, Sw final 34.9 s, forma de rampa: lineal, V/cm 6, ángulo: 120°, tiempo: 19.5 h. Posterior al corrimiento, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 15 minutos y se visualizaron en un Gel DOC™ XR C con el software Lab™ software (BioRad, EEUU). Para la selección de los aislados clínicos se consideraron aquellos con patrones de restricción diferentes de acuerdo a los criterios de Tenover ([Miranda et al., 1996](#); [Tenover et al., 1995](#)).

### 6.3 Concentraciones mínimas inhibitorias.

Una vez seleccionadas las cepas a trabajar (n=30) se realizaron las pruebas de susceptibilidad con el estándar de oro que es la microdilución en caldo. Para ello se prepararon placas de los siguientes antibióticos: amikacina (Sigma Aldrich A1774), gentamicina (Sigma Aldrich G3632), aztreonam (Sigma Aldrich PZ0038), ceftazidima (Sigma Aldrich C3809), cefepime (Sigma Aldrich PHR1763), ciprofloxacina (Sigma Aldrich 17850), levofloxacino (Sigma Aldrich 28266),

doripenem (Sigma Aldrich 32138), imipenem (Sigma Aldrich I0160), meropenem (Sigma Aldrich M2574), colistin (Sigma Aldrich C4461), y piperacilina/tazobactam (Sigma Aldrich P8396/T2820) de 64-0.0625 µg/mL. Se siguieron las recomendaciones del M07-A10 de la CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, por sus siglas en inglés) ([CLSI, 2015](#)). Cada antibiótico fue preparado en una placa poliestireno de 96 pozos, se agregaron 100 µL de la mezcla de cada antibiótico con caldo Mueller Hinton suplementado con cationes. Del pozo 1 al 11 se pusieron las diluciones seriadas, partiendo de 64 µg/mL a 0.0625 µg/mL, el pozo 12 es el control de crecimiento para cada cepa probada. Se utilizó la cepa tipo *P. aeruginosa* ATCC 27853 para validar el resultado de cada antibiótico. Posterior a la preparación de las placas, se hicieron suspensiones de cada cepa al 0.5 de la escala de McFarland con la ayuda de un densicheck (Biomerieux, Francia), una vez ajustados los inóculos se hicieron diluciones 1:20 y se agregaron a cada pozo 10 µL de la suspensión. La interpretación de los resultados se realizó de manera visual basándose en los puntos de corte del M100 de la CLSI ([CLSI, 2019](#)).

#### 6.4 Detección de los genes *las/rhl*

Para saber que los aislados seleccionados tenían los genes que codifican para la proteína sintasa de cada sistema (*LasI* y *RhlI*) así como los receptores transcripcionales *lasR* y *rhlR* se identificaron los genes mediante PCR de punto final. Se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan la mayor longitud del gen con la ayuda del software Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Inc. EEUU).

Los aislados clínicos se sembraron en agar sangre de carnero al 5% y se incubaron a 37°C durante 18 h. Se tomó una colonia de cada aislado y se pusieron en tubos de 1.5 mL con 500 µL de solución salina. El DNA se extrajo mediante choque térmico a 95°C durante 10 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se pasó a nuevos tubos de 1.5 mL estériles. En la tabla 11 se muestran las secuencias de los genes amplificados.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L (buffer de amplificación 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 200 mM, oligonucleótido 0.2 mM de cada uno (delantero y reverso), *Taq* polimerasa 0.026 U/mL (Amplitaq Gold DNA polimerase, Applied Biosystems N808-0241, EEUU), 3  $\mu$ L de DNA y se ajustó el volumen de 25  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O grado biología molecular. Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes. 95°C durante 10 min, 95°C 30 s, 58°C 45 s y 72°C durante 50 s. Estas tres temperaturas durante 35 ciclos, por último, 4°C (Veriti 96 well thermal cycler, Applied Biosystems, EEUU). Los productos de las reacciones se cargaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR green I (Life Technologies S7567, EEUU), el gel fue visualizado en el sistema Gel Doc™ XR C con el software Lab™ (BioRad, EEUU). Como control positivo se utilizó la cepa tipo de *P. aeruginosa* PAO1. Como control negativo se utilizó la doble mutante  $\Delta$  *lasR/rhlR* de *P. aeruginosa* PAO1 proporcionada por la Dra. Gloria Soberón Chávez.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *lasI/lasR*, *rhlI/rhlR* empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño (pb)
<i>lasI</i> -F 5'-CGCGAAGAGTTCGATAAA-3'	59.7	531
<i>lasI</i> -R 5'-GGTCTTGGCATTGAGTTC-3'	58.7	
<i>lasR</i> -F 5'-ATGGCCTTGGTTGACGGT-3'	65.9	706
<i>lasR</i> -R 5'-GACCCAAATTAACGGCCA-3'	63.7	
<i>rhlI</i> -F 5'-TTGCTCTCTGAATCGCTG-3'	61	590
<i>rhlI</i> -R 5'-GCCATCGACAGCGGTACG-3'	68.3	
<i>rhlR</i> -F 5'-ATGAGGAATGACGGAGGC-3'	63.2	675
<i>rhlR</i> -R 5'-CGCGTCGAACCTTCTTCTG-3'	62.9	

### 6.5 Amplificación del gen *aiiM*.

La cepa utilizada para la sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante AiiM fue donada por Nguyen Thi Dong Phuong y Toshinari Maeda del departamento de ingeniería de funciones bioquímicas del Instituto de Tecnología de Kyushu, Kitakyushu, Japón. El gen *aiiM* se encuentra clonado en el plásmido recombinante

pQE30, el cual se encuentra transformado en la cepa de *E. coli* M15/pREP4. Dicha cepa tiene 2 genes de resistencia, uno conferido por el plásmido pQE30 (ampicilina) y otro por pREP4 (kanamicina). Para poder corroborar que la cepa tenía el plásmido portador del gen *aiiM* se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan completamente el gen (*aiiM* F 5'- ATGATCCTCGCCCACGAC-3', *aiiM* R 5'- TCAGCGGACGAAAGCCTC-3'). La cepa fue expandida en agar BHI con kanamicina 50 µg/mL (Sigma Aldrich K1876) y carbenicilina 100 µg/mL (Sigma Aldrich C1389). Se incubó a 37°C durante 18 h. posteriormente se tomó una colonia y se resuspendió en 500 µL de solución salina. La lisis celular se hizo mediante choque térmico a 95°C durante 15 min. Posteriormente el tubo se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de 1.5 mL.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL (buffer de amplificación 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 200 mM, oligonucleótido 0.2 mM de cada uno (delantero y reverso), *Taq* polimerasa 0.026 U/mL (Amplitaq Gold DNA polimerase, Applied Biosystems N808-0241, EEUU), 3 µL de DNA y se ajustó el volumen de 25 µL con H<sub>2</sub>O grado biología molecular. Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes. 95°C durante 10 min, 95°C 30 s, 56°C 45 s y 72°C durante 50 s. Estas tres temperaturas durante 35 ciclos, por último, 4°C (Veriti 96 well thermal cycler, Applied Biosystems, EEUU). Los productos de las reacciones se cargaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR green I (Life Technologies S7567, EEUU), el gel fue visualizado en el sistema Gel Doc™ XR C con el software Lab™ (BioRad, EEUU).

## 6.6 Purificación de *AiiM*.

Una vez que la amplificación corroboró la presencia del gen de interés se comenzaron a realizar los ensayos de purificación. La cepa se puso a crecer toda la noche en 50 mL de caldo Luria Bertani con 100 µg/mL de carbenicilina (Sigma Aldrich C1389) y 50 µg/mL de kanamicina (Sigma Aldrich K1876). Se puso a agitar a 220 rpm durante toda la noche (Agitador orbital Forma 420, Thermo Scientific, EEUU). Se agregaron 10 mL del crecimiento bacteriano a 1 L de caldo *terrific* con 100

$\mu\text{g/mL}$  de carbenicilina y  $50 \mu\text{g/mL}$  de kanamicina. Se estuvo monitoreando la densidad óptica, cuando esta alcanzó una  $\text{DO}_{600\text{nm}} 0.5$  se inició la inducción con  $500 \mu\text{M}$  de IPTG. El cultivo se mantuvo en agitación a  $220 \text{ rpm}$ ,  $37^\circ\text{C}$  durante  $6 \text{ h}$ . Concluido el tiempo todo el caldo se centrifugó a  $10,000 \text{ rpm}$  durante  $40 \text{ minutos}$ . Una vez compactado el botón celular se desechó el sobrenadante. El botón celular fue resuspendido en  $40 \text{ mL}$  de buffer de purificación ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $50 \text{ mM}$  (Sigma Aldrich S3139),  $\text{NaCl}$   $300 \text{ mM}$  (Sigma Aldrich S9888) y glicerol  $10\%$  (Sigma Aldrich G5516),  $\text{pH}$   $8$ ) y  $500 \mu\text{M}$  de PMSF (Sigma Aldrich P7626). Posterior a la resuspensión se sonicó para promover la ruptura celular (amplitud  $45\%/45 \text{ s}$  y  $2 \text{ min}$ . de reposo, esto durante  $10$  ciclos, Procesador ultrasónico, Cole Parmer, EEUU) y se volvió a centrifugar para separar el crudo proteico de los restos celulares durante  $40 \text{ min}$  a  $10,000 \text{ rpm}$ . Antes de la purificación la columna se equilibró con  $3$  volúmenes de buffer de purificación (volumen de columna=  $20 \text{ mL}$ ) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $50 \text{ mM}$  (Sigma Aldrich S3139),  $\text{NaCl}$   $300 \text{ mM}$  (Sigma Aldrich S9888) y glicerol  $10\%$  (Sigma Aldrich G5516),  $\text{pH}$   $8$ ). El sobrenadante fue pasado a través de un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$ , posteriormente el crudo se pasó a través de la columna de purificación de afinidad Protino® Ni-TED (Macherey-Nagel, 745200.600) para la purificación por afinidad debido a que la proteína recombinante cuenta con colas de histidinas como marca. Una vez que pasó todo el crudo por la columna se realizó un lavado con  $2$  volúmenes de columna con el buffer de purificación para remover todo lo que no se haya fijado a la resina. La elución se llevó a cabo con  $2$  volúmenes de columna de imidazol  $5 \text{ mM}$  (Sigma Aldrich I5513). Posteriormente  $2$  volumen de imidazol  $10 \text{ mM}$ ,  $2$  volúmenes de imidazol  $20 \text{ mM}$  y finalmente  $2$  volúmenes de columna con imidazol  $150 \text{ mM}$ . Las fracciones fueron recolectadas y se concentraron dentro de una membrana de diálisis (Sigma Aldrich D9777) y polietilenglicol  $35 \text{ KDa}$  (Sigma Aldrich 946-46). Posterior a la concentración se realizó la diálisis para remover el buffer de purificación por buffer de diálisis (Tris  $50 \text{ mM}$ ,  $\text{NaCl}$   $300 \text{ mM}$   $\text{pH}$   $7.5$ ). Para visualizar la proteína purificada se realizó un corrimiento en SDS-PAGE a  $200 \text{ V}$  durante  $1 \text{ h}$ . el gel fue teñido y se realizó la observación. La concentración de proteína fue cuantificada utilizando un NanoDrop 2000 (Thermofisher Scientific, EEUU)

utilizando el factor de extinción (Abs 0.1%) de 1.08. las alícuotas de proteína fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

### 6.7 Actividad de AiiM contra N-acil homoserin lactonas.

Una vez purificada la proteína fue necesario realizar los ensayos de actividad, para ver que la proteína era capaz de hidrolizar moléculas HSL diseñamos experimentos basados en HPLC, para ello utilizamos el equipo Alliance HPLC (Waters, EEUU) del laboratorio de Fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la facultad de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó una columna Symmetry C18 (75 mm, 3.5 mm; Waters, EEUU). Se incluyeron tanto moléculas aciladas de cadena corta como de cadena larga. Las moléculas analizadas fueron; N-butil-DL homoserin lactona 1 mM (C4-HSL; Sigma Aldrich 09945), N-3-oxo-octanoil-HSL 1 mM (3OC8-HSL; Sigma Aldrich O1764), N-decanoil-HSL 1 mM (C10-HSL; Sigma Aldrich 17248), 3-oxo-decanoil-L-HSL 1 mM (3OC10-HSL; Sigma Aldrich O9014) y por último 3-oxo-dodecanoil-HSL 1 mM (3OC12-HSL; Sigma Aldrich O9139). Como control positivo se utilizó NaOH 60 mM dado que induce un ataque hidrolítico que rompe el anillo de lactona. Para parar la reacción se utilizó HCl 2N. Se probaron diversas concentraciones de AiiM para determinar la concentración de trabajo. Las concentraciones utilizadas fueron: 250, 100, 50, 25, 10 y 5 µg/mL. Asimismo, se hicieron pruebas de exposición para determinar el tiempo necesario en el cual la proteína hidroliza las moléculas HSL, para ello se realizaron incubaciones de 24 h, 2 h, 1 h, 30 min, 10 min, y 5 min. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes: temperatura de columna 25°C, temperatura de la muestra 25°C, volumen de inyección 10 µL, rango de flujo 1 mL/min, detección 205 nm. La elución de la muestra fue hecha con buffer de fosfatos 50 mM, pH 2.9:acetonitrilo. Para C4-HSL se utilizó en una relación 90:10, 3OC8-HSL 60:40, C10-HSL 60:40, 3OC10-HSL 60:40 y 3OC12-HSL 50:50.

### 6.8 Crecimiento bacteriano con y sin AiiM.

Una vez identificada la concentración de trabajo se realizaron pruebas para determinar si AiiM afectaba el crecimiento bacteriano. Para ello, seleccionamos

como controles de crecimiento la cepa tipo *P. aeruginosa* debido a que cuenta con el sistema de percepción de quórum completo y funcional, y por otro lado seleccionamos la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta lasR/rhlR$ , la cual es una mutante sin percepción de quórum. Ambas cepas se pusieron a crecer en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de caldo LB a 37°C con agitación a 220 rpm, estos cultivos se realizaron por triplicado. Al día siguiente, se leyeron las DO<sub>600nm</sub> (espectrofotómetro Genesys™ 20, Thermo Scientific. EEUU) de cada cepa en los matraces. Posteriormente, en nuevos matraces Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de LB se iniciaron los cultivos a 0.05 DO<sub>600nm</sub> cada uno de ellos. Se tomaron lecturas de DO<sub>600nm</sub> basal (posterior a la inoculación de 0.05 DO<sub>600nm</sub>), 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h y 12 h.

## 6.9 Determinación de factores de virulencia.

### 6.9.1 Cultivos con y sin AiiM

Para la realización de los experimentos para la determinación de los factores de virulencia se pusieron a crecer las cepas a utilizar, tanto las clínicas como los controles. Se utilizaron como controles la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1. Como control negativo se incluyeron dos cepas mutantes, *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta lasR/rhlR$  y  $\Delta lasI/rhlI$  las cuales son cepas mutantes del sistema de percepción de quórum, la primera doble mutante de los reguladores transcripcionales, tanto del sistema Las (*lasR*) como del sistema Rhl (*rhlR*) y la segunda doble mutante de las sintasas del sistema Las (*lasI*) como del sistema Rhl (*rhlI*). Esto, con la finalidad de tener control de ambos componentes del sistema de comunicación. Las cepas se pusieron a crecer en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de caldo LB durante toda la noche, al término de la incubación, se iniciaron nuevos cultivos en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de caldo LB a una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.05 y se incubaron a 37°C/220 rpm durante 18 h. Cada cepa se procesó por triplicado y en las dos condiciones, con y sin proteína AiiM 5 µg/mL. Al término de la incubación los cultivos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 2 minutos. Los sobrenadantes fueron colocados en tubos de 2 mL estériles para los siguientes experimentos. Se utilizó un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de caldo LB con

y sin AiiM 5 µg/mL, igualmente se incubó y centrifugó con las mismas condiciones que las cepas, esto, para poder utilizarlo como control de esterilidad, control negativo y poder utilizarlo como blanco de lectura.

### 6.9.2 Actividad de elastasa

Se realizó la cuantificación de la actividad de la elastasa, para ello se hicieron bajo dos condiciones, con y sin tratamiento (enzima AiiM a 5 µg/mL). Se pesaron 2.5 mg de elastina-rojo Congo como sustrato (Sigma Aldrich E0502) en microtubos de 2 mL. Justo antes de empezar con los experimentos se agregaron 950 µL de buffer de reacción de elastasa (Tris-HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.5) y se adicionaron 50 µL del sobrenadante de cada muestra (previamente mencionado). Los tubos se mezclaron por agitación en remolino durante 10 s y se incubaron a 37°C con agitación orbital a 220 rpm durante 2 h. Posterior a la incubación, los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se separó en tubos nuevos de 1.5 mL y posteriormente todos los sobrenadantes fueron leídos a 495 nm (SmartSpec plus, BioRad, EEUU) ([Ohman, Cryz, & Iglewski, 1980](#)). Se utilizó como blanco de lectura un tubo con las mismas condiciones de trabajo inicial, pero sin inóculo bacteriano. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 6.9.3 Actividad de proteasa alcalina

La proteasa alcalina fue realizada de acuerdo a lo descrito previamente por Howe y colaboradores ([Howe & Iglewski, 1984](#)) con algunas modificaciones. Al igual que en el caso de la determinación de la actividad elastolítica, en tubos de 1.5 mL nuevos se pesaron 2.5 mg de Hide-Remazol azul brillante (Sigma Aldrich H6268) como sustrato. A cada tubo se le agregaron 950 µL buffer de reacción de proteasa (Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8) y 50 µL del sobrenadante (punto 6.9.1). Los tubos se mezclaron vigorosamente por agitación, se incubaron 20 min a 37°C con una agitación de 220 rpm. Pasado el tiempo, se leyeron en espectrofotómetro a 595 nm (SmartSpec Plus, BioRad. EEUU). Para las lecturas fueron normalizadas a cero con blanco de lectura, tomando 50 µL del sobrenadante del caldo sin inóculo y se siguió



con el protocolo previamente descrito. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 6.9.4 Piocianina

Para la cuantificación de piocianina se tomaron 800  $\mu$ L del sobrenadante previamente mencionado (punto 6.9.1), el cual se depositó en un tubo de 2 mL. Posteriormente se agregaron 400  $\mu$ L de cloroformo. El tubo se agitó vigorosamente en agitador orbital durante 2 minutos, pasado el tiempo, los tubos se centrifugaron 5 minutos a 14,000 rpm. Se tomaron 300  $\mu$ L de la fase orgánica y se pusieron en un nuevo tubo de 2 mL. Se adicionaron 800  $\mu$ L de HCl 0.2 N y nuevamente se mezclaron vigorosamente por agitación orbital durante 2 min. Las muestras fueron leídas a 520 nm (SmartSpec Plus, BioRad. EEUU) ([Maeda et al., 2012](#)). Para la normalización de la lectura en 0, se realizó el mismo procedimiento, pero con caldo proveniente del matraz Erlenmeyer que no se inoculó con bacterias. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 6.9.5 HCN

Para la determinación de HCN, se pusieron a crecer previamente todas las cepas, incluidas las cepas tipo *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo), *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ lasR/rhlR y  $\Delta$ lasI/rhlI (controles negativos). Se pusieron a crecer los cultivos en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de caldo LB durante toda la noche, esto con la finalidad de tener cultivos frescos. Al día siguiente, se iniciaron nuevos cultivos en matraces de la misma capacidad con 3 mL de caldo LB con una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.05 para cada cepa. Posteriormente, se puso un tapón de goma y se pusieron a incubar durante 18 h a 37°C con agitación orbital a 220 rpm. Pasado el tiempo, se insertaron dos agujas en el tapón de goma. Uno de ellos se utilizó para bombear aire al matraz con el cultivo bacteriano durante 1 h., y el otro para coleccionar el desplazamiento de gases en otro matraz colector el cual contenía 5 mL de NaOH 4 M. Las concentraciones de HCN fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por Gallagher y colaboradores. Brevemente; las muestras fueron mezcladas con *o*-dinitrobenzoceno 100 mM y *p*-nitrobenzaldehído 220 mM en una relación 1:1, ambos

reactivos se encuentran disueltos en 2-metoxietanol. Posteriormente se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo de incubación las muestras se leyeron a 578 nm (espectrofotómetro Genesys™ 20, ThermoScientific. EEUU) ([Gallagher & Manoil, 2001](#)). Los resultados obtenidos fueron comparados con la curva de calibración realizada con controles con KCN. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 6.9.6 Curva de dosis-respuesta de AiiM y disminución de su actividad mediante la adición exógena de 3OC12-HSL.

Para este experimento fue seleccionado como control la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1 y la cepa clínica P809. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los cultivos se pusieron a crecer en matraces de 50 mL con 5 mL de caldo LB durante toda la noche, al día siguiente, los cultivos se reinocularon en 5 mL de caldo LB a una DO<sub>600nm</sub> de 0.05, sin y con la proteína AiiM a diferentes concentraciones: 0.05, 1, 2.5, 5 µg/mL. Los matraces fueron incubados a 37°C a 220 rpm durante 18 h. posteriormente los cultivos fueron centrifugados y se separó el sobrenadante para realizar las determinaciones de elastasa y piocianina como se describió previamente (6.9.2 y 6.9.4). Además, en otro matraz Erlenmeyer se arrancó un cultivo bacteriano, nuevamente con una DO<sub>600nm</sub> de 0.05, cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600nm</sub> de 1 se agregó exógenamente 3OC12-HSL a una concentración final de 30 µM y se dejó incubar hasta completar las 18 h a 37°C/220 rpm., pasado el tiempo, los cultivos se centrifugaron y se recolectó el sobrenadante para poder realizar las determinaciones de elastasa y piocianina (descritos en 6.10.2 y 6.10.4).

#### 6.9.7 Detección de moléculas aciladas de cadena larga y su inactivación mediante la proteína AiiM.

Además de realizar las pruebas moleculares para determinar que las cepas tenían los genes asociados al sistema de percepción de quórum, tanto del sistema Las (*lasI/lasR*) como del sistema Rhl (*rhlI/rhlR*), es necesario observar que las cepas producen las moléculas autoinductoras, para ello utilizamos la cepa biosensora *Agrobacterium tumefaciens* NT1 pZLR4 donada por el Dr. Rodrigo Horacio

González de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. La cepa se puso a crecer en 1 L de medio mínimo M9 a 28°C durante 24 h. Posteriormente, todo el cultivo se centrifugó, el sobrenadante se desechó y se resuspendió en 15 mL de medio mínimo M9 el botón celular. Posteriormente se hicieron alícuotas de 1 mL en tubos de 1.5 mL estériles. Se preparó 1 L de medio mínimo M9 y se le adicionó agar 2% (concentración final), se esterilizó y se dejó enfriar evitando la gelificación, en ese punto se agregó 1 mL del cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* NT1 pZLR4 por cada 100 mL de medio, se mezcló perfectamente y posteriormente se agregó Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido, USB corporation, Cleveland, OH, EEUU) a una concentración final de 40  $\mu$ g/mL ([Shaw et al., 1997](#)), nuevamente se mezcló y se vertió en placas Petri de 90X15 mm. Las placas se dejaron gelificar. A continuación, se pusieron discos de papel filtro sobre las placas, uno por cada cepa (con y sin AiiM) y se agregaron 15  $\mu$ L del sobrenadante (6.10.1). Asimismo, se colocaron 15  $\mu$ L de: C10-HSL 1 mM, 3OC10-HSL 1 mM y 3OC12-HSL como control positivo. Para el control negativo se agregaron las mismas moléculas más NaOH 60 mM y, por último, como control de hidrólisis, se agregaron las moléculas aciladas de cadena larga más AiiM 5  $\mu$ g/mL. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 18 h, se consideró como una reacción positiva (molécula presente y funcional) como la presencia de un halo verde alrededor del disco, la ausencia o hidrólisis de la molécula era evidenciada por la ausencia de halo verde. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 6.9.8 Sistema de secreción tipo 3.

Para el análisis del sistema de secreción tipo 3 seleccionamos dos aislados clínicos (H015 y P729) y las cepas tipo *P. aeruginosa* PAO1 y PA14.

Las cepas se crecieron previamente en matraces Erlenmeyer con LB durante 18 h. a 37°C con agitación a 220 rpm. Al día siguiente, se hizo una dilución 1:200 del cultivo en 4 mL de caldo LB suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM y EGTA 5 mM (pH 7.4) con y sin AiiM 5  $\mu$ g/mL. Se incubaron a 37°C hasta tener un crecimiento de 0.8-1 DO<sub>600nm</sub>. Al término del tiempo de incubación se tomó 1 mL de

cada cultivo y se centrifugó a 14,00 rpm durante 2 min, se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 200  $\mu$ L de buffer Laemmli SDS 1X, nuevamente se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron durante toda la noche a 4°C mediante la adición de ácido tricloroacético a una concentración final del 10%. Transcurrido el tiempo se volvió a centrifugar y el botón se resuspendió en 20  $\mu$ L de buffer Laemmli SDS el cual contenía Tris base 10% saturado. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 15% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, a continuación, se hibridó con sonda para los efectores ExoS y ExoU por inmunoblot. La detección se realizó utilizando Immobilon Western quimioluminiscente HRP como sustrato (Millipore). Las bandas fueron visualizadas en placas de rayos X (Carestream MXB film). Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 6.9.9 Inactivación de antibióticos $\beta$ -lactámicos antipseudomónicos.

Una familia de antibióticos de primera línea para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* son los  $\beta$ -lactámicos, los cuales tienen un anillo de lactona (anillo  $\beta$ -lactámico), por lo que era importante evidenciar que está lactonasa no tenía la capacidad de hidrolizar dicho anillo. Para ello, diseñamos un experimento para observar si existía dicha inactivación, el cual fue realizado utilizando discos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Brevemente, se agregaron 2 mL de solución salina isotónica 0.8% en tubos de poliestireno de 12x75 mm. Se realizaron ensayos para ceftazidima 30  $\mu$ g, (BD, EEUU), cefepime 30  $\mu$ g (BD, EEUU), imipenem 10  $\mu$ g (BD, EEUU) y meropenem 10  $\mu$ g (BD, EEUU). Un set de discos se probó exclusivamente con solución salina isotónica como control negativo, otro set de tubos con AiiM 5  $\mu$ g/mL y finalmente, como control positivo de hidrólisis de los antibióticos se agregó a cada tubo solución salina isotónica con NaOH 60 mM. Para evidenciar la actividad de los antibióticos se utilizó la cepa pansusceptible *E. coli* ATCC 25922. Los discos fueron incubados durante 1 y 10 minutos; 2 y 24 h a 37°C. Quince minutos previos a cumplirse el tiempo de incubación se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 de la escala de McFarland con la cepa pansusceptible *E. coli* ATCC 25922 y se inoculó

una placa de agar Müller-Hinton (BD, EEUU). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los diámetros de inhibición se midieron con Vernier.

## 7. Resultados

Los resultados de este trabajo se encuentran publicados en el artículo:

López-Jácome LE, Garza-Ramos G, Hernández-Durán M, Franco-Cendejas R, Loarca D, Romero-Martínez D, Nguyen PTD, Maeda T, González-Pedrajo B, Díaz-Guerrero M, Sánchez-Reyes JL, Díaz-Ramírez D and García-Contreras R (2019) AiiM Lactonase Strongly Reduces Quorum Sensing Controlled Virulence Factors in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burned Patients. *Front. Microbiol.* 10:2657. doi: 10.3389/fmicb.2019.02657

### 7.1 Selección de los aislados clínicos.

Incluimos 200 aislados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes con quemaduras atendidos en el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, los cuales se encuentran almacenados en el cepario del laboratorio de Infectología. Esta selección inicial se realizó de manera aleatorizada con la finalidad de eliminar el sesgo de selección. Una vez seleccionados hicimos una segunda selección basándonos en los patrones de restricción derivada de la electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE). Empleando los criterios de Tenover ([Tenover et al., 1995](#)), seleccionamos visualmente aquellos aislados que no compartían el mismo patrón de restricción (imagen 34). De esta forma, se incluyeron para el análisis final de este trabajo 30 aislados de *P. aeruginosa*.

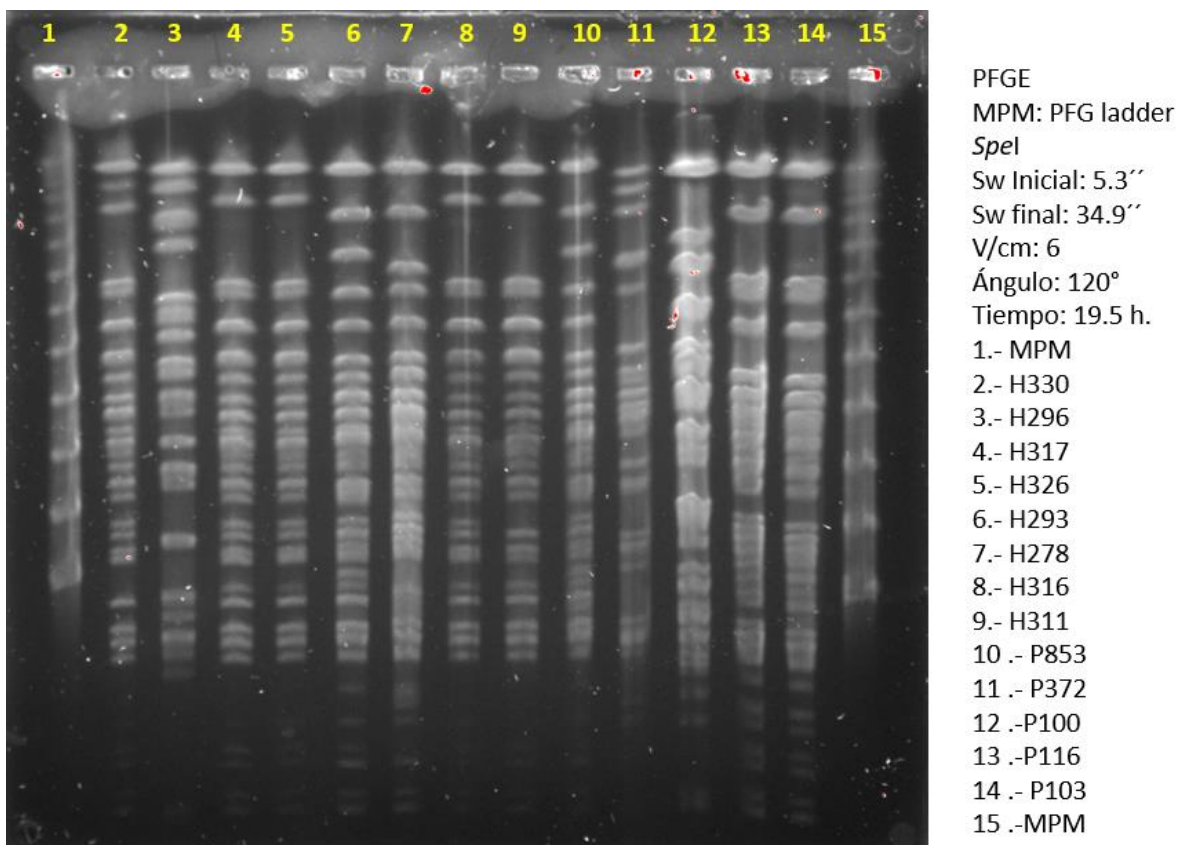


Imagen 34. Electroforesis en gel por campos pulsados de aislados clínicos de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes con quemaduras graves.

Nótese que en la imagen 34 las cepas 4, 5, 8 y 9 tienen el mismo patrón de restricción. Esta segunda selección se realizó con la finalidad de eliminar los sesgos de selección y la malinterpretación de los datos al momento de realizar las determinaciones correspondientes. Las 30 cepas clínicas seleccionadas corresponden a muestras clínicas con valor microbiológico, de las cuales, 8/30 fueron biopsias cuantitativas, 8/30 urocultivos, 6/30 hemocultivos, 5/30 muestras respiratorias bajas, 2 puntas de catéter intravascular y 1 biopsia cualitativa (gráfico 7).

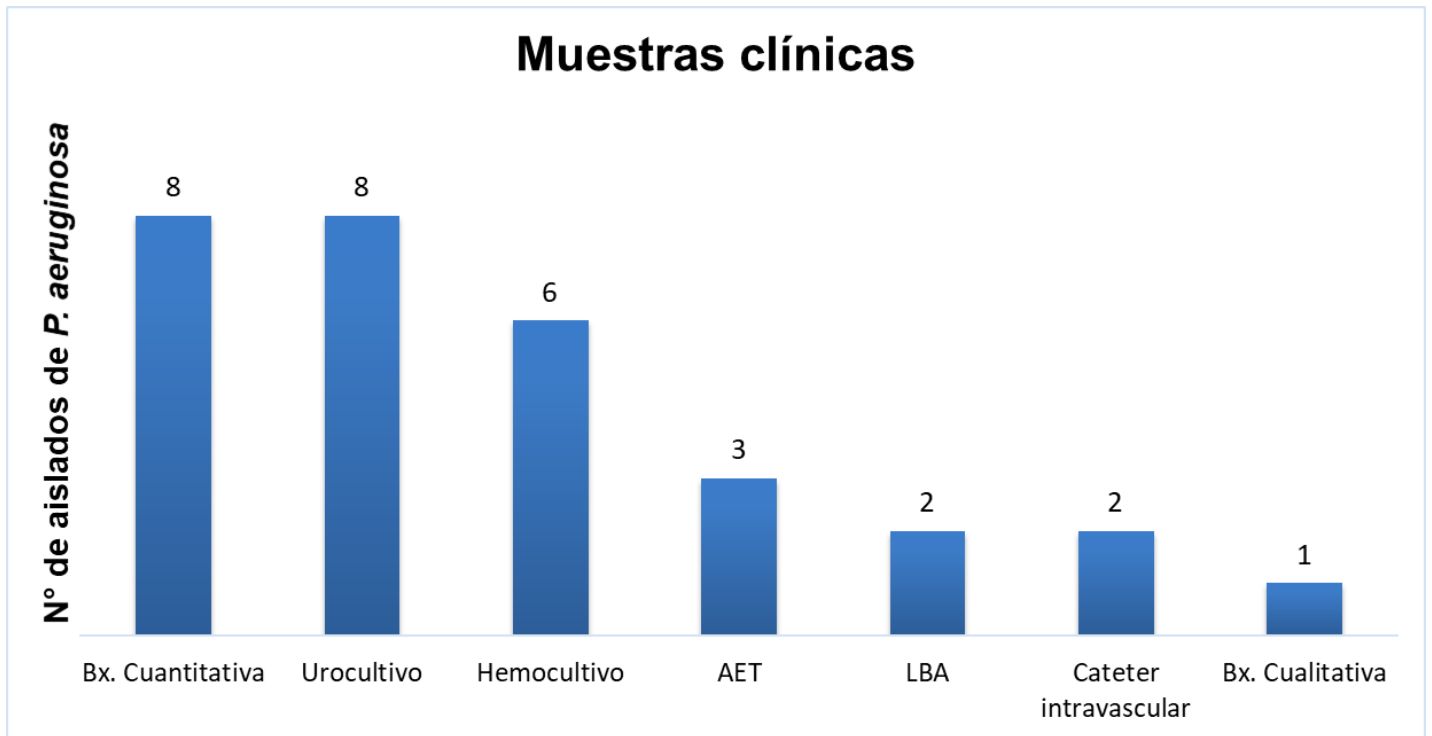


Gráfico 7. Distribución de los tipos de muestras clínicas de donde se recuperaron los aislados de *P. aeruginosa*. Bx: Biopsia, AET: Aspirado endotraqueal, LBA: Lavado bronquioalveolar.

La etiología de las quemaduras fue: fuego directo (66.7%), seguido de escaldaduras (23.3%) y quemaduras eléctricas (10%). La mediana en la estancia hospitalaria fue de 53 días (8-303 días). La media para la superficie corporal quemada fue del 40% (10-85%) con una tasa de mortalidad del 26.6%.



## 7.2 Concentraciones mínimas inhibitorias y patrones de susceptibilidad.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad y se incluyeron familias de antibióticos con actividad antipseudomónica. Se incluyeron aminoglicósidos, monobactámicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, carbapenémicos, lipopéptido cíclico y  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las cepas clínicas presentaron resistencia a la mayoría de los antibióticos incluidos y excepto para colistina, donde solo un aislado fue resistente. La tasa de resistencia de todos los aislados fue del 50% y la familia con la mayor tasa de resistencia se observó en los carbapenémicos. Lo cual resulta preocupante debido a que, hasta algunos años, estos antibióticos eran los que tenían mejores resultados en la susceptibilidad, por lo que colistina representa la última línea de defensa contra este microorganismo, sin embargo, cada vez se comienzan a ver más aislados resistentes a este antibiótico. En la tabla 12 se observan las concentraciones mínimas inhibitorias a los antibióticos probados.

Tabla 12. Concentraciones mínimas inhibitorias de los aislados clínicos incluidos en el estudio.

Cepa	Mta. clínica	Antibióticos																							
		AK	AK	GN	GN	AZT	AZT	CAZ	CAZ	FEP	FEP	CIP	CIP	LVX	LVX	DORY	DOR	IMP	IMP	MRP	MRP	CL	CL	TZP	TZP
P001	Bx. Cuant.	64	R	>32	R	>64	R	>32	R	>32	R	>4	R	>8	R	0.5	S	>32	R	>32	R	0.5	R	>128/4	R
P053	Catéter	64	R	32	R	64	R	32	R	32	R	8	R	8	R	32	R	>32	R	16	R	0.5	S	128/4	R
P074	Orina	64	R	1	S	8	S	32	R	32	R	8	R	8	R	32	R	>32	R	>32	R	0.5	S	>128/4	R
P097	Catéter	>64	R	32	R	32	R	32	R	>32	R	8	R	8	R	32	R	32	R	16	R	0.5	S	128/4	R
P116	Orina	32	R	>32	R	>64	R	>32	R	>32	R	>8	R	8	R	>32	R	16	R	32	R	2	S	128/4	R
P187	Orina	4	S	2	S	>64	R	>64	R	>64	R	>8	R	>32	R	>32	R	>64	R	>32	R	1	S	128/4	R
P231	Bx. Cuant	2	S	1	S	4	S	2	S	2	S	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.062	S	0.25	S	2	S	128/4	R
P274	LBA	64	R	16	R	>64	R	>64	R	>64	R	>8	R	>8	R	32	R	64	R	64	R	2	S	128/4	R
P305	Bx. Cuant	64	R	16	R	32	R	32	R	32	R	8	R	4	R	64	R	64	R	64	R	1	S	>128/4	R
P469	Bx. Cuant	16	S	2	S	32	R	32	R	32	R	2	R	1	S	1	S	1	S	0.5	S	1	S	16/4	S
P534	Bx. Cuant	64	R	16	R	32	R	64	R	64	R	8	R	8	R	16	R	16	R	16	R	2	S	128/4	R

P656	Orina	4	S	4	S	2	S	4	S	4	S	0.5	S	0.5	S	2	S	0.5	S	1	S	0.5	S	4./4	S
P665	AET	64	R	16	R	2	S	32	R	32	R	>16	R	16	R	>64	R	<64	R	>64	R	0.5	S	16./4	S
P678	Bx. Cual.	64	R	64	R	64	R	64	R	64	R	8	R	16	R	32	R	64	R	64	R	1	S	128/4	R
P697	LBA	2	S	1	S	4	S	4	S	8	S	2	R	0.5	S	1	S	1	S	1	S	1	S	4./4	S
P699	Orina	64	R	16	R	8	S	2	S	2	S	0.5	S	1	S	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	128/4	R
P729	Orina	2	S	1	S	2	S	4	S	8	S	2	R	0.5	S	1	S	1	S	2	S	1	S	4./4	S
P775	AET	64	R	16	R	4	S	4	S	32	R	8	R	4	R	32	R	16	R	16	R	1	S	128/4	R
P787	Orina	64	R	64	R	32	R	4	S	64	R	2	R	4	R	64	R	16	R	64	R	1	S	128/4	R
P788	Hemo	64	R	64	R	64	R	32	R	64	R	8	R	64	R	64	R	64	R	64	R	1	S	128/4	R
P809	Orina	8	S	4	S	64	R	64	R	64	R	8	R	16	R	64	R	64	R	64	R	2	S	128/4	R
P853	Bx. Cuant	64	R	16	R	4	S	32	R	32	R	4	R	64	R	8	R	8	R	8	R	1	S	16./4	S
P902	Bx. Cuant	8	S	1	S	2	S	4	S	8	S	0.5	S	0.5	S	8	R	1	S	0.5	S	1	S	4./4	S
P914	AET	2	S	1	S	1	S	4	S	4	S	0.5	S	0.5	S	64	R	16	R	16	R	1	S	8./4	S
P920	Bx. Cuant	64	R	64	R	1	S	32	R	32	R	2	R	4	R	32	R	32	R	64	R	0.5	S	128/4	R
H015	Hemo	64	R	32	R	32	R	64	R	>64	R	8	R	>8	R	32	R	32	R	32	R	1	S	128/4	R
H039	Hemo	>64	R	>32	R	32	R	32	R	0.5	S	32	R	>8	R	8	R	32	R	1	S	8	R	128/4	R
H277	Hemo	2	S	1	S	2	S	4	S	2	S	0.25	S	0.5	S	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	8./4	S
H293	Hemo	16	S	16	R	32	R	>64	R	64	R	8	R	8	R	8	R	2	S	2	S	1	S	128/4	R
H311	Hemo	8	S	32	R	0.5	S	4	S	4	S	2	R	0.5	S	8	R	8	R	8	R	0.25	S	4./4	S

Mta: muestra, Bx: biopsia, cuant: cuantitativa, cual: cualitativa, catéter: punta de catéter intravascular, orina: urocultivo, AET: aspirado endotraqueal, LBA: lavado bronquioalveolar, Hemo: hemocultivo.

Antibióticos: Ak, amikacina, Gn: gentamicina, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacino, LVX: levofloxacino, DORY: doripenem, IMP: imipenem, MRP: meropenem, CL: colistina, TZP: piperacilina/tazobactam.

Las columnas con valores numéricos corresponden a unidades expresadas en µg/mL.

S: susceptible, R: resistente.

En el gráfico 8 se esquematizan los patrones de susceptibilidad de los antibióticos incluidos.

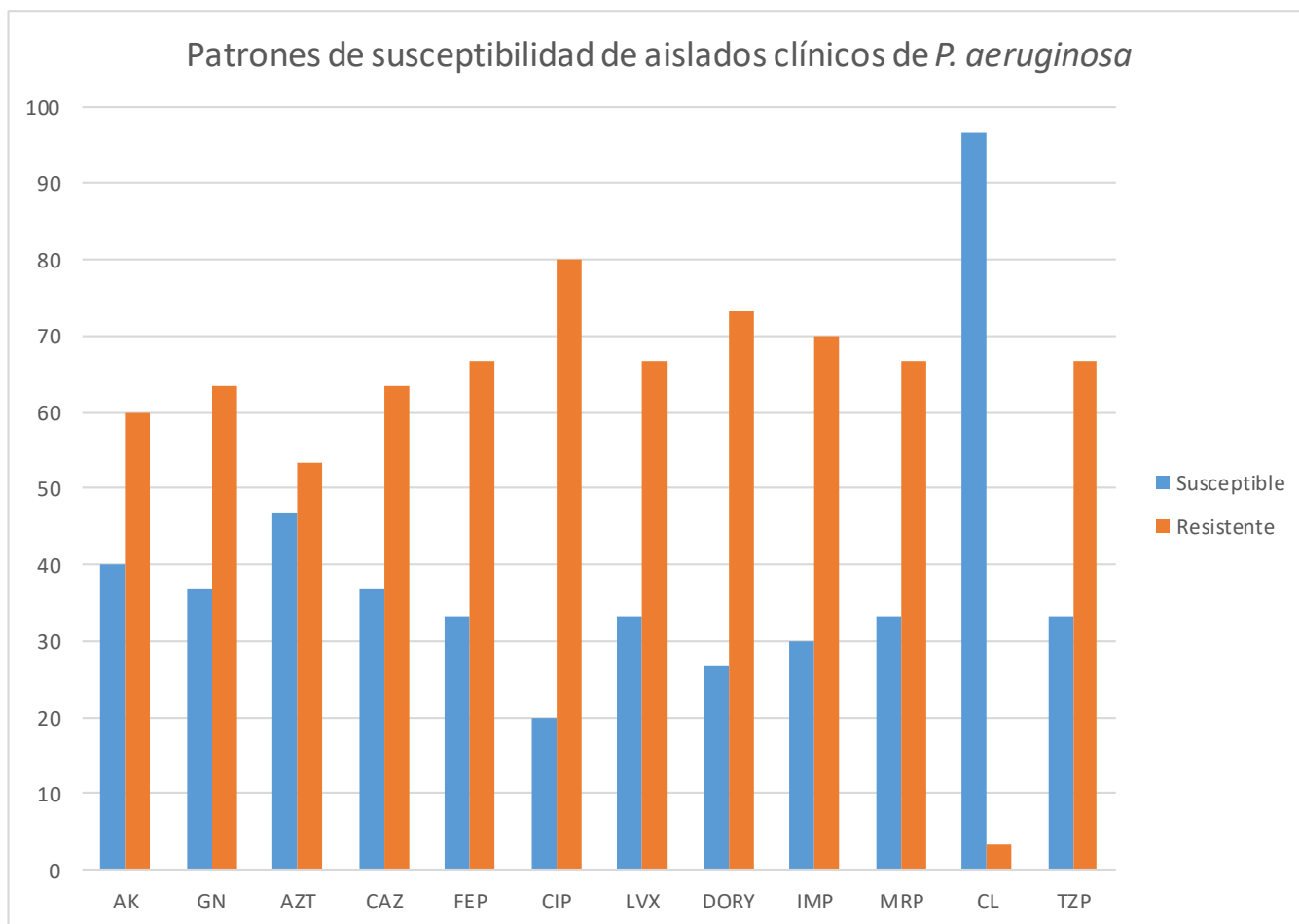


Gráfico 8. Patrones de susceptibilidad de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* incluidos en este estudio. AK: amikacina, GN: gentamicina, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, CIP: ciprofloxacino, LVX: levofloxacino, DORY: doripenem, IMP: imipenem, MRP: meropenem, CL: colistina, TZP: piperacilina/tazobactam.

Exceptuando colistina, se encontraron > 50% de los aislados clínicos resistentes a las diversas familias de antibióticos probadas. Se encontró la mayor tasa de resistencia a ciprofloxacino, una fluoroquinolona, con el 80% de resistencia. Solo una cepa presentó resistencia a colistina, lo cual resulta llamativo dado que es considerado un antibiótico de rescate.

### 7.3 Amplificación de los genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* y *rhlR*.

Con la finalidad de ver que todos los aislados incluidos en el presente trabajo contaban con la presencia de los elementos que codifican para los sistemas de comunicación bacteriana, diseñamos oligonucleótidos que flanquearan los genes blancos (imagen 35).

The image displays four windows from a PCR design software, labeled A, B, C, and D, each showing the design and analysis of primers for a specific gene. Each window includes a DNA sequence diagram, a table of primer and product characteristics, and a concentration settings panel.

**Window A: NewSequence1 - PCR**

Optimal Annealing Temperature: 56.6° (Max: 65.4°)

	Position and Length	Tm [°C]	GC [%]	P.E. #
Product	531	89.8	57.1	.....
Upper Primer	22   18	63.6	44.4	427/427
Lower Primer	535   18	62.4	50.0	365/366

Product Tm - Lower Primer Tm: 27.5  
Primers Tm difference: 1.2

Concentration: Upper Primer: 200.0 nM, Lower Primer: 200.0 nM, Monovalent Cation: 50.0 mM, Free Mg [2+]: 0.7 mM

Total Na[+] Equivalent: 155.8

**Window B: NewSequence2 - PCR**

Optimal Annealing Temperature: 59.2° (Max: 70.8°)

	Position and Length	Tm [°C]	GC [%]	P.E. #
Product	706	91.2	59.9	.....
Upper Primer	1   18	69.9	55.6	439/439
Lower Primer	689   18	67.8	50.0	489/489

Product Tm - Lower Primer Tm: 23.4  
Primers Tm difference: 2.1

Concentration: Upper Primer: 200.0 nM, Lower Primer: 200.0 nM, Monovalent Cation: 50.0 mM, Free Mg [2+]: 0.7 mM

Total Na[+] Equivalent: 155.8

**Window C: NewSequence3 - PCR**

Optimal Annealing Temperature: 59.9° (Max: 67.7°)

	Position and Length	Tm [°C]	GC [%]	P.E. #
Product	590	93.5	65.9	.....
Upper Primer	10   18	64.7	50.0	391/391
Lower Primer	582   18	72.4	66.7	455/455

Product Tm - Upper Primer Tm: 28.9  
Primers Tm difference: 7.7

Concentration: Upper Primer: 200.0 nM, Lower Primer: 200.0 nM, Monovalent Cation: 50.0 mM, Free Mg [2+]: 0.7 mM

Total Na[+] Equivalent: 155.8

**Window D: NewSequence4 - PCR**

Optimal Annealing Temperature: 59.3° (Max: 69.8°)

	Position and Length	Tm [°C]	GC [%]	P.E. #
Product	675	91.8	61.5	.....
Upper Primer	1   18	67.1	55.6	410/410
Lower Primer	658   18	66.8	55.6	421/421

Product Tm - Lower Primer Tm: 25.1  
Primers Tm difference: 0.3

Concentration: Upper Primer: 200.0 nM, Lower Primer: 200.0 nM, Monovalent Cation: 50.0 mM, Free Mg [2+]: 0.7 mM

Total Na[+] Equivalent: 155.8

Imagen 35. Diseño de oligonucleótidos y análisis *in silico* donde se observa la porción del gen estructural que flanquea. A) *lasI*, B) *lasR*, C) *rhlI* y D) *rhlR*.

Todas las cepas clínicas probadas tuvieron presentes los genes asociados a la comunicación bacteriana, tanto del sistema Las (*lasI/lasR*) como del sistema Rhl

(*rhII/rhIR*). En la imagen 36 se pueden observar algunos ejemplos de la amplificación de los genes.

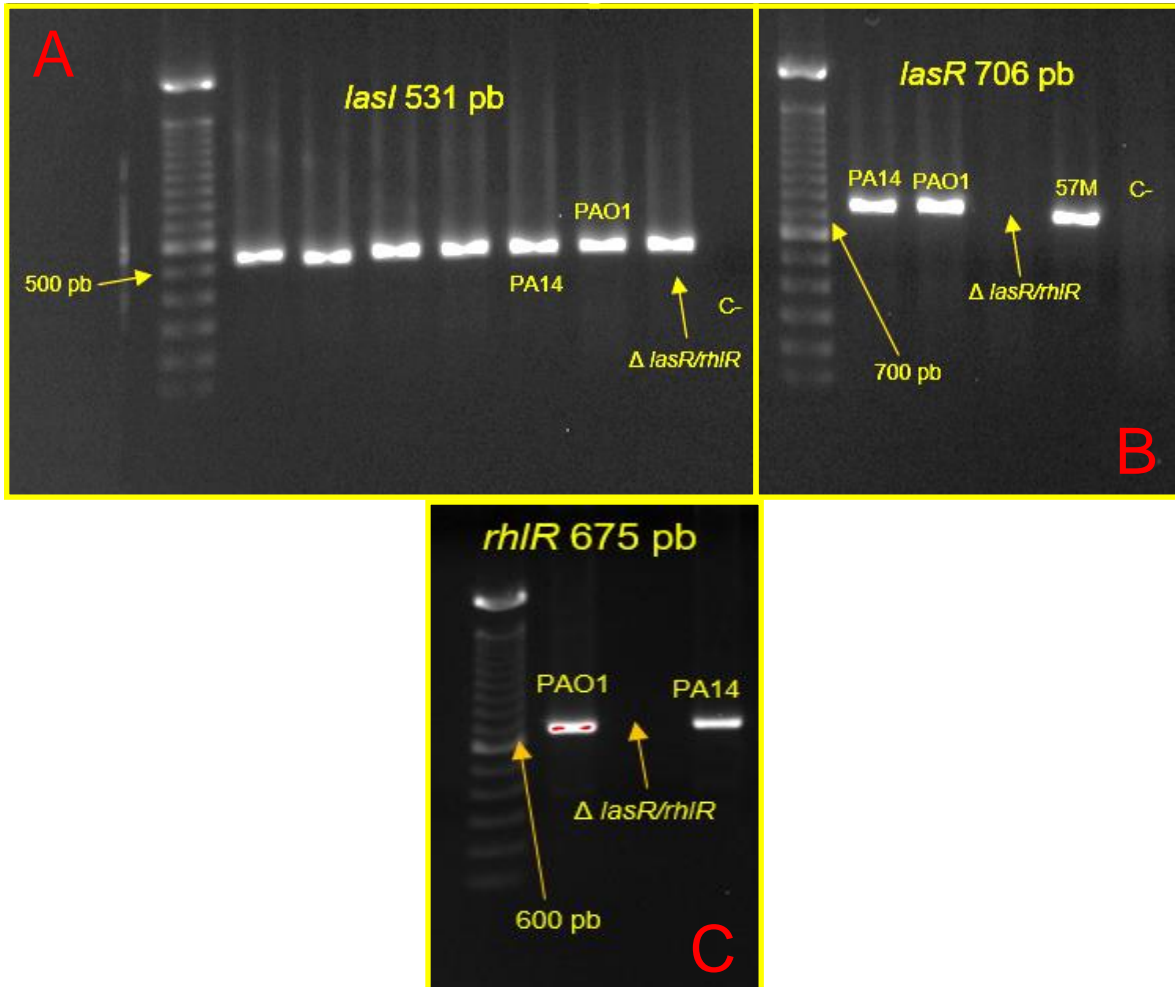


Imagen 36. Amplificación de genes blancos. A) *lasI*. Se observa la amplificación de algunos aislados clínicos. Las cepas tipo *P. aeruginosa* PAO1 y PA14, al tener completos el sistema de percepción de quórum se utilizaron como controles positivos. B) *lasR* se usa como control negativo la doble mutante  $\Delta$  *lasR/rhIR* *P. aeruginosa* PAO1. Al tener mutación en los reguladores transcripcionales se utiliza como control negativo y como validación del diseño de los oligonucleótidos (B y C).

#### 7.4 Amplificación del gen *aiiM*.

Dado que recibimos la cepa transformada del grupo de trabajo del Dr. Maeda del instituto de Tecnología de Kyushu era importante determinar que la cepa de trabajo contaba con el gen que sobreexpresaba la proteína de interés, para ellos se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan todo el gen estructura (imagen 37) y posteriormente visualizar la banda correspondiente.

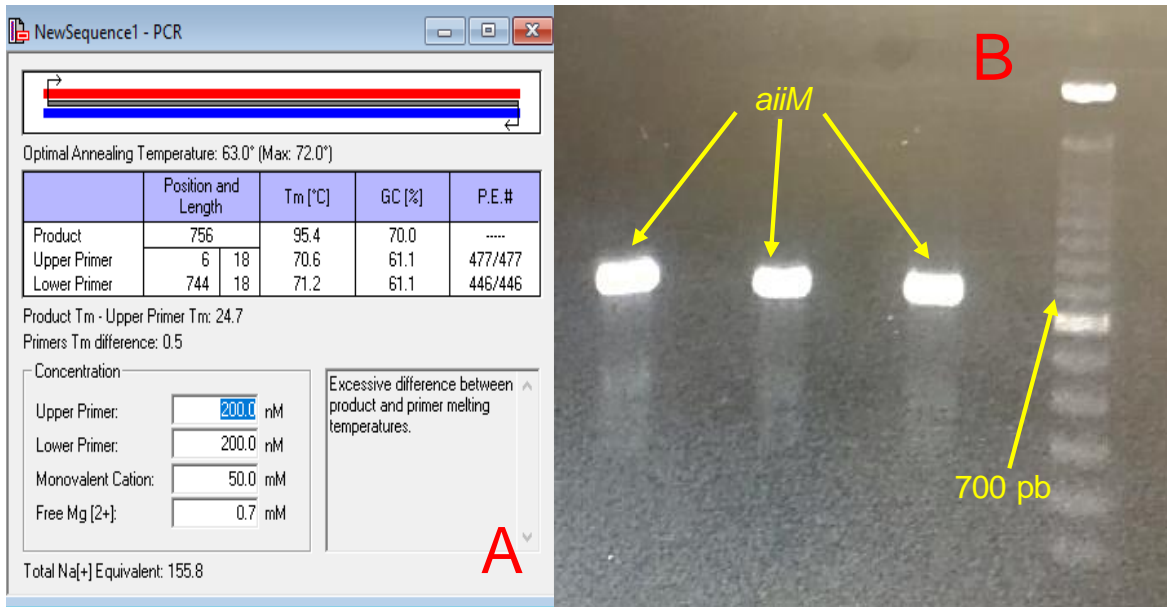


Imagen 37. A) Zona de reconocimiento de los oligonucleótidos diseñados, longitud del amplicón y condiciones teóricas de la reacción. B) Amplificación del gen *aiiM* a partir de extracción de ADN de la cepa transformada donada por el grupo de trabajo del Dr. Maeda.

La secuenciación del producto de amplificación coincide con el gen que codifica para la proteína lactonasa AiiM (*aiiM*) (imagen 38).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy		
<b>Sequences producing significant alignments</b>						
Download Manage Columns Show 100						
select all 12 sequences selected						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Synthetic construct N-acyl-L-homoserine lactone quorum quenching lactonase AiiM ( <i>aiiM</i> )_gene_complete_cds	1397	1397	100%	0.0	100.00%	KU922758.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum</i> S1L_B037_DNA_complete_genome	1397	1397	100%	0.0	100.00%	AP012052.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum aiiM</i> genes for acylhomoserine lactonase_hypothetical proteins_carlial and complete_cds	1397	1397	100%	0.0	100.00%	AB513359.2
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum</i> genes for glyoxalase/bleomycin resistance protein_N-acylhomoserine lactonase_putative transport integra	1098	1098	100%	0.0	92.86%	AB668544.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum</i> genes for glyoxalase/bleomycin resistance protein_N-acylhomoserine lactonase_tetratricopeptide repeat	937	937	100%	0.0	89.02%	AB668540.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum</i> genes for glyoxalase/bleomycin resistance protein_N-acylhomoserine lactonase_tetratricopeptide repeat	931	931	100%	0.0	88.89%	AB668541.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum</i> genes for signal transduction histidine kinase_glyoxalase/bleomycin resistance protein_N-acylhomoserine	926	926	100%	0.0	88.76%	AB668543.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium</i> sp. S1L_B018 genes for glyoxalase/bleomycin resistance protein_N-acylhomoserine lactonase_hypothetical proteins_p	917	917	98%	0.0	88.77%	AB668539.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium</i> sp. S1L_B016 genes for hypothetical protein_N-acylhomoserine lactonase_glyoxalase/bleomycin resistance protein_co	573	573	98%	5e-159	80.59%	AB668538.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium testaceum</i> genes for UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase_ribosomal-protein-alanine acetyltransferase_puta	488	488	98%	2e-133	78.62%	AB668542.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Microbacterium</i> sp. S1L_B014 genes for putative membrane protein_N-acylhomoserine lactonase_glyoxalase/bleomycin resistance pro	488	488	100%	2e-133	78.39%	AB668537.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Mycobacterium</i> phage Sheen_complete_genome	56.5	56.5	5%	0.002	89.13%	NC_028914.1

Imagen 38. Resultado de la secuenciación del producto de amplificación del gen *aiiM*.

## 7.5 Expresión y purificación de la lactonasa AiiM.

Realizamos diversas pruebas para la optimización de la sobreexpresión de la proteína AiiM. En la imagen 39 (A) se observan un gel de SDS-PAGE con algunas condiciones de sobreexpresión y purificación.

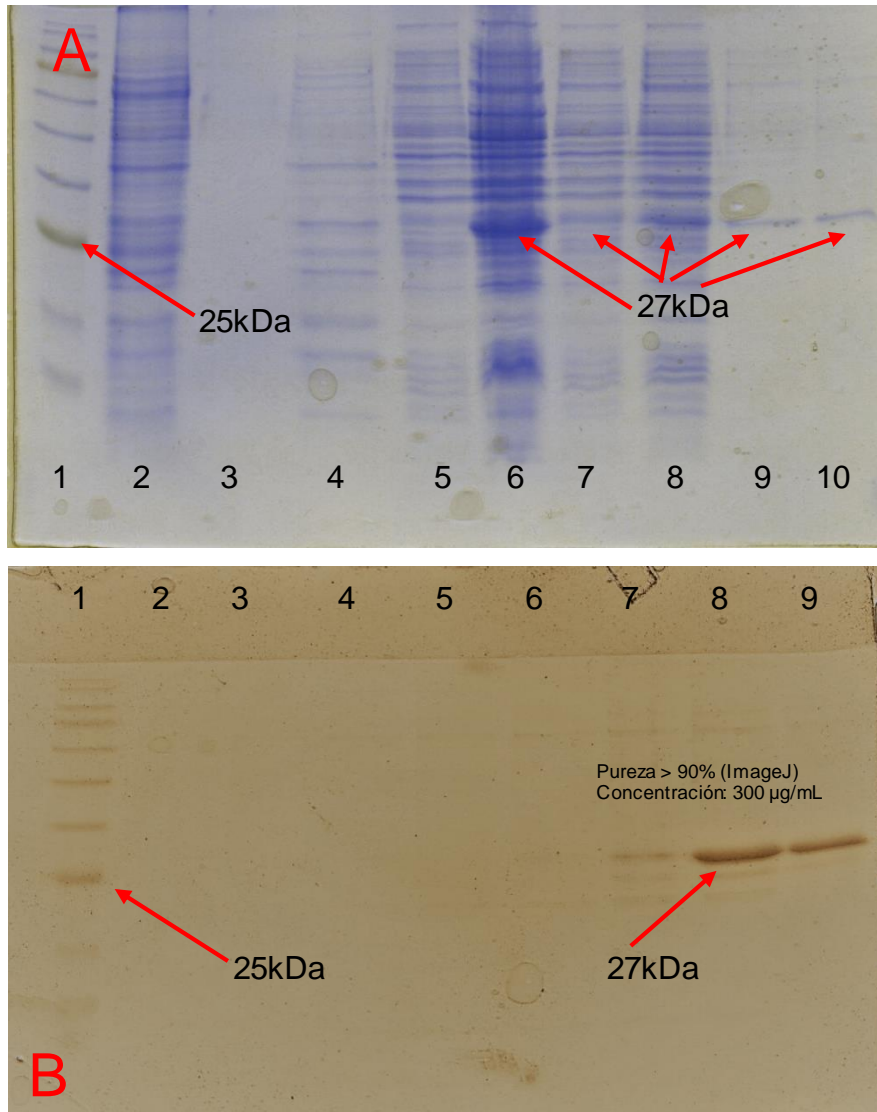


Imagen 39. Geles de SDS-PAGE. Figura A: 1) Marcador de peso molecular, 3) sobrenadante posterior a la inducción e incubación, 5) lisado celular antes de la inducción con IPTG 500 µM, 6) lisado celular previo a la inducción con IPTG 500 µM previo al pase por la columna, 9 y 10) Fracciones posterior a la elución con imidazol 150 mM. Figura B: 7, 8 y 9) se observan fracciones purificadas de AiiM con pureza > 90% utilizando el software ImageJ.

Se obtuvo una pureza superior al 90% de AiiM, posterior a la purificación, las fracciones obtenidas fueron dializadas y almacenadas a -20°C para los experimentos posteriores. El peso de la banda de interés, la que representa la proteína, es de 27 kDa y el peso hipotético es de 27.2 kDa (imagen 39 B).

7.6 AiiM tiene actividad contra diferentes moléculas N-acil homoserin lactonas.

El siguiente paso de la purificación era observar si la enzima tenía la capacidad de hidrolizar las moléculas aciladas y si la hidrólisis podía verse alterada por alguna sustitución de la molécula en el C3 de la cola acilada. Para poder hacer esto, primero determinamos los tiempos de retención de cada molécula sola mediante HPLC, probamos 5 de ellas, abarcando de cadena corta como de cadena larga (C4-HSL, 3OC8-HSL, C10-HSL, 3OC10-HSL y 3OC12-HSL). Nótese que se probaron con y sin sustituciones en el C3 del acilo. En la gráfica 9 se observa el tiempo de retención para la molécula C10-HSL, de tal forma que mediante HPLC pudimos establecer este experimento.

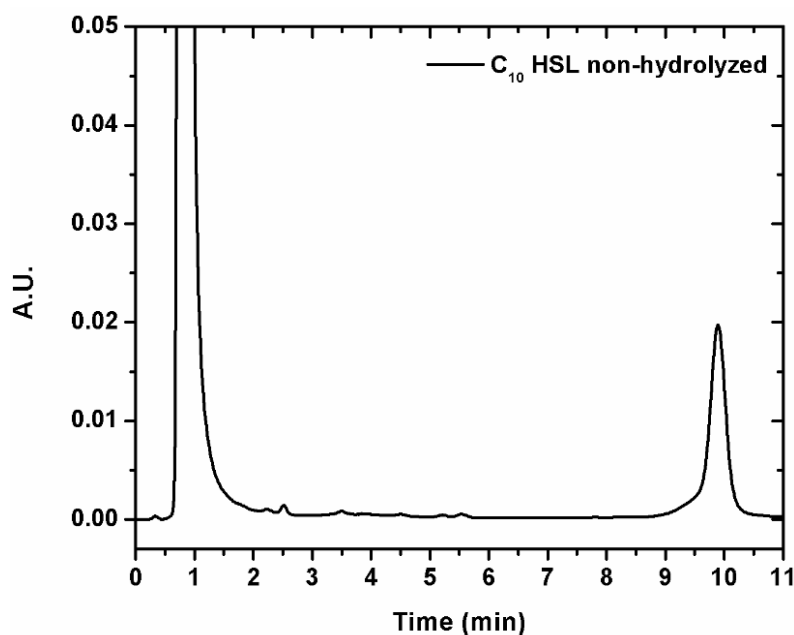


Gráfico 9. Identificación de moléculas acil homoserin lactonas mediante HPLC. Molécula C10-HSL 1 mM.

De la misma manera, tratamos las moléculas acil homoserin lactonas con NaOH, el cual induce un ataque nucleofílico al anillo de lactona provocando su hidrólisis, esto como control químico de reacción para observar, mediante HPLC cambio en los tiempos de retención. En la gráfica 10 se observa el cambio del tiempo de retención en comparación con el gráfico 9.



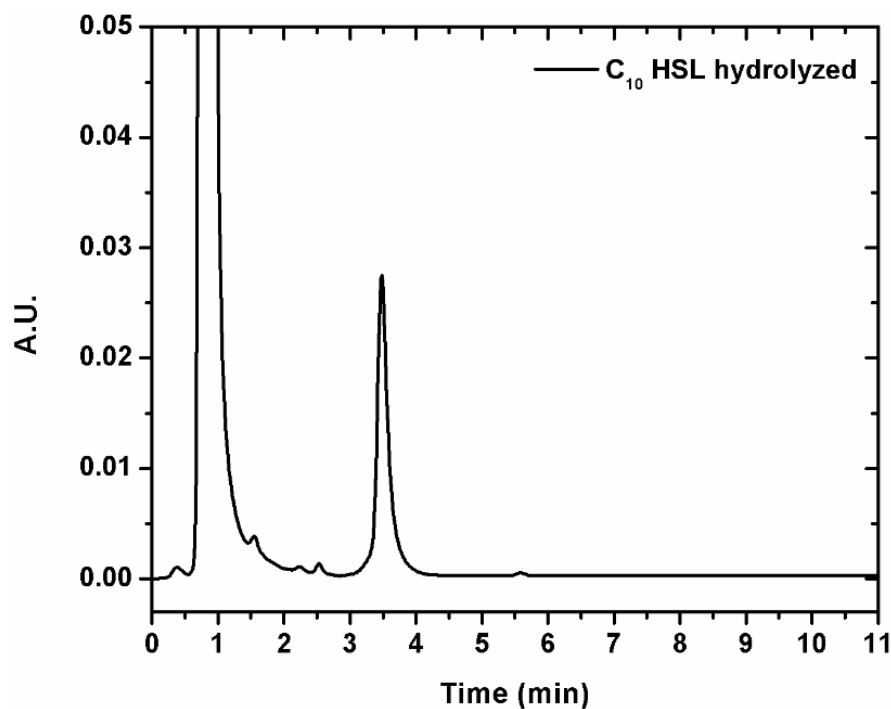


Gráfico 10. Hidrólisis química con NaOH para determinar el cambio en los tiempos de retención en las moléculas de acil homoserin lactonas.

Todas las moléculas fueron tratadas con NaOH para determinar la hidrólisis química y ver los cambios en los tiempos de retención.

Una vez que logramos identificar, tanto las moléculas acil homoserin lactonas íntegras como hidrolizadas mediante HPLC, lo siguiente que hicimos fue tratar esas moléculas con AiiM a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos. Como se mencionó previamente, probamos diferentes concentraciones (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), asimismo, diferentes tiempos de incubación de las moléculas aciladas con AiiM fueron probados (24 h, 2 h, 1 h, 30 min, 10 min y 5 min) encontrando que la enzima era capaz de hidrolizar 1 mM de todas las acil homoserin lactonas probadas a los diferentes tiempos y concentraciones probadas por lo que consideramos utilizar la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los experimentos subsecuentes (cinética de crecimiento y factores de virulencia).

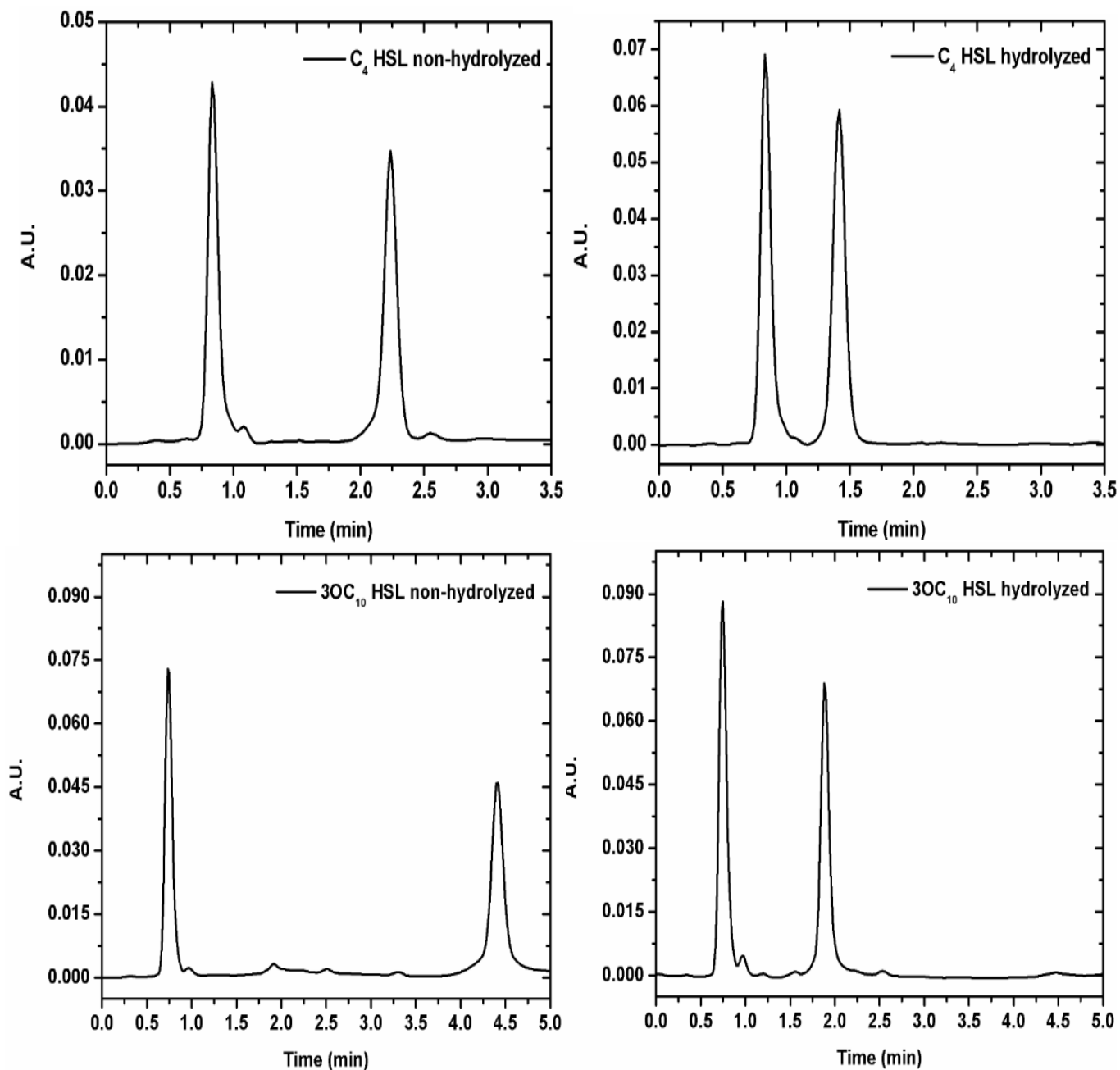


Gráfico 11.1. Identificación de moléculas acil homoserin lactonas con y sin tratamiento (AiiM 5 µg/mL) y 5 minutos de exposición. En las gráficas de arriba se observa C<sub>4</sub>-HSL íntegra (izquierda) e hidrolizada mediante la acción de AiiM (derecha), en las gráficas de abajo se observa 3OC<sub>10</sub>-HSL con las mismas características. A la izquierda la molécula íntegra y a la derecha la molécula hidrolizada mediante la acción de AiiM.

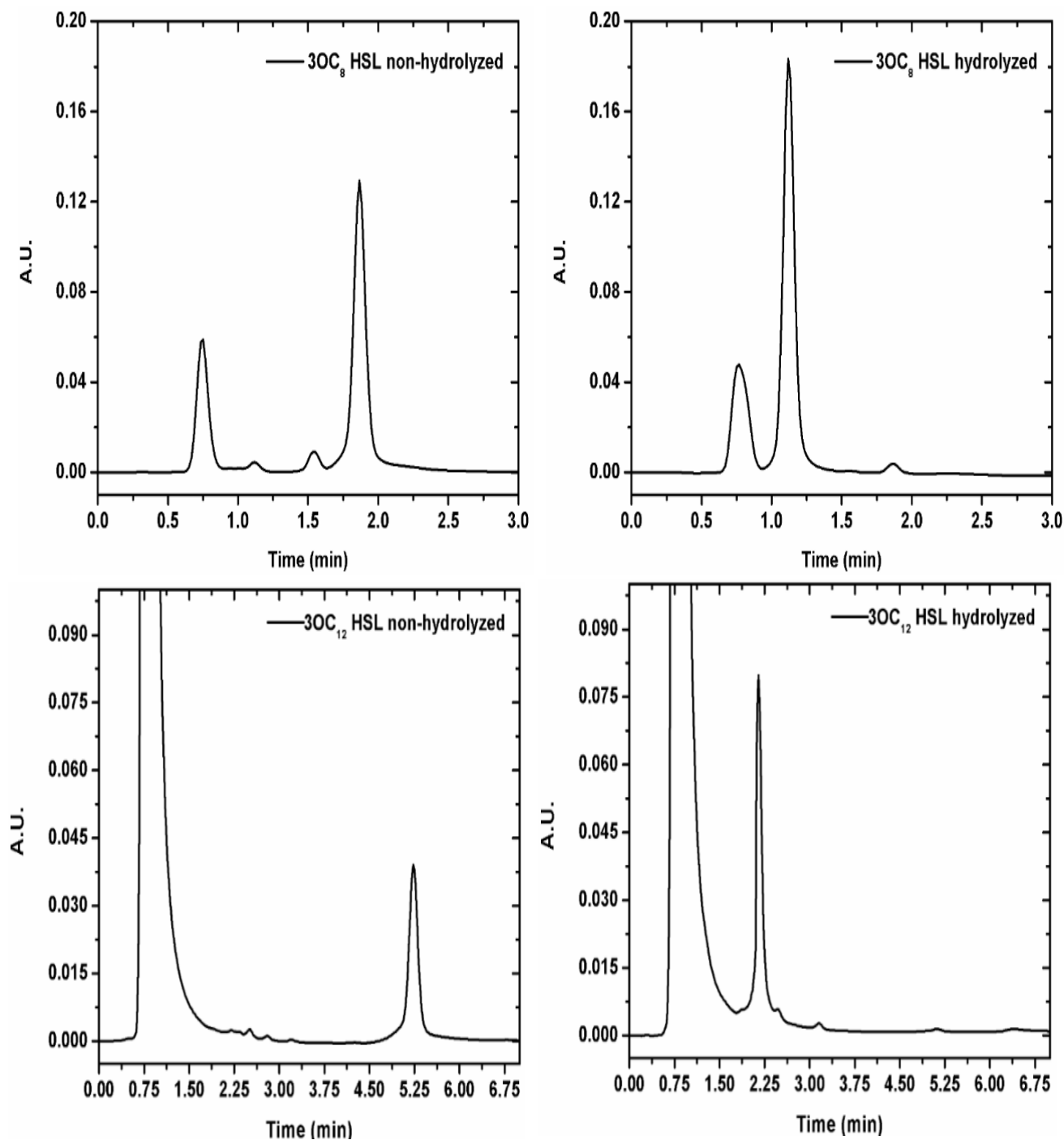


Gráfico 11.2. Identificación de moléculas acil homoserin lactonas con y sin tratamiento (AiiM 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 5 minutos de exposición. En las gráficas de arriba se observa 3OC<sub>8</sub>-HSL integra (izquierda) e hidrolizada mediante la acción de AiiM (derecha), en las gráficas de abajo se observa 3OC<sub>12</sub>-HSL con las mismas características. A la izquierda la molécula íntegra y a la derecha la molécula hidrolizada mediante la acción de AiiM.

Con esto se pone de manifiesto que AiiM es capaz de hidrolizar las acil homoserin lactonas con y sin sustituciones en el C3 de la porción acilada, también, que no importa la longitud de la cadena ya que se observó actividad hidrolítica en moléculas de cadena corta y cadena larga, de igual manera, se evidenció la hidrólisis de las moléculas producidas por *P. aeruginosa* las cuales están involucradas en el control génico mediado por el sistema de percepción de quórum (C4-HSL y 3OC12-HSL). En la tabla 13 se observan los tiempos de retención de las moléculas probadas.

Molécula HSL	Tiempo de retención (min)		Proporción de acetonitrilo/buffer de fosfatos en la fase móvil
	<i>no hidrolizada</i>	<i>hidrolizada</i>	
<b>C4-HSL</b>	2.29	1.42	10:90
<b>C10-HSL</b>	9.9	3.48	40:60
<b>3OC8-HSL</b>	1.86	1.11	40:60
<b>3OC10-HSL</b>	4.48	1.89	40:60
<b>3OC12-HSL</b>	5.3	2.24	50:50

Tabla 13. Tiempos de retención de las moléculas aciladas tratadas y sin tratar con AiiM.

### 7.7 Papel de AiiM en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*.

Una vez que determinamos que AiiM era capaz de hidrolizar las moléculas HSL, el siguiente paso era determinar la influencia que tenía esta proteína en la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, partiendo de que una de las primicias de esta estrategia es que al no afectar la cinética de crecimiento no induce una presión de selección que obligue a los microorganismos a seleccionar mecanismos de resistencia ante tal adversidad, para ello realizamos cinéticas de crecimiento con la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1 y la cepa  $\Delta lasR/rhIR$  PAO1. Ambas cepas fueron sometidas al tratamiento con AiiM 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Observamos que el comportamiento en la cinética de crecimiento en la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1, con y sin tratamiento (AiiM 5  $\mu\text{g/mL}$ ) era bastante similar (gráfico 12). De tal manera que la proteína no interfería con la cinética de crecimiento normal de *P. aeruginosa*. Por otro lado, pusimos como control una cepa tipo que carece de los reguladores transcripcionales del sistema de comunicación bacteriana, tanto

para el sistema Las (*lasR*) como para el sistema Rhl (*rhIR*), de esta forma validamos el control negativo con una cepa que no tiene estos elementos.

En ambos casos, la cinética de crecimiento tanto de la cepa que tiene todos los elementos de la comunicación bacteriana como la doble mutante crecieron de forma semejante, sin verse afectadas o favorecidas por la proteína.

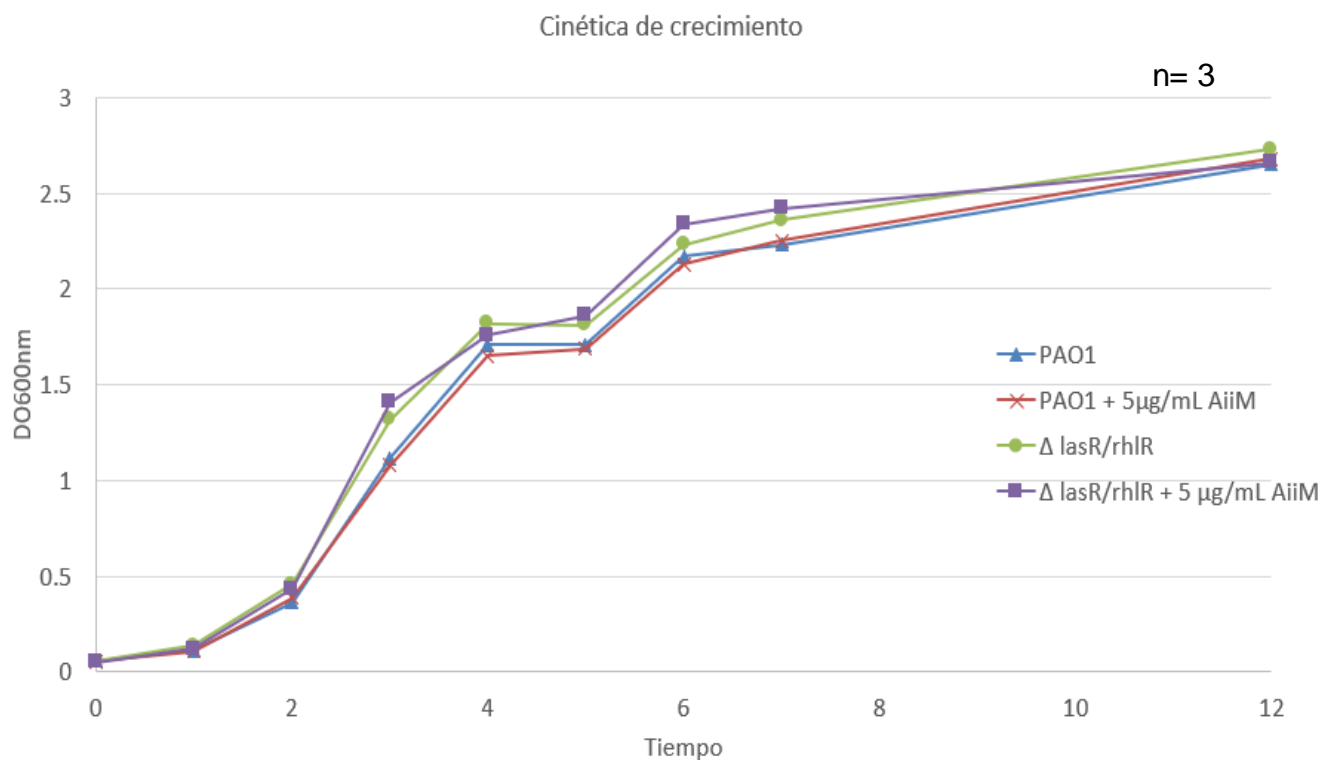


Gráfico 12. Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 y  $\Delta$  *lasR/rhIR* con y sin AiiM 5 µg/mL.

### 7.8 Inhibición de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* controlados por el sistema de comunicación bacteria.

Una vez que determinamos que la proteína en estudio era capaz de hidrolizar las moléculas HSL, por un lado, y por otro lado determinar que esta proteína no interfería con la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, nuestro siguiente paso era determinar los factores de virulencia de las cepas clínicas y el papel que tenía la proteína AiiM en la inhibición de los mismos.

### 7.8.1 Actividad de elastasa

Determinamos la capacidad elastolítica de las cepas clínicas y observamos que este factor de virulencia que es controlado por el sistema de percepción de quórum se veía drásticamente disminuido cuando las cepas eran tratadas con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AiiM. Estos ensayos se realizaron por triplicado y fueron estadísticamente significativos (gráfico 13).

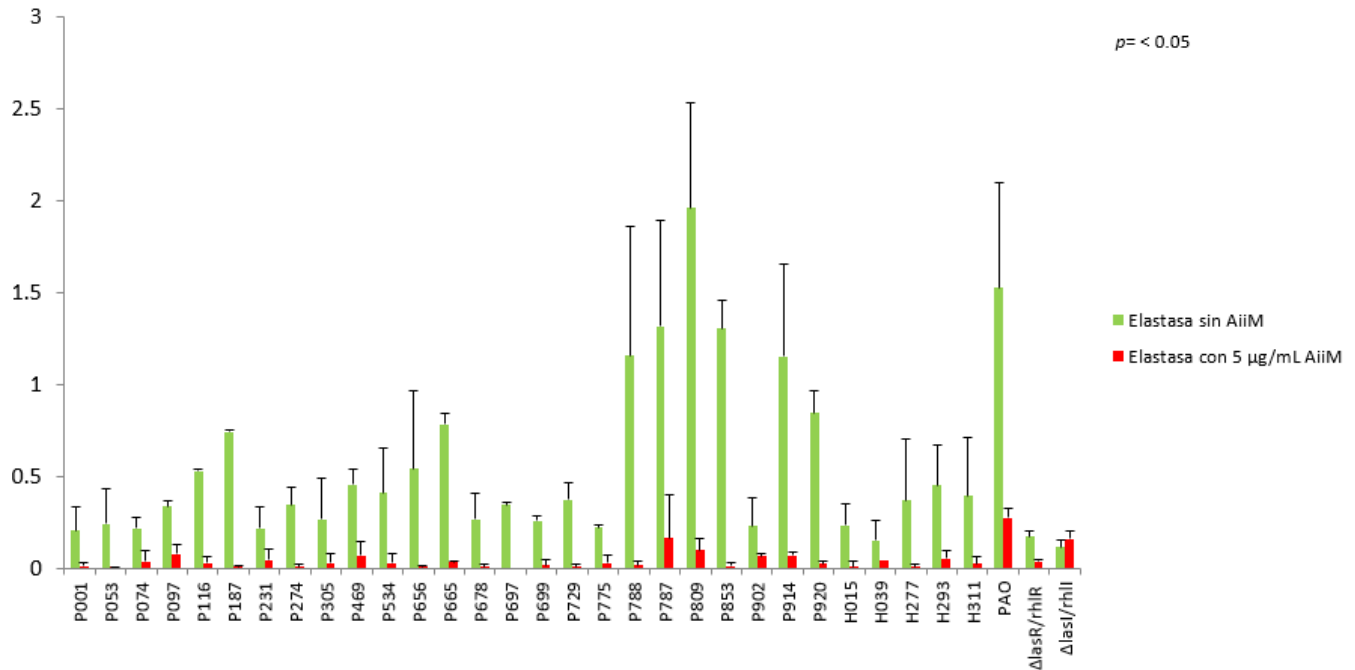


Gráfico 13. Aislados clínicos productores de elastasa y su posterior cuantificación con la adición de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AiiM.

### 7.8.2 Actividad de proteasa alcalina.

De la misma forma que determinamos la actividad elastolítica, el siguiente factor de virulencia era la proteasa alcalina, un factor que también se encuentra controlado por el sistema de comunicación bacteriana. De igual forma, encontramos una disminución estadísticamente significativa en las cepas clínicas que producían este factor de virulencia una vez que la proteína AiiM era adicionada a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  al medio de cultivo (gráfico 14).

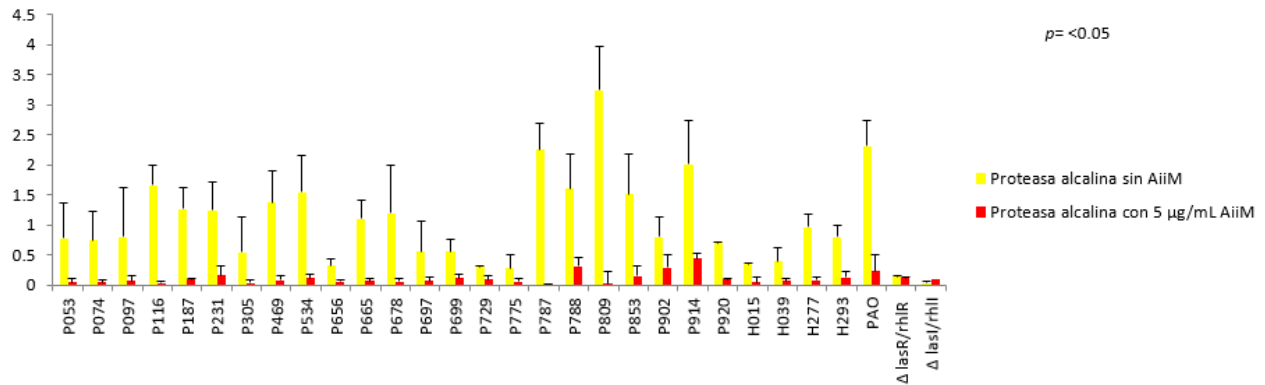


Gráfico 14. Aislados clínicos productores de proteasa alcalina. Cuantificación y sin tratamiento con AiiM 5 µg/mL.

Para el caso de proteasa alcalina, 27/30 produjeron este factor de virulencia en comparación de elastasa (30/30).

### 7.8.3 Píocianina.

Para el caso de píocianina, 12/30 produjeron este factor de virulencia a niveles cuantificables. Observamos el mismo comportamiento al momento de analizar las cepas clínicas que fueron tratadas con AiiM 5 µg/mL. Se observó una disminución con relevancia estadística en comparación con las cepas clínicas que no fueron tratadas con esta proteína (Gráfico 15).

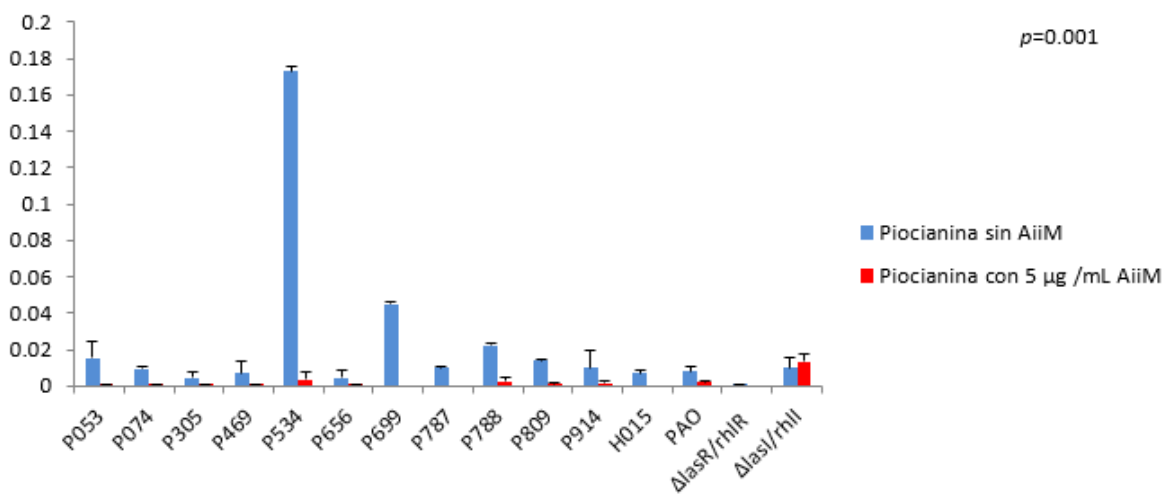


Gráfico 15. Determinación de píocianina en aislados clínicos de *P. aeruginosa* con y sin tratamiento de AiiM.

#### 7.8.4 HCN.

Detectamos HCN en 7/30 aislados clínicos con niveles elevados, los cuales fueron seleccionados para tratarlos con la proteína AiiM y observar el comportamiento en la producción de este factor de virulencia que es controlado por la comunicación bacteriana. No observamos cambios en el comportamiento de la enzima en comparación con los factores de virulencia previamente mencionados. De tal manera que la enzima era capaz de abatir la producción de los factores de virulencia probados y los cuales se encuentran bajo el control del sistema de percepción de quórum. De igual forma, aunque no fue cuantificado ni mencionado, quedó como experiencia observacional que la producción de pioverdina, uno de los pigmentos de *P. aeruginosa* y el cual se encuentra también bajo el control del sistema de percepción de quórum y es un elemento importante en el metabolismo de esta bacteria debido a que es su sideróforo principal, desaparecía en las cepas que eran tratadas con la proteína AiiM (dato no mostrado ni documentado).

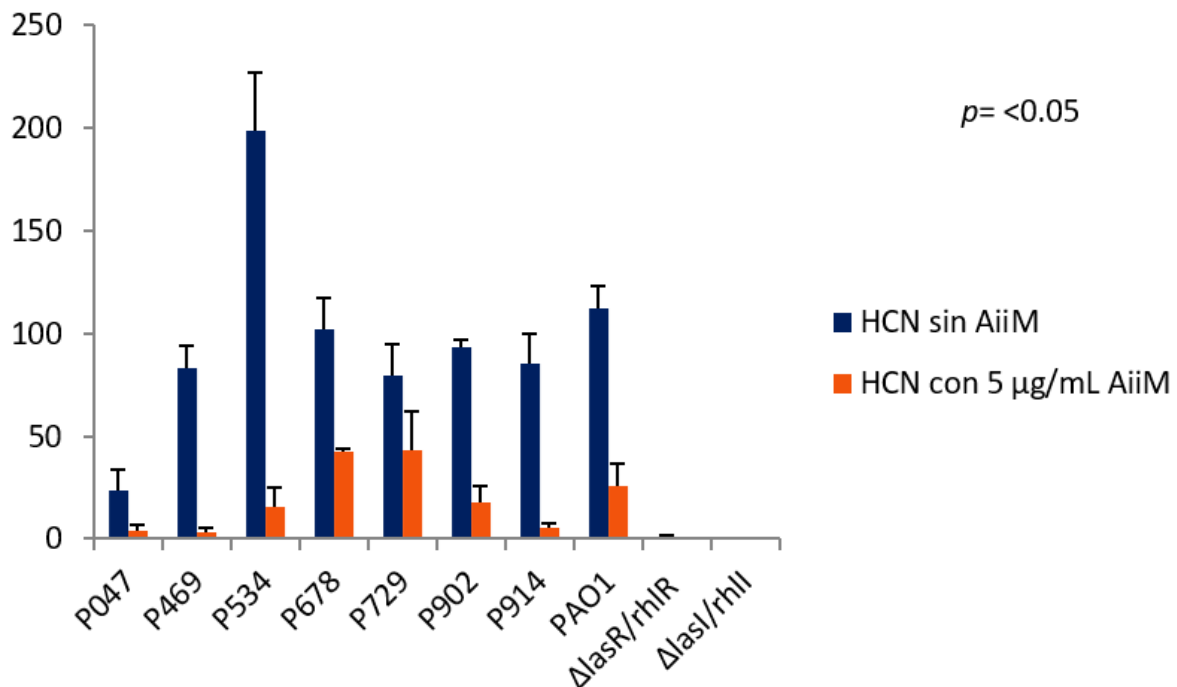


Gráfico 16. Determinación de HCN con y sin tratamiento con AiiM 5  $\mu$ g/mL.



Con estos hallazgos evidenciamos la actividad hidrolítica que tiene AiiM sobre los autoinductores de *P. aeruginosa* los cuales son necesarios para desencadenar la respuesta génica en la producción de factores de virulencia que necesita la célula bacteriana para asegurar su permanencia y existencia en determinados nichos ecológicos, como en caso del humano, donde puede llegar a ocasionar procesos infecciosos. Una vez determinado este papel fundamental de la proteína, nuestro siguiente paso fue evaluar la dosis respuesta de la proteína AiiM (0.5, 1, 2.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para ello seleccionamos la cepa P809, que como se puede ver en las gráficas 13 y 15, produce tanto elastasa como piocianina.

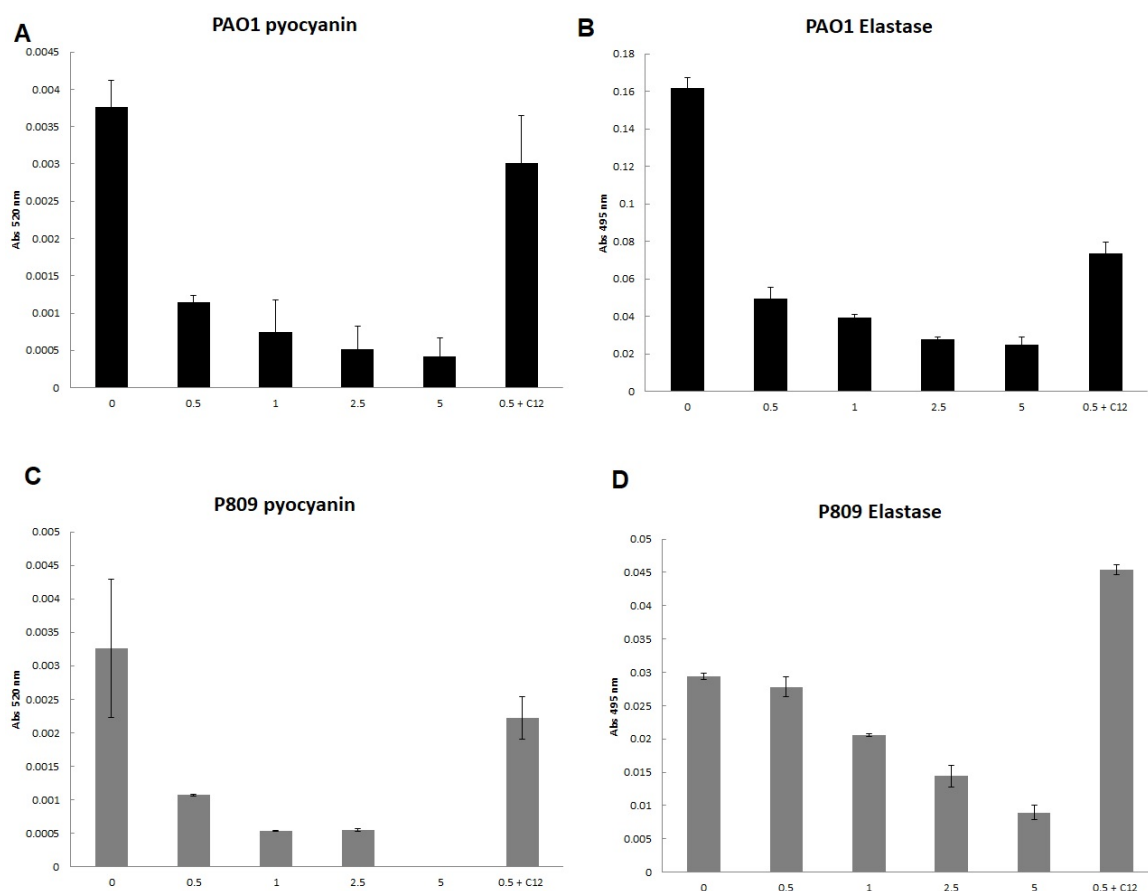


Gráfico 17. Dosis respuesta de la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1 y el aislado clínico P809 con diferentes concentraciones de AiiM.

Como se puede observar en el gráfico 17, existe una respuesta concentración dependiente en la disminución de los dos factores de virulencia probados. A partir de la concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el caso de la PAO1 existe una disminución

estadísticamente significativa de ambos factores de virulencia, para el caso del aislado clínico con la concentración de 0.5 µg/mL existe una disminución de más del 50% en pirocianina, pero no para elastasa. Para el caso de elastasa, a partir de 2.5 µg/mL se observa la disminución cercana al 50%, pero es con la concentración de 5 µg/mL donde se baja a un tercio aproximadamente. Asimismo, utilizando 0.5 µg/mL y agregando de forma exógena 3OC12-HSL existe una reversión significativa en los factores de virulencia probados.

### 7.9 Detección de moléculas acil homoserin lactonas de cadena larga y su inactivación mediante la proteína AiiM.

Una vez que determinamos los factores de virulencia en los aislados clínicos y observamos la disminución de los mismos una vez que eran tratados con la proteína lactonasa AiiM y la degradación de las moléculas HSL tratadas con AiiM observadas por cambios en los tiempos de retención mediante HPLC todo indicaba que el efecto era debido a la acción de la proteína, sin embargo, para evaluar este punto y que esta disminución no estuviera siendo regulada por algún otro elemento no considerado, determinamos primero la presencia de las moléculas autoinductoras en los aislados clínicos. Dado que el sistema canónico se propone como un sistema jerárquico donde 3OC12-HSL es la que lleva la batuta, evaluamos la presencia de este autoinductor mediante una cepa biosensora de *Agrobacterium tumefaciens* NT1 pZLR4.

Observamos que todos los aislados clínicos y la cepa tipo de *P. aeruginosa* PAO1 producían moléculas autoinductoras de cadena larga. En la imagen 40 se observan los resultados de este ensayo.

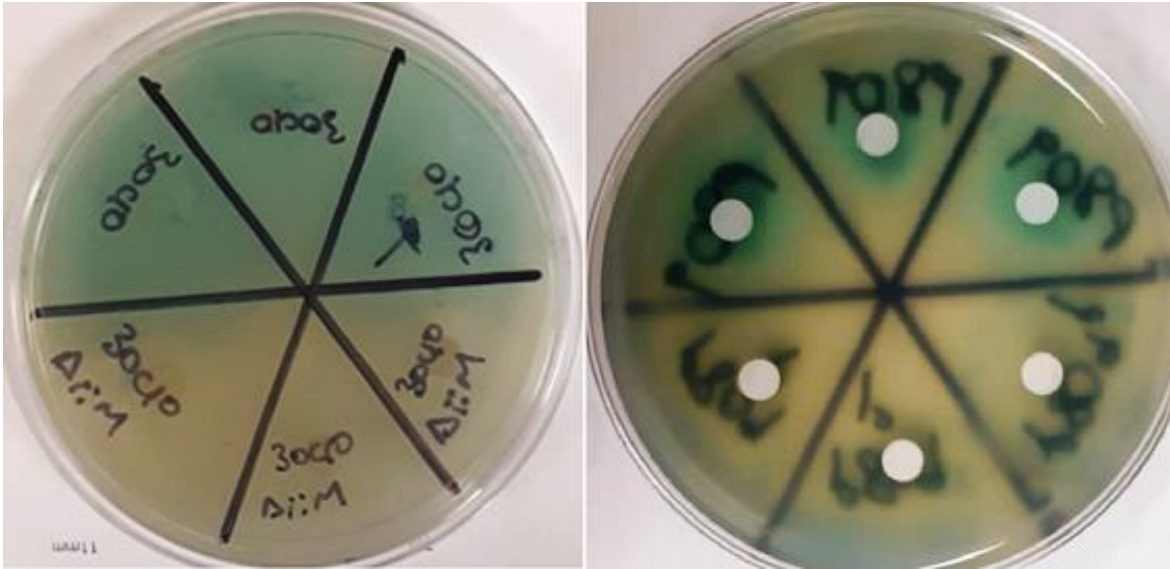


Imagen 40. Detección de moléculas autoinducoras (HSL) de cadena larga e hidrólisis de dichas moléculas con AiiM 5 µg/mL.

Obsérvese que, en la imagen de la izquierda, en la parte superior se observa, con color verde el lugar donde los discos impregnados con moléculas puras de 3OC10-HSL fueron colocados. En contraste, en color beige en la parte de debajo de la imagen de la izquierda donde se colocaron discos impregnados con 3OC10-HSL tratados con AiiM 5 µg/mL. La ausencia de color connota que la cepa biosensora no es capaz de detectar la molécula autoinductora debido a la hidrólisis que sufre derivado del uso de AiiM. En la imagen de la derecha se observa el mismo fenómeno con las cepas clínicas. De tal manera que la disminución de los factores de virulencia se debe a la hidrólisis de los autoinductores ocasionada por el tratamiento con AiiM.

#### 7.10 AiiM no inhibe el sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa*.

Otro de los factores de virulencia que evaluamos, y el cual juega un papel fundamental en la fisiopatogenia de *P. aeruginosa* fue el sistema de secreción tipo III. Queríamos determinar si este factor se veía afectado en la producción de sus toxinas efectoras al ser tratado con la proteína lactonasa. Para ello probamos en dos aislados clínicos (P729 y H015). Se utilizaron como controles positivos las cepas tipos de *P. aeruginosa* PAO1 (produce ExoS) y la PA14 (produce ExoU) y observamos que, de forma indistinta, ya sea con o sin tratamiento con AiiM las cepas

producen las toxinas efectoras asociadas al sistema de secreción tipo III. Por lo que este sistema pareciera no estar controlado por el sistema de comunicación bacteriana de una forma directa y positiva.

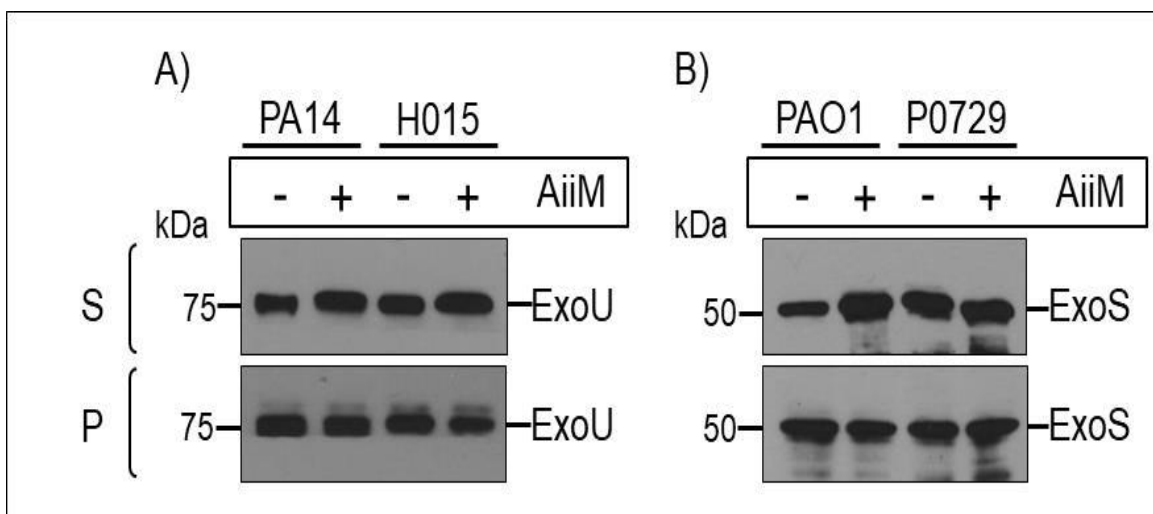


Imagen 41. Identificación por Western blot de las proteínas efectoras del sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa*. A) Determinación de ExoU, B) determinación de ExoS. No se observa disminución o desaparición de la proteína al tratarse con AiiM.

### 7.11 AiiM no degrada los antibióticos $\beta$ -lactámicos con actividad antipseudomónica.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con actividad antipseudomónica son herramientas importantes para los médicos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa*. Por ello, era importante evaluar que AiiM no degradara estos antibióticos, dado que el anillo  $\beta$ -lactámico es un anillo de lactona de 4 átomos de carbono. Por ello diseñamos un experimento con diversos antibióticos de importancia clínica para el tratamiento de *P. aeruginosa*.

AiiM no degradó ningún antibiótico probado. Se utilizó como control positivo de hidrólisis NaOH 60 mM debido a que este reactivo induce un ataque nucleofílico que abre el anillo  $\beta$ -lactámico (gráfico 18, imagen 42).

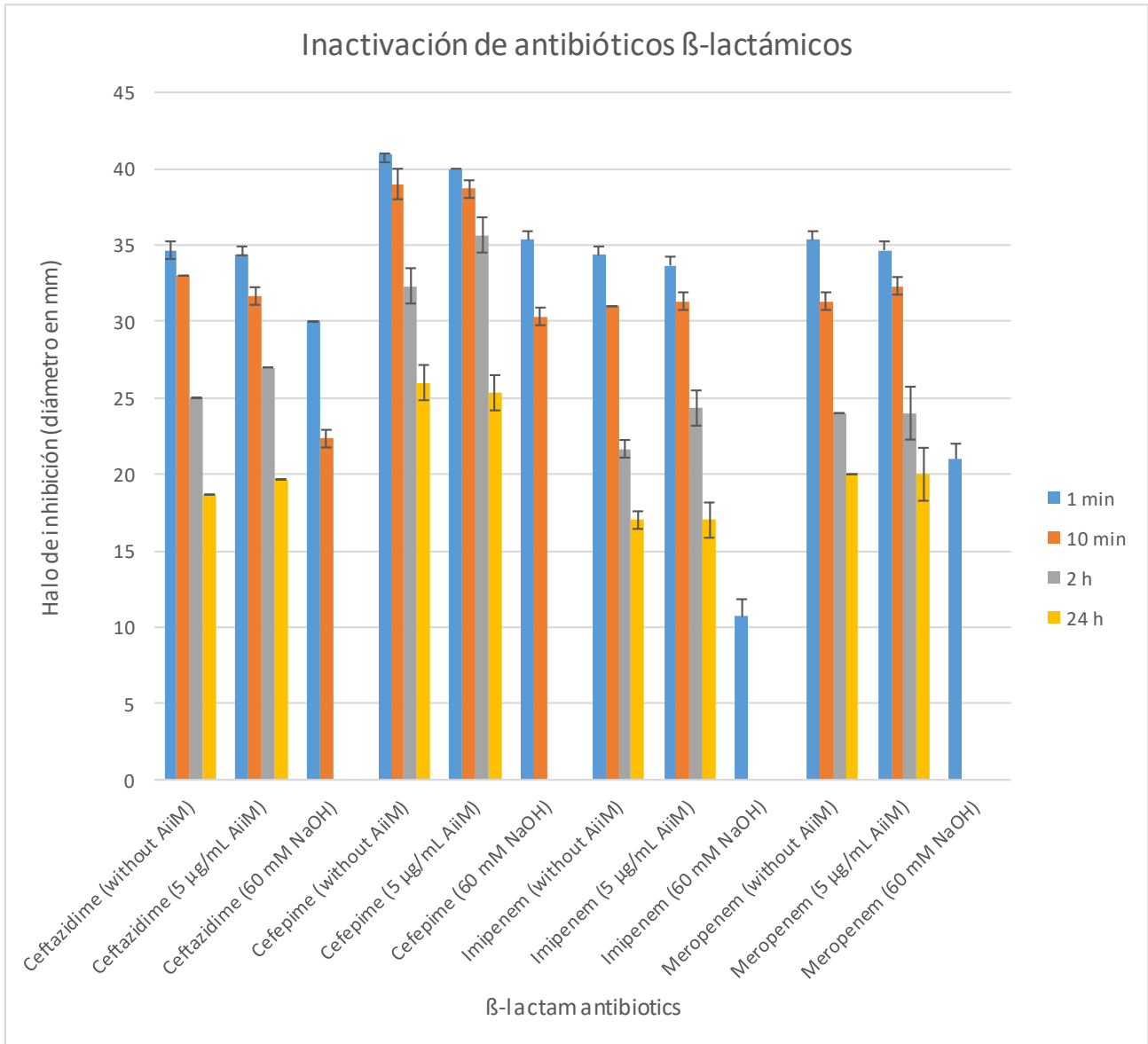


Gráfico 18. Inactivación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizados para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa*. Obsérvese que el halo de los discos de los antibióticos probados con AiiM era similar a aquellos que fueron expuestos únicamente a solución salina isotónica 0.8%.

El no observar la degradación de estos antibióticos supone un punto a favor ya que de ser posible la utilización de esta estrategia en el ámbito clínico no competiría con el efecto de estos antibióticos.

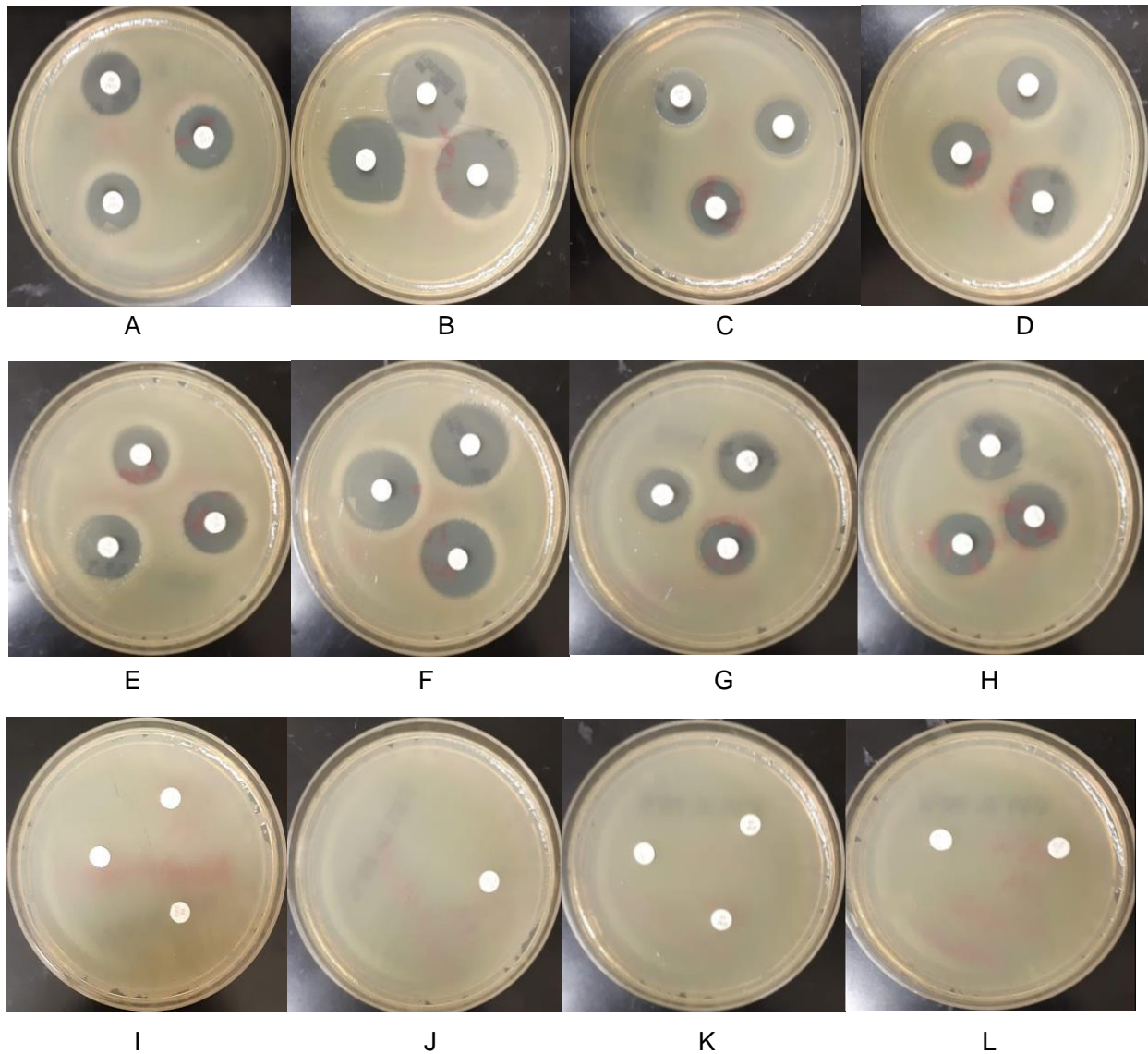


Imagen 42. Método de inactivación de  $\beta$ -lactámicos. A-D:  $\beta$ -lactámicos sin tratamiento, 24 h de incubación con solución salina isotónica únicamente. A) ceftazidima, B) cefepime, C) imipenem y D) meropenem. E-H:  $\beta$ -lactámicos tratados con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AiiM después de 24 h de incubación. E) ceftazidima, F) cefepime, G) imipenem, H) meropenem. I-L:  $\beta$ -lactámicos tratados con NaOH 60 mM para inducción de hidrólisis química. I) ceftazidima, J) cefepime, K) imipenem y L) meropenem.

## 8. Discusión

La multidrogorresistencia es uno de los problemas actuales de gran impacto en la salud pública mundial. Ha sido definida de diversas maneras con la finalidad de llamar la atención y generar estrategias que propongan frenarla, la era post antibióticos o el tsunami silencioso frente a la medicina moderna ([Exner et al., 2017](#)).

En los últimos años, los microorganismos multidrogorresistentes se han convertido en endémicos en diversos hospitales lo que termina ocasionando brotes y las posibilidades de tratamiento se ven reducidas ([Muntean et al., 2018](#)).

*P. aeruginosa* es capaz de causar infecciones severas, particularmente las relacionadas al cuidado a la salud de pacientes inmunocomprometidos, pacientes con cáncer y quemados ([de la Cruz-Hernandez et al., 2020](#); [Horcajada et al., 2019](#)), además, forma parte del grupo *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) los cuales, a su vez, se encuentran enlistados por la organización de la salud de acuerdo a la prioridad para la generación de estrategias y diseños de nuevos antibióticos para poder combatir la multidrogorresistencia asociada a estos microorganismos ([de la Cruz-Hernandez et al., 2020](#); [Tacconelli, 2017](#)).

*P. aeruginosa* además de tener la capacidad de adquirir diversos mecanismos de resistencia, posee un amplio arsenal de mecanismos denominados intrínsecos, por lo que, de forma natural, en esta bacteria se descartan algunos antibióticos que tienen actividad en otras bacterias, por ejemplo sulfametoxazol/trimetoprim, tigeciclina y ertapenem (por mencionar algunos) ([Bonomo & Szabo, 2006](#); [Dreier & Ruggerone, 2015](#)) ([Horcajada et al., 2019](#)).

Los pacientes con quemaduras presentan las manifestaciones más devastadoras de trauma. Este grupo de pacientes, *per se*, son susceptibles de sufrir procesos infecciosos debido a la pérdida de la continuidad de las barreras primarias (piel) y tiene una asociación de morbi-mortalidad elevada ([Church et al., 2006](#)). *P.*

*aeruginosa* junto con *A. baumannii* son las bacterias con la mayor prevalencia de infección en pacientes con quemaduras ([L. Li et al., 2018](#)). Este dato se ha podido constatar en un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo donde encontramos que las bacterias previamente mencionadas, son las principales causas de procesos infecciosos en pacientes con quemaduras eléctricas atendidas en nuestra institución. Asimismo, las tasas de resistencia de estos aislados son consistentes con lo reportado mundialmente, donde podemos observar aislados clínicos con patrones de resistencia elevados y extendidos ([L. E. Lopez-Jacome et al., 2019](#)).

En un intento de responder cuál es la distribución de la susceptibilidad en el ámbito mexicano, derivado de la ausencia de información por parte de las instancias mexicanas, dos grupos han tomado la batuta y han comenzado a reportar el comportamiento y distribución de la resistencia en diversos hospitales mexicanos, tanto públicos como privados, por un lado, el grupo dirigido por la Dra. Elvira Garza, en el norte del país, y por otro lado el grupo del Dr. Ponce de León de la Universidad Nacional Autónoma de México ([Rosales, 2019](#)). En el trabajo de la Dra. Garza se encontró la presencia de carbapenemasas en el 27% de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* pertenecientes a 47 instituciones de salud que abarcaron 20 entidades federativas, además, 175/1995 aislados clínicos fueron multidrogorresistentes, 165 fueron extremadamente resistentes y 87 pan resistentes ([Garza-Gonzalez et al., 2019](#)).

En el presente trabajo encontramos que la tasa de resistencia global es mayor al 50% a los antibióticos probados. La mayor tasa de resistencia, el 80%, se encontró en ciprofloxacino. Para cefalosporinas > 60% y para carbapenémicos del 70%. Una cepa clínica presentó resistencia a colistina, lo cual llama la atención y preocupa debido a que es el último antibiótico de rescate.

La proteína en estudio, AiiM, fue capaz de hidrolizar todas las moléculas HSL probadas, tanto las de cadena corta como las de cadena larga, esto es consistente con lo reportado por el grupo de Wang ([W. Z. Wang et al., 2010](#)).



AiiM fue capaz de hidrolizar las moléculas HSL probadas en 5 minutos de exposición a concentración baja (5 µg/mL). Si bien no se realizó un estudio cuantitativo, al observar los tiempos de retención en los cromatogramas HPLC no se observan picos coincidentes con la molécula sin hidrolizar, por lo que inferimos, que AiiM degradó de forma total 1 mM de cada molécula probada.

Una de las principales razones para utilizar este tipo de estrategia es que no modifica la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* por lo tanto, se espera que se cumpla el supuesto de que, al no impedir la tasa de crecimiento normal no se presente un fenómeno de presión de selección que obligue a las bacterias a generar algún mecanismo de respuesta ante dicho fenómeno ([Defoirdt, 2018](#); [Defoirdt, Brackman, & Coenye, 2013](#)). Referente a este rubro podemos decir que AiiM no interfirió en la cinética de crecimiento y el patrón de crecimiento fue el mismo con y sin tratamiento con AiiM.

En comparación con un estudio francés donde se prueba una enzima lactonasa con modificación en el centro catalítico para aumentar la eficiencia de hidrólisis (triptófano a isoleucina en el residuo 263), AiiM mostró una actividad 100 veces mayor que la enzima SsoPox, la cual fue utilizada a una concentración de 0.5 mg/mL ([Guendouze et al., 2017](#)). Además, algunos aislados clínicos presentaron cierta resistencia al efecto de la enzima en la disminución de los factores de virulencia probados. En nuestro caso, AiiM disminuyó, con significancia estadística, los factores de virulencia asociados al sistema de percepción de quórum probados (elastasa, proteasa alcalina, piocianina y HCN). Existen reportes de la eficacia de esta estrategia en modelos *in vivo*, como el modelo de neumonía en ratón, los cuales fueron infectados con *P. aeruginosa* y tratados con AiiM en forma de aerosol. Se encontró mejoría en los ratones que fueron tratados con AiiM. Esto es alentador debido a que sigue resultando un excelente candidato para poder migrar a una estrategia de uso clínico ([Migiyama et al., 2013](#)). Por otra parte, el grupo del Dr. Toshinari Maeda, ha evidenciado que existe una disminución en la producción de

metano en lodos residuales de plantas de tratamiento, tratados con AiiM ([P. D. T. Nguyen et al., 2019](#)), por lo que la aplicación de esta estrategia es diversa.

Basándonos en la evidencia propuesta por Guendouze, que demuestra que SsoPox tuvo mejores resultados que otros compuestos químicos con actividad demostrada en la inhibición del sistema de percepción de quórum como furanonas bromadas y 5-fluoracilo ([Guendouze et al., 2017](#)), podemos inferir que AiiM tiene un mejor rendimiento que estos compuestos, sin la toxicidad asociada que poseen tanto las furanonas como el 5-fluoracilo. Además de que para estos compuestos se han reportado mecanismos de resistencia a la inhibición del quórum ([Garcia-Contreras et al., 2013](#); [Garcia-Contreras et al., 2015](#)).

A pesar de que AiiM disminuyó las actividades de elastasa, proteasa alcalina, piocianina y HCN, no tuvo la capacidad de inhibir el sistema de secreción tipo III, esto debido, a que encontramos las toxinas efectoras asociadas a este sistema de secreción en las condiciones donde las cepas se trataron con AiiM como en aquellas a las que no se les agregó la proteína. Esto es consistente con los estudios recientes donde se vio que la cepa doble mutante  $\Delta lasR/rhIR$  produce y secreta las toxinas efectoras en los mismos niveles que lo hace la cepa silvestre PAO1, indicando que este sistema no está bajo un control directo positivo de percepción de quórum ([Soto-Aceves et al., 2019](#)). Esto, lejos de mostrar “un pero”, representa un área de oportunidad para el diseño de una estrategia anti-virulencia con mayor robustez que busque inhibir tanto al SSTIII como al sistema de percepción de quórum, dado que son bajas las concentraciones de SSTIII utilizadas por las bacterias para instalarse en el hospedero ([Garcia-Contreras, 2016](#)).

Una de las posibles limitaciones de nuestro trabajo se centra en los aislados con deficiencias en *lasR/rhIR*, las cuales por su naturaleza producen bajos niveles de factores de virulencia, bajo este hecho, las cepas podrían ser tolerantes al efecto de AiiM y cualquier otra estrategia de inhibición del sistema de percepción de quórum ([Morales, Gonzalez-Valdez, Servin-Gonzalez, & Soberon-Chavez, 2017](#)).

AiiM es un miembro de la súper familia  $\alpha/\beta$  hidrolasas con actividad de lactonasa y tomando en cuenta que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos tienen un anillo de lactona ( $\beta$ -lactona) podrían ser susceptibles de sufrir hidrólisis por esta enzima lo que significaría un obstáculo para su utilización clínica, sin embargo, en los ensayos realizados, AiiM no dañó la integridad de las moléculas antibióticas  $\beta$ -lactámicas ensayadas, las cuales se comportaron igual que las moléculas que fueron tratadas únicamente con solución salina isotónica 0.8%. Esto es relevante ya que los antibióticos probados son de los más utilizados para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* por la capacidad bactericida que tienen sobre esta bacteria.

Aunque más trabajos son necesarios para observar el posible uso de AiiM en quemaduras, por ejemplo en un modelo *in vivo*, nuestro trabajo sugiere que AiiM podría ser un coadyuvante efectivo para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, asimismo, el trabajo de Guendouze demostró su utilidad en aislados clínicos de *P. aeruginosa* en pie diabético ([Guendouze et al., 2017](#)), por otro lado, se cuenta con evidencia de su uso en modelos *in vivo* como el de modelo de amiba ([Mion et al., 2019](#)) y en modelo de neumonía en rata ([Hraiech et al., 2014](#)) en ambos caso se probó la eficacia de esta proteína, que si bien es utilizando la cepa tipo *P. aeruginosa* PAO1, sienta los precedentes para pensar que, la lactonasa AiiM es un fuerte candidata para su posible utilización clínica.

Ante ello, las evidencias aquí manifestadas sugieren que AiiM podría tener una utilización como coadyuvante en pacientes con quemaduras y procesos infecciosos por *P. aeruginosa*.

## 9. Conclusiones

En el presente trabajo concluimos que la proteína AiiM tiene un amplio rango de acción hidrolítica, pues hidrolizó moléculas HSL de cadena corta como de cadena larga: C4-HSL, 3OC8-HSL, C10-HSL, 3OC10-HSL y 3OC12-HSL.

Esta proteína no interfirió con la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*. Por lo que, en principio, no generaría mecanismos de resistencia a la acción de la proteína derivado de la presión de selección.

Disminuyó drásticamente los factores de virulencia que están involucrados con la comunicación bacteriana: elastasa, proteasa alcalina, piocianina y HCN en todas las cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con quemaduras atendidos en el CENIAQ del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Sin embargo, no disminuyó la producción de toxinas efectoras asociadas al sistema de secreción tipo III.

No se encontraron cepas tolerantes al efecto de la proteína AiiM y los factores de virulencia probados.

## 10. Perspectivas

Uno de los rubros a cumplir en mediano plazo es sobreexpresar la proteína para poder inmovilizarla en polímeros y determinar la actividad de la misma para poder migrar la estrategia a dispositivos médicos de interés (apósitos y puntas de catéter), de esta forma estaríamos pensando en una aplicación clínica.

Realización de ensayos RNAseq para determinar los genes que se logran ver afectados por el tratamiento de la enzima y poder predecir si se pudiera presentar algún mecanismo evasivo.

Realización de ensayos *in vivo* para ver modelos de infección y el uso de esta proteína en diferentes escenarios. Se está considerando inicialmente trabajar con modelo de *Galleria mellonella*.

## 10. Bibliografía

- ABA. (2016). Burn Incidence and Treatment in the United States: 2016. from <http://ameriburn.org/who-we-are/media/burn-incidence-fact-sheet/>
- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*, 9(3). doi: 10.1128/mBio.02331-17
- Ackerley, D. F., Caradoc-Davies, T. T., & Lamont, I. L. (2003). Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 185(9), 2848-2855. doi: 10.1128/jb.185.9.2848-2855.2003
- Aghakhani, K., Heidari, M., Tabatabaee, S. M., & Abdolkarimi, L. (2015). Effect of current pathway on mortality and morbidity in electrical burn patients. *Burns*, 41(1), 172-176. doi: 10.1016/j.burns.2014.06.008
- Agnihotri, N., Gupta, V., & Joshi, R. M. (2004). Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms--a five-year study. *Burns*, 30(3), 241-243. doi: 10.1016/j.burns.2003.11.010
- Ahuja, E. G., Janning, P., Mentel, M., Graebisch, A., Breinbauer, R., Hiller, W., . . . Blankenfeldt, W. (2008). PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 130(50), 17053-17061. doi: 10.1021/ja806325k
- Albrecht, M. T., & Schiller, N. L. (2005). Alginate lyase (AlgL) activity is required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187(11), 3869-3872. doi: 10.1128/JB.187.11.3869-3872.2005
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574. doi: 10.1021/bi5000564
- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Lee, D. G., Cornelis, P., Hellewell, P. G., & Whyte, M. K. (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol*, 174(6), 3643-3649. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3643
- Allydice-Francis, K., & Brown, P. D. (2012). Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *Int J Microbiol*, 2012, 426241. doi: 10.1155/2012/426241
- Amitai, G., Gupta, R. D., & Tawfik, D. S. (2007). Latent evolutionary potentials under the neutral mutational drift of an enzyme. *HFSP Journal*, 1(1), 67. doi: 10.2976/1.2739115/10.2976/1
- Arber, W. (2014). Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life (Basel)*, 4(2), 217-224. doi: 10.3390/life4020217
- Arora, S. K., Neely, A. N., Blair, B., Lory, S., & Ramphal, R. (2005). Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect Immun*, 73(7), 4395-4398. doi: 10.1128/IAI.73.7.4395-4398.2005
- Atiyeh B.S., A.-A. C. A. (2001). Immunology of Burn Injury - An Overview. *Annals of Burns and Fire Disasters*, XIV(2), 78-84.
- Bainbridge, T., & Fick, R. B., Jr. (1989). Functional importance of cystic fibrosis immunoglobulin G fragments generated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Lab Clin Med*, 114(6), 728-733.
- Ball, C. A., Dolinski, K., Dwight, S. S., Harris, M. A., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., . . . Cherry, J. M. (2000). Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 77-80. doi: 10.1093/nar/28.1.77
- Ballok, A. E., & O'Toole, G. A. (2013). Pouring salt on a wound: *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors alter Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> flux in the lung. *J Bacteriol*, 195(18), 4013-4019. doi: 10.1128/JB.00339-13
- Barbieri, A. M., Sha, Q., Bette-Bobillo, P., Stahl, P. D., & Vidal, M. (2001). ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* affects endocytosis. *Infect Immun*, 69(9), 5329-5334. doi: 10.1128/iai.69.9.5329-5334.2001

- Barret, J. P., & Herndon, D. N. (2003). Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Reconstr Surg*, 111(2), 744-750; discussion 751-742. doi: 10.1097/01.PRS.0000041445.76730.23
- Baum, E. Z., Crespo-Carbone, S. M., Morrow, B. J., Davies, T. A., Foleno, B. D., He, W., . . . Bush, K. (2009). Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(7), 2785-2790. doi: 10.1128/AAC.00018-09
- Beal, R., & Betts, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*, 89(1), 158-168. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01104.x
- Becker, W. K., Cioffi, W. G., Jr., McManus, A. T., Kim, S. H., McManus, W. F., Mason, A. D., & Pruitt, B. A., Jr. (1991). Fungal burn wound infection. A 10-year experience. *Arch Surg*, 126(1), 44-48. doi: 10.1001/archsurg.1991.01410250048008
- Bell, A., Bains, M., & Hancock, R. E. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH: expression from the cloned gene and function in EDTA and gentamicin resistance. *J Bacteriol*, 173(21), 6657-6664. doi: 10.1128/jb.173.21.6657-6664.1991
- Bellido, F., Martin, N. L., Siehnel, R. J., & Hancock, R. E. (1992). Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *J Bacteriol*, 174(16), 5196-5203. doi: 10.1128/jb.174.16.5196-5203.1992
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., & Khedher, M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)*, 69(4), 393-403. doi: 10.1684/abc.2011.0589
- Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguene, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., & Plesiat, P. (2015). Mutations in beta-Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(10), 6248-6255. doi: 10.1128/AAC.00825-15
- Bialvaei, A. Z., & Samadi Kafil, H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*, 31(4), 707-721. doi: 10.1185/03007995.2015.1018989
- Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Muller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., . . . Streit, W. R. (2011). A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 6(10), e26278. doi: 10.1371/journal.pone.0026278
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., . . . Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462. doi: 10.1126/science.277.5331.1453
- Blondel-Hill Edith, H. D. A., Speert David P. (2007). *Pseudomonas*. In B. E. J. Murray Patrick R., Jorgensen James H., Landry Marie Louise, Pfaller Michael A. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., Vol. 1, pp. 734-748). American Society for Microbiology: American Society for Microbiology.
- Bloudoff, K., & Schmeing, T. M. (2017). Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1865(11 Pt B), 1587-1604. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.05.010
- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol*, 173(3), 170-177. doi: 10.1007/s002039900127
- Boll, M., Radziejewska-Lebrecht, J., Warth, C., Krajewska-Pietrasik, D., & Mayer, H. (1994). 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8(4), 329-341. doi: 10.1111/j.1574-695X.1994.tb00460.x
- Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter species* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 43 Suppl 2, S49-56. doi: 10.1086/504477
- Bouffartigues, E., Moscoso, J. A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompte, L., Gicquel, G., . . . Chevalier, S. (2015). The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Front Microbiol*, 6, 630. doi: 10.3389/fmicb.2015.00630

- Brackman, G., Risseuw, M., Celen, S., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J., . . . Coenye, T. (2012). Synthesis and evaluation of the quorum sensing inhibitory effect of substituted triazolylidihydrofuranones. *Bioorg Med Chem*, 20(15), 4737-4743. doi: 10.1016/j.bmc.2012.06.009
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol*, 11(5), 1079-1091. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x
- Braz, V. S., Furlan, J. P., Fernandes, A. F., & Stehling, E. G. (2016). Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 363(16). doi: 10.1093/femsle/fnw166
- Breidenstein, E. B., de la Fuente-Nunez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, 19(8), 419-426. doi: 10.1016/j.tim.2011.04.005
- Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., . . . Schalk, I. J. (2012). An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol*, 7(12), 2036-2045. doi: 10.1021/cb300330v
- 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*. *J Infect Dis*, 197(3), 457-464. doi: 10.1086/525282
- Bruchmann, S., Dotsch, A., Nouri, B., Chaberny, I. F., & Haussler, S. (2013). Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(3), 1361-1368. doi: 10.1128/AAC.01581-12
- Bruno, T. F., Woods, D. E., Storey, D. G., & Mody, C. H. (1999). Recombinant *Pseudomonas* exoenzyme S and exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* DG1 share the ability to stimulate T lymphocyte proliferation. *Can J Microbiol*, 45(7), 607-611.
- Brusselsaers, N., Monstrey, S., Vogelaers, D., Hoste, E., & Blot, S. (2010). Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care*, 14(5), R188. doi: 10.1186/cc9300
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Tubau, F., Macia, M. D., Rodriguez, C., Moya, B., . . . Spanish Network for Research in Infectious, D. (2011). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), 1906-1911. doi: 10.1128/AAC.01645-10
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M., & O'Toole, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187(21), 7351-7361. doi: 10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005
- Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J., . . . Lau, G. W. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am J Pathol*, 175(6), 2473-2488. doi: 10.2353/ajpath.2009.090166
- Campodonico, V. L., Llosa, N. J., Grout, M., Doring, G., Maira-Litran, T., & Pier, G. B. (2010). Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infect Immun*, 78(2), 746-755. doi: 10.1128/IAI.00806-09
- Capoor, M. R., Sarabahi, S., Tiwari, V. K., & Narayanan, R. P. (2010). Fungal infections in burns: Diagnosis and management. *Indian J Plast Surg*, 43(Suppl), S37-42. doi: 10.4103/0970-0358.70718
- Carroll, W., Lenney, W., Wang, T., Spanel, P., Alcock, A., & Smith, D. (2005). Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry. *Pediatr Pulmonol*, 39(5), 452-456. doi: 10.1002/ppul.20170
- Carterson, A. J., Morici, L. A., Jackson, D. W., Frisk, A., Lizewski, S. E., Jupiter, R., . . . Schurr, M. J. (2004). The transcriptional regulator AlgR controls cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 186(20), 6837-6844. doi: 10.1128/JB.186.20.6837-6844.2004



- Case, R. J., Labbate, M., & Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J*, 2(4), 345-349. doi: 10.1038/ismej.2008.13
- Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S., & Haussler, S. (2016). The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect Immun*, 84(1), 162-171. doi: 10.1128/IAI.00939-15
- Castaneda-Tamez, P., Ramirez-Peris, J., Perez-Velazquez, J., Kuttler, C., Jalalimanesh, A., Saucedo-Mora, M. A., . . . Garcia-Contreras, R. (2018). Pyocyanin Restricts Social Cheating in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 9, 1348. doi: 10.3389/fmicb.2018.01348
- Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., & Walsh, T. R. (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4654-4661. doi: 10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004
- Cavalcanti, F. L., Mirones, C. R., Paucar, E. R., Montes, L. A., Leal-Balbino, T. C., Morais, M. M., . . . Ocampo-Sosa, A. A. (2015). Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(8), 1003-1009. doi: 10.1590/0074-02760150233
- CDC. (2019a, November 14, 2019). Biggest Threats and Data. from <https://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html>
- CDC. (2019b, November 13, 2019). *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. 2020, from <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr Med Chem*, 22(2), 165-186. doi: 10.2174/0929867321666141011194624
- Cicmanec, J. F., & Holder, I. A. (1979). Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract: role of extracellular proteases. *Infect Immun*, 25(2), 477-483.
- Cipollone, R., Bigotti, M. G., Frangipani, E., Ascenzi, P., & Visca, P. (2004). Characterization of a rhodanese from the cyanogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 325(1), 85-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.214
- Clevenger, K. D., Mascarenhas, R., Catlin, D., Wu, R., Kelleher, N. L., Drake, E. J., . . . Fast, W. (2017). Substrate Trapping in the Siderophore Tailoring Enzyme PvdQ. *ACS Chem Biol*, 12(3), 643-647. doi: 10.1021/acschembio.7b00031
- CLSI. (2015). M07-A10 Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standard. In CLSI (Ed.), *M07-A10 Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standard* (10th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2019). M100 Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing. In C. a. L. S. Institute (Ed.), *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Cohen, R., Babushkin, F., Cohen, S., Afraimov, M., Shapiro, M., Uda, M., . . . Paikin, S. (2017). A prospective survey of *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection in the intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control*, 6, 7. doi: 10.1186/s13756-016-0167-7
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., . . . Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537-544. doi: 10.1038/31159
- Cowell, B. A., Chen, D. Y., Frank, D. W., Vallis, A. J., & Fleiszig, S. M. (2000). ExoT of cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* prevents uptake by corneal epithelial cells. *Infect Immun*, 68(1), 403-406. doi: 10.1128/iai.68.1.403-406.2000
- Cox, C. D., Rinehart, K. L., Jr., Moore, M. L., & Cook, J. C., Jr. (1981). Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7), 4256-4260. doi: 10.1073/pnas.78.7.4256
- Cruickshank, C. N., & Lowbury, E. J. (1953). The effect of pyocyanin on human skin cells and leucocytes. *Br J Exp Pathol*, 34(6), 583-587.
- Cruz-Muniz, M. Y., Lopez-Jacome, L. E., Hernandez-Duran, M., Franco-Cendejas, R., Licona-Limon, P., Ramos-Balderas, J. L., . . . Garcia-Contreras, R. (2017). Repurposing the anticancer drug

- mitomycin C for the treatment of persistent *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Antimicrob Agents*, 49(1), 88-92. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.022
- Cryz, S. J., Jr., Pitt, T. L., Furer, E., & Germanier, R. (1984). Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 44(2), 508-513.
- Czajkowski, R., Krzyzanowska, D., Karczewska, J., Atkinson, S., Przysowa, J., Lojkowska, E., . . . Jafra, S. (2011). Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum sp.* A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase. *Environ Microbiol Rep*, 3(1), 59-68. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00188.x
- Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., AnilKumar, V., Gopi Mohan, C., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol*, 306(1), 48-58. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.11.004
- Chaudry, I. H., & Ayala, A. (1993). Mechanism of increased susceptibility to infection following hemorrhage. *The American Journal of Surgery*, 165(2), 59S-67S. doi: 10.1016/s0002-9610(05)81208-5
- Chen, C. N., Chen, C. J., Liao, C. T., & Lee, C. Y. (2009). A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiol*, 9, 89. doi: 10.1186/1471-2180-9-89
- Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., . . . Xu, H. (2009). Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *Int J Infect Dis*, 13(6), 717-721. doi: 10.1016/j.ijid.2008.11.014
- Chowdhary, P. K., Keshavan, N., Nguyen, H. Q., Peterson, J. A., Gonzalez, J. E., & Haines, D. C. (2007). *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*, 46(50), 14429-14437. doi: 10.1021/bi701945j
- Chowdhary, P. K., Stewart, L., Lopez, C., & Haines, D. C. (2008). A single mutation in P450BM-3 enhances acyl homoserine lactone: acyl homoserine substrate binding selectivity nearly 250-fold. *J Biotechnol*, 135(4), 374-376. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.05.005
- Christensen, L. D., Moser, C., Jensen, P. O., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Kjelleberg, S., . . . Bjarnsholt, T. (2007). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. *Microbiology*, 153(Pt 7), 2312-2320. doi: 10.1099/mic.0.2007/006122-0
- Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J., & Greenberg, E. P. (2004). Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3587-3590. doi: 10.1073/pnas.0308750101
- Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., & Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*, 19(2), 403-434. doi: 10.1128/CMR.19.2.403-434.2006
- 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. *Mol Microbiol*, 40(1), 76-85. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02368.x
- Dalal, P. K., Saha, R., & Agarwal, M. (2010). Psychiatric aspects of burn. *Indian J Plast Surg*, 43(Suppl), S136-142. doi: 10.4103/0970-0358.70731
- Dallal, G. E. (2008, June 15, 2008). Randomization.com. Retrieved August 31 2020, 2008, from <http://www.randomization.com>
- Daury, L., Orange, F., Taveau, J. C., Verchere, A., Monlezun, L., Gounou, C., . . . Lambert, O. (2016). Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun*, 7, 10731. doi: 10.1038/ncomms10731
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 185(3), 1027-1036. doi: 10.1128/jb.185.3.1027-1036.2003
- de la Cruz-Hernandez, I., Cornejo-Juarez, P., Tellez-Miranda, O., Barrera-Perez, L., Sandoval-Hernandez, S., Vilar-Compte, D., . . . Volkow, P. (2020). Microbiology and prevalence of E2SKAPE-resistant strains in catheter-related bloodstream infections in patients with cancer. *Am J Infect Control*, 48(1), 40-45. doi: 10.1016/j.ajic.2019.06.008
- DeBoer, S., & O'Connor, A. (2004). Prehospital and emergency department burn care. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 16(1), 61-73. doi: 10.1016/j.ccell.2003.10.004

- Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol*, 26(4), 313-328. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.005
- Defoirdt, T., Boon, N., & Bossier, P. (2010). Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog*, 6(7), e1000989. doi: 10.1371/journal.ppat.1000989
- Defoirdt, T., Brackman, G., & Coenye, T. (2013). Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence? *Trends Microbiol*, 21(12), 619-624. doi: 10.1016/j.tim.2013.09.006
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 808-816. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Deng, Q., Sun, J., & Barbieri, J. T. (2005). Uncoupling Crk signal transduction by *Pseudomonas* exoenzyme T. *J Biol Chem*, 280(43), 35953-35960. doi: 10.1074/jbc.M504901200
- DGE. (2018a). Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación, Población Femenina. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos.
- DGE. (2018b). Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación. Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud, Estados Unidos Mexicanos.
- DGE. (2018c). Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación. Población Masculina. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos.
- DGE. (2018d). Distribución de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad: Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud de los Estados Unidos Mexicanos.
- 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. doi: 10.1073/pnas.97.7.3526
- Dorrestein, P. C., Poole, K., & Begley, T. P. (2003). Formation of the chromophore of the pyoverdine siderophores by an oxidative cascade. *Org Lett*, 5(13), 2215-2217. doi: 10.1021/ol034531e
- Drake, E. J., Cao, J., Qu, J., Shah, M. B., Straubinger, R. M., & Gulick, A. M. (2007). The 1.8 Å crystal structure of PA2412, an MbtH-like protein from the pyoverdine cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 282(28), 20425-20434. doi: 10.1074/jbc.M611833200
- Drake, E. J., & Gulick, A. M. (2016). 1.2 Å resolution crystal structure of the periplasmic aminotransferase PvdN from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 72(Pt 5), 403-408. doi: 10.1107/S2053230X16006257
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*, 23(1), 160-201. doi: 10.1128/CMR.00037-09
- Dreier, J., & Ruggerone, P. (2015). Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 6, 660. doi: 10.3389/fmicb.2015.00660
- Dunny, G. M., Brown, B. L., & Clewell, D. B. (1978). Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(7), 3479-3483. doi: 10.1073/pnas.75.7.3479
- Dupont, P., Hocquet, D., Jeannot, K., Chavanet, P., & Plesiat, P. (2005). Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 55(4), 518-522. doi: 10.1093/jac/dki030
- Dworkin, M., & Kaiser, D. (1985). Cell interactions in myxobacterial growth and development. *Science*, 230(4721), 18-24. doi: 10.1126/science.3929384
- Dzidic, S., & Bedekovic, V. (2003). Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin*, 24(6), 519-526.
- Eberhard, A., Widrig, C. A., McBath, P., & Schineller, J. B. (1986). Analogs of the autoinducer of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. *Arch Microbiol*, 146(1), 35-40. doi: 10.1007/BF00690155
- El'Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C., & Plesiat, P. (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(3), 1016-1021. doi: 10.1128/AAC.00704-06

- El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., El-Bialy, H. A., & Omara, A. M. A. (2019). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36-48. doi: 10.1016/j.jrras.2014.10.007
- Engbrecht, J., & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(13), 4154-4158. doi: 10.1073/pnas.81.13.4154
- Epelman, S., Bruno, T. F., Neely, G. G., Woods, D. E., & Mody, C. H. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. *Infect Immun*, 68(8), 4811-4814. doi: 10.1128/iai.68.8.4811-4814.2000
- Erol, S., Altoparlak, U., Akcay, M. N., Celebi, F., & Parlak, M. (2004). Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns*, 30(4), 357-361. doi: 10.1016/j.burns.2003.12.013
- Evers, L. H., Bhavsar, D., & Mailander, P. (2010). The biology of burn injury. *Exp Dermatol*, 19(9), 777-783. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., . . . Trautmann, M. (2017). Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control*, 12, Doc05. doi: 10.3205/dgkh000290
- Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., & Biedermann, T. (2018). Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol*, 39(4), 315-327. doi: 10.1016/j.it.2018.02.004
- Fang, Z. L., Zhang, L. Y., Huang, Y. M., Qing, Y., Cao, K. Y., Tian, G. B., & Huang, X. (2014). OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infect Genet Evol*, 21, 124-128. doi: 10.1016/j.meegid.2013.10.027
- Fauerbach, J. A., Lezotte, D., Hills, R. A., Cromes, G. F., Kowalske, K., de Lateur, B. J., . . . Patterson, D. R. (2005). Burden of burn: a norm-based inquiry into the influence of burn size and distress on recovery of physical and psychosocial function. *J Burn Care Rehabil*, 26(1), 21-32. doi: 10.1097/01.bcr.0000150216.87940.ac
- Fear, V. S., Boyd, J. H., Rea, S., Wood, F. M., Duke, J. M., & Fear, M. W. (2017). Burn Injury Leads to Increased Long-Term Susceptibility to Respiratory Infection in both Mouse Models and Population Studies. *PLoS One*, 12(1), e0169302. doi: 10.1371/journal.pone.0169302
- Felnagle, E. A., Barkei, J. J., Park, H., Podevels, A. M., McMahon, M. D., Drott, D. W., & Thomas, M. G. (2010). MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 49(41), 8815-8817. doi: 10.1021/bi1012854
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., & Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 147(Pt 10), 2659-2669. doi: 10.1099/00221287-147-10-2659
- Fernandez, L., & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), 661-681. doi: 10.1128/CMR.00043-12
- Fetzner, S. (2015). Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol*, 201, 2-14. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.001
- Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J. P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K. E., Kanada, D., . . . Frank, D. W. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun*, 65(2), 579-586.
- Fleiszig, S. M., Zaidi, T. S., Fletcher, E. L., Preston, M. J., & Pier, G. B. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* invades corneal epithelial cells during experimental infection. *Infect Immun*, 62(8), 3485-3493.
- Fleitas Martinez, O., Rigueiras, P. O., Pires, A. D. S., Porto, W. F., Silva, O. N., de la Fuente-Nunez, C., & Franco, O. L. (2018). Interference With Quorum-Sensing Signal Biosynthesis as a Promising Therapeutic Strategy Against Multidrug-Resistant Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 444. doi: 10.3389/fcimb.2018.00444
- Forjuoh, S. N. (2006). Burns in low- and middle-income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. *Burns*, 32(5), 529-537. doi: 10.1016/j.burns.2006.04.002

- Fournier, A., Voirol, P., Krahenbuhl, M., Bonnemain, C. L., Fournier, C., Pantet, O., . . . Que, Y. A. (2016). Antibiotic consumption to detect epidemics of *Pseudomonas aeruginosa* in a burn centre: A paradigm shift in the epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infections. *Burns*, 42(3), 564-570. doi: 10.1016/j.burns.2015.10.030
- Franchi, L., Stoolman, J., Kanneganti, T. D., Verma, A., Ramphal, R., & Nunez, G. (2007). Critical role for IpaF in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol*, 37(11), 3030-3039. doi: 10.1002/eji.200737532
- Franklin, M. J., Douthit, S. A., & McClure, M. A. (2004). Evidence that the algI/algJ gene cassette, required for O acetylation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate, evolved by lateral gene transfer. *J Bacteriol*, 186(14), 4759-4773. doi: 10.1128/JB.186.14.4759-4773.2004
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*, 2, 167. doi: 10.3389/fmicb.2011.00167
- Franklin, M. J., & Ohman, D. E. (2002). Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 184(11), 3000-3007. doi: 10.1128/jb.184.11.3000-3007.2002
- Fraylick, J. E., La Rocque, J. R., Vincent, T. S., & Olson, J. C. (2001). Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infect Immun*, 69(9), 5318-5328. doi: 10.1128/iai.69.9.5318-5328.2001
- Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol*, 1(2), 183-189. doi: 10.1016/s1369-5274(98)80009-x
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 176(2), 269-275. doi: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994
- Galdino, A. C. M., Branquinho, M. H., Santos, A. L. S., & Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. In S. Chakraborti & N. S. Dhalla (Eds.), *Pathophysiological Aspects of Proteases* (pp. 381-397). Singapore: Springer Singapore.
- 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. *Front Microbiol*, 10, 1701. doi: 10.3389/fmicb.2019.01701
- Gallagher, L. A., & Manoil, C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol*, 183(21), 6207-6214. doi: 10.1128/JB.183.21.6207-6214.2001
- Galle, M., Schotte, P., Haegman, M., Wullaert, A., Yang, H. J., Jin, S., & Beyaert, R. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1 $\beta$  maturation. *J Cell Mol Med*, 12(5A), 1767-1776. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00190.x
- Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol*, 5(10), 2315-2321. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02076.x
- Galloway, W. R., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., & Spring, D. R. (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev*, 111(1), 28-67. doi: 10.1021/cr100109t
- Gambello, M. J., & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol*, 173(9), 3000-3009. doi: 10.1128/jb.173.9.3000-3009.1991
- Gambello, M. J., Kaye, S., & Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun*, 61(4), 1180-1184. doi: 10.1128/iai.61.4.1180-1184.1993

- Gamelli, R. L., He, L. K., & Liu, H. (1994). Marrow granulocyte-macrophage progenitor cell response to burn injury as modified by endotoxin and indomethacin. *J Trauma*, *37*(3), 339-346. doi: 10.1097/00005373-199409000-00002
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., & Schalk, I. J. (2017). Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem Biol*, *12*(4), 1056-1065. doi: 10.1021/acscchembio.6b01077
- Garcia-Contreras, R. (2016). Is Quorum Sensing Interference a Viable Alternative to Treat *Pseudomonas aeruginosa* Infections? *Front Microbiol*, *7*, 1454. doi: 10.3389/fmicb.2016.01454
- Garcia-Contreras, R., Martinez-Vazquez, M., Velazquez Guadarrama, N., Villegas Paneda, 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. *Pathog Dis*, *68*(1), 8-11. doi: 10.1111/2049-632X.12039
- Garcia-Contreras, R., Perez-Eretza, B., Jasso-Chavez, R., Lira-Silva, E., Roldan-Sanchez, J. A., Gonzalez-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. *Pathog Dis*, *73*(6), ftv040. doi: 10.1093/femspd/ftv040
- Garrity-Ryan, L., Kazmierczak, B., Kowal, R., Comolli, J., Hauser, A., & Engel, J. N. (2000). The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect Immun*, *68*(12), 7100-7113. doi: 10.1128/iai.68.12.7100-7113.2000
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2015). *Pseudomonadaceae*. 1-1. doi: 10.1002/9781118960608.fbm00232
- Garza-Gonzalez, E., Franco-Cendejas, R., Morfin-Otero, R., Echaniz-Aviles, G., Rojas-Larios, F., Bocanegra-Ibarias, P., . . . Camacho-Ortiz, A. (2020). The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico During the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microb Drug Resist*. doi: 10.1089/mdr.2019.0354
- Garza-Gonzalez, E., Morfin-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Trevino, 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), e0209865. doi: 10.1371/journal.pone.0209865
- Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., & Schalk, I. J. (2015). Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *J Inorg Biochem*, *148*, 27-34. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.01.017
- Ge, L., & Seah, S. Y. (2006). Heterologous expression, purification, and characterization of an L-ornithine N(5)-hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *188*(20), 7205-7210. doi: 10.1128/JB.00949-06
- Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattmann, M. E., & Blackwell, H. E. (2007). Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Am Chem Soc*, *129*(44), 13613-13625. doi: 10.1021/ja074135h
- Gilson, L., Kuo, A., & Dunlap, P. V. (1995). AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol*, *177*(23), 6946-6951. doi: 10.1128/jb.177.23.6946-6951.1995
- Goebel, A., Kavanagh, E., Lyons, A., Saporoschetz, I. B., Soberg, C., Lederer, J. A., . . . Rodrick, M. L. (2000). Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Ann Surg*, *231*(2), 253-261. doi: 10.1097/0000658-200002000-00015
- Gohain, N., Thomashow, L. S., Mavrodi, D. V., & Blankenfeldt, W. (2006). The purification, crystallization and preliminary structural characterization of PhzM, a phenazine-modifying methyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, *62*(Pt 9), 887-890. doi: 10.1107/S1744309106029149
- Gosain, A., & Gamelli, R. L. (2005). A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil*, *26*(1), 7-12. doi: 10.1097/01.bcr.0000150214.72984.44

- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., & Attree, I. (2004). The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun*, *72*(8), 4741-4750. doi: 10.1128/IAI.72.8.4741-4750.2004
- Guenard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., & Plesiat, P. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *58*(1), 221-228. doi: 10.1128/AAC.01252-13
- Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Remy, B., Elias, M., . . . Chabriere, E. (2017). Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. *Front Microbiol*, *8*, 227. doi: 10.3389/fmicb.2017.00227
- Guo, Y., Dickerson, C., Chrest, F. J., Adler, W. H., Munster, A. M., & Winchurch, R. A. (1990). Increased levels of circulating interleukin 6 in burn patients. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *54*(3), 361-371. doi: 10.1016/0090-1229(90)90050-z
- Gupta, P., Chhibber, S., & Harjai, K. (2015). Efficacy of purified lactonase and ciprofloxacin in preventing systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* in murine burn wound model. *Burns*, *41*(1), 153-162. doi: 10.1016/j.burns.2014.06.009
- Gutsche, J., Remminghorst, U., & Rehm, B. H. (2006). Biochemical analysis of alginate biosynthesis protein AlgX from *Pseudomonas aeruginosa*: purification of an AlgX-MucD (AlgY) protein complex. *Biochimie*, *88*(3-4), 245-251. doi: 10.1016/j.biochi.2005.06.003
- Hachler, H., Santanam, P., & Kayser, F. H. (1996). Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, aph (3')-IIb, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *40*(5), 1254-1256. doi: 10.1128/AAC.40.5.1254
- Haenni, M., Bour, M., Chatre, P., Madec, J. Y., Plesiat, P., & Jeannot, K. (2017). Resistance of Animal Strains of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenems. *Front Microbiol*, *8*, 1847. doi: 10.3389/fmicb.2017.01847
- Hainrichson, M., Yaniv, O., Cherniavsky, M., Nudelman, I., Shallom-Shezifi, D., Yaron, S., & Baasov, T. (2007). Overexpression and initial characterization of the chromosomal aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase APH(3')-IIb from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(2), 774-776. doi: 10.1128/AAC.01034-06
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*, *15*(4), 593-600. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x
- 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 (Basel)*, *8*(8). doi: 10.3390/toxins8080236
- Hancock, R. E., & Brinkman, F. S. (2002). Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*, *56*, 17-38. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160310
- Hannauer, M., Schafer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G. L., . . . Schalk, I. J. (2012). Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Lett*, *586*(1), 96-101. doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.004
- Hannauer, M., Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010). An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett*, *584*(23), 4751-4755. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.051
- Hastings, J. W., & Nealson, K. H. (1977). Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol*, *31*, 549-595. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.003001
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, *7*(9), 654-665. doi: 10.1038/nrmicro2199
- Hay, I. D., Gatland, K., Campisano, A., Jordens, J. Z., & Rehm, B. H. (2009). Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Appl Environ Microbiol*, *75*(18), 6022-6025. doi: 10.1128/AEM.01078-09



- Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Ghafoor, A., & Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 752-759. doi: 10.1002/jctb.2372
- Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rehm, B. H. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb Biotechnol*, 6(6), 637-650. doi: 10.1111/1751-7915.12076
- 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 beta-Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *J Med Chem*, 58(9), 3682-3692. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00127
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., & Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(11), 4062-4070. doi: 10.1128/AAC.00148-07
- 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(Pt 1), 87-102. doi: 10.1099/00221287-148-1-87
- Hidalgo, F., Mas, D., Rubio, M., & Garcia-Hierro, P. (2016). Infections in critically ill burn patients. *Med Intensiva*, 40(3), 179-185. doi: 10.1016/j.medin.2016.02.001
- Hoang, T. T., & Schweizer, H. P. (1999). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J Bacteriol*, 181(17), 5489-5497. doi: 10.1128/JB.181.17.5489-5497.1999
- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., . . . Plesiat, P. (2003). MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4), 1371-1375. doi: 10.1128/aac.47.4.1371-1375.2003
- Hohlneicher, U., Hartmann, R., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1992). Struktur von Ferribactin aus *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 [1] / The Structure of Ferribactin from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 [1]. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 47(11), 1633-1638. doi: 10.1515/znb-1992-1119
- Hohlneicher, U., Schafer, M., Fuchs, R., & Budzikiewicz, H. (2001). Ferribactins as the biosynthetic precursors of the *Pseudomonas* siderophores pyoverdins. *Z Naturforsch C J Biosci*, 56(3-4), 308-310. doi: 10.1515/znc-2001-3-423
- Holmquist, M. (2000). Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci*, 1(2), 209-235. doi: 10.2174/1389203003381405
- Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo-beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*, 47(2), 81-97. doi: 10.3947/ic.2015.47.2.81
- Hong, Y., & Ghebrehwet, B. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 62(2), 133-138. doi: 10.1016/0090-1229(92)90065-v
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorli, L., Luque, S., Gomez-Zorrilla, S., . . . Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev*, 32(4). doi: 10.1128/CMR.00031-19
- Horvat, R. T., & Parmely, M. J. (1988). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun*, 56(11), 2925-2932.
- Howe, T. R., & Iglewski, B. H. (1984). Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun*, 43(3), 1058-1063. doi: 10.1128/IAI.43.3.1058-1063.1984
- Hraiech, S., Hiblot, J., Lafleur, J., Lepidi, H., Papazian, L., Rolain, J. M., . . . Chabriere, E. (2014). Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLoS One*, 9(10), e107125. doi: 10.1371/journal.pone.0107125



- Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H., & Leadbetter, J. R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol*, 69(10), 5941-5949. doi: 10.1128/aem.69.10.5941-5949.2003
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2), 379-433.
- Hunter, R. C., & Newman, D. K. (2010). A putative ABC transporter, hatABCDE, is among molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 192(22), 5962-5971. doi: 10.1128/JB.01021-10
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*, 9(1). doi: 10.3390/pathogens9010006
- 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), 459-464. doi: 10.1038/s41586-019-1791-1
- Imperi, F., & Visca, P. (2013). Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: a membrane-associated "siderosome". *FEBS Lett*, 587(21), 3387-3391. doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.039
- Jacoby, G. A., Blaser, M. J., Santanam, P., Hachler, H., Kayser, F. H., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1990). Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(12), 2381-2386. doi: 10.1128/aac.34.12.2381
- Jacques, P., Ongena, M., Bernard, F., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., & Thonart, P. (2003). Fluorescent *Pseudomonas* mainly produce the dihydro form of pyoverdine at low specific growth rate. *Letts Appl Microbiol*, 36(5), 259-262. doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01304.x
- Jain, S., & Ohman, D. E. (1998). Deletion of algK in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polymer formation and results in uronic acid secretion. *J Bacteriol*, 180(3), 634-641.
- Jain, S., & Ohman, D. E. (2005). Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 73(10), 6429-6436. doi: 10.1128/IAI.73.10.6429-6436.2005
- Jander, G., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*, 182(13), 3843-3845. doi: 10.1128/jb.182.13.3843-3845.2000
- Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc*, 71(12), 4124-4126. doi: 10.1021/ja01180a073
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(4), 1159-1168. doi: 10.1007/s11274-013-1552-5
- Jia, J., Wang, Y., Zhou, L., & Jin, S. (2006). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. *Infect Immun*, 74(12), 6557-6570. doi: 10.1128/IAI.00591-06
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(1), 46-65. doi: 10.1128/MMBR.05007-11
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., . . . Stephens, S. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*, 12(6), 2477-2482. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05902.x
- Juan, C., Macia, M. D., Gutierrez, O., Vidal, C., Perez, J. L., & Oliver, A. (2005). Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11), 4733-4738. doi: 10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005
- Kaddoura, I., Abu-Sittah, G., Ibrahim, A., Karamanoukian, R., & Papazian, N. (2017). Burn injury: review of pathophysiology and therapeutic modalities in major burns. *Ann Burns Fire Disasters*, 30(2), 95-102.

- Kamath, S., Kapatral, V., & Chakrabarty, A. M. (1998). Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Mol Microbiol*, *30*(5), 933-941. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01121.x
- Karaiskos, I., Lagou, S., Pontikis, K., Rapti, V., & Poulakou, G. (2019). The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front Public Health*, *7*, 151. doi: 10.3389/fpubh.2019.00151
- Kazmierczak, B. I., & Engel, J. N. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect Immun*, *70*(4), 2198-2205. doi: 10.1128/iai.70.4.2198-2205.2002
- Keiski, C. L., Harwich, M., Jain, S., Neculai, A. M., Yip, P., Robinson, H., . . . Howell, P. L. (2010). AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure*, *18*(2), 265-273. doi: 10.1016/j.str.2009.11.015
- Khajuria, A., Praharaj, A. K., Kumar, M., & Grover, N. (2013). Emergence of NDM - 1 in the Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. *J Clin Diagn Res*, *7*(7), 1328-1331. doi: 10.7860/JCDR/2013/5509.3137
- Kharazmi, A., Hoiby, N., Doring, G., & Valerius, N. H. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* exoproteases inhibit human neutrophil chemiluminescence. *Infect Immun*, *44*(3), 587-591.
- Khosravi, A. D., Motahar, M., & Abbasi Montazeri, E. (2017). The frequency of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. *PLoS One*, *12*(8), e0183061. doi: 10.1371/journal.pone.0183061
- King, J. V., Campbell, J. J. R., & Eagles, B. A. (1948). The Mineral Requirements for Fluorescin Production. *Canadian Journal of Research*, *26c*(6), 514-519. doi: 10.1139/cjr48c-036
- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*, *36*(2), 78-91. doi: 10.1016/j.medmal.2005.10.007
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*, *182*(21), 5990-5996. doi: 10.1128/jb.182.21.5990-5996.2000
- Kownatzki, R., Tümmler, B., & Döring, G. (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *The Lancet*, *329*(8540), 1026-1027. doi: 10.1016/s0140-6736(87)92286-0
- Krall, R., Schmidt, G., Aktories, K., & Barbieri, J. T. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun*, *68*(10), 6066-6068. doi: 10.1128/iai.68.10.6066-6068.2000
- Kremer, R. J., & Souissi, T. (2001). Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Curr Microbiol*, *43*(3), 182-186. doi: 10.1007/s002840010284
- Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B. E., Jeffries, J. L., Ohman, D. E., & Lau, G. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One*, *6*(11), e27091. doi: 10.1371/journal.pone.0027091
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., . . . Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, *390*(6657), 249-256. doi: 10.1038/36786
- Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A., & Rooijackers, S. H. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol*, *188*(1), 386-393. doi: 10.4049/jimmunol.1102162
- LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 6, Unit 6E 1. doi: 10.1002/9780471729259.mc06e01s25
- Lam, J. S., Taylor, V. L., Islam, S. T., Hao, Y., & Kocincova, D. (2011). Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol*, *2*, 118. doi: 10.3389/fmicb.2011.00118
- Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, *95* Suppl 41, 22-26.

- Lankford, C. E., & Byers, B. R. (2008). Bacterial Assimilation of iron. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 2(3), 273-331. doi: 10.3109/10408417309108388
- Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Quale, J., & Landman, D. (2015). Activity of Meropenem Combined with RPX7009, a Novel beta-Lactamase Inhibitor, against Gram-Negative Clinical Isolates in New York City. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4856-4860. doi: 10.1128/AAC.00843-15
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(1), 73-111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*, 10(12), 599-606. doi: 10.1016/j.molmed.2004.10.002
- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J., & Mavrodi, D. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*, 72(7), 4275-4278. doi: 10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M., & Murgier, M. (1990). Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 72(2-3), 147-156. doi: 10.1016/0300-9084(90)90140-c
- Leadbetter, J. R., & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol*, 182(24), 6921-6926. doi: 10.1128/jb.182.24.6921-6926.2000
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6(1), 26-41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x
- Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T., & Lee, J. K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 68(8), 3919-3924. doi: 10.1128/aem.68.8.3919-3924.2002
- Lee, V. T., Smith, R. S., Tummeler, B., & Lory, S. (2005). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun*, 73(3), 1695-1705. doi: 10.1128/IAI.73.3.1695-1705.2005
- Lehoux, D. E., Sanschagrin, F., & Levesque, R. C. (2000). Genomics of the 35-kb pvd locus and analysis of novel pvdIJK genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 190(1), 141-146. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09276.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-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol*, 175(11), 7512-7518. doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7512
- Lenney, W., & Gilchrist, F. J. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* and cyanide production. *Eur Respir J*, 37(3), 482-483. doi: 10.1183/09031936.00122810
- Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*, 302(2), 63-68. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.10.001
- Li, J., Ramezanzpour, M., Fong, S. A., Cooksley, C., Murphy, J., Suzuki, M., . . . Vreugde, S. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Exoprotein-Induced Barrier Disruption Correlates With Elastase Activity and Marks Chronic Rhinosinusitis Severity. *Front Cell Infect Microbiol*, 9, 38. doi: 10.3389/fcimb.2019.00038
- Li, L., Dai, J. X., Xu, L., Chen, Z. H., Li, X. Y., Liu, M., . . . Chen, X. D. (2018). Antimicrobial resistance and pathogen distribution in hospitalized burn patients: A multicenter study in Southeast China. *Medicine (Baltimore)*, 97(34), e11977. doi: 10.1097/MD.00000000000011977
- Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69(12), 1555-1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Poole, K. (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(9), 1948-1953. doi: 10.1128/aac.39.9.1948

- Lim, L. M., Ly, N., Anderson, D., Yang, J. C., Macander, L., Jarkowski, A., 3rd, . . . Tsuji, B. T. (2010). Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy*, *30*(12), 1279-1291. doi: 10.1592/phco.30.12.1279
- Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol*, *47*(3), 849-860. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x
- Liu, D., Lepore, B. W., Petsko, G. A., Thomas, P. W., Stone, E. M., Fast, W., & Ringe, D. (2005). Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(33), 11882-11887. doi: 10.1073/pnas.0505255102
- Loarca, D., Diaz, D., Quezada, H., Guzman-Ortiz, A. L., Rebollar-Ruiz, A., Presas, A. M. F., . . . Garcia-Contreras, R. (2019). Seeding Public Goods Is Essential for Maintaining Cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, *10*, 2322. doi: 10.3389/fmicb.2019.02322
- Lopez-Jacome, E., Franco-Cendejas, R., Quezada, H., Morales-Espinosa, R., Castillo-Juarez, I., Gonzalez-Pedrajo, B., . . . Garcia-Contreras, R. (2019). The race between drug introduction and appearance of microbial resistance. Current balance and alternative approaches. *Curr Opin Pharmacol*, *48*, 48-56. doi: 10.1016/j.coph.2019.04.016
- Lopez-Jacome, L. E., Chavez-Heres, T., Becerra-Lobato, N., Garcia-Hernandez, M. L., Vanegas-Rodriguez, E. S., Colin-Castro, C. A., . . . Franco-Cendejas, R. (2019). Microbiology and infection profile of electric burned patients in a referral burn hospital in Mexico City. *J Burn Care Res*. doi: 10.1093/jbcr/irz177
- Lynn, A. R., & Sokatch, J. R. (1984). Incorporation of isotope from specifically labeled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol*, *158*(3), 1161-1162.
- Lynn, W. A., & Golenbock, D. T. (1992). Lipopolysaccharide antagonists. *Immunology Today*, *13*(7), 271-276. doi: 10.1016/0167-5699(92)90009-v
- Llanes, C., Kohler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C., & Plesiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, *55*(12), 5676-5684. doi: 10.1128/AAC.00101-11
- Macfarlane, E. L., Kwasnicka, A., Ochs, M. M., & Hancock, R. E. (1999). PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol*, *34*(2), 305-316. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01600.x
- Maeda, T., Garcia-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L. R., Tomas, M., & Wood, T. K. (2012). Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISMEJ*, *6*(3), 493-501. doi: 10.1038/ismej.2011.122
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (1999). Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. *Cell*, *96*(1), 47-56. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80958-7
- Maier, R. M., & Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, *54*(5), 625-633. doi: 10.1007/s002530000443
- Malladi, V. L., Sobczak, A. J., Maricic, N., Murugapiran, S. K., Schneper, L., Makemson, J., . . . Wnuk, S. F. (2011). Substituted lactam and cyclic azahemiacetals modulate *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Bioorg Med Chem*, *19*(18), 5500-5506. doi: 10.1016/j.bmc.2011.07.044
- Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, *148*(Pt 4), 1119-1127. doi: 10.1099/00221287-148-4-1119
- Manson, W. L., Klasen, H. J., Sauer, E. W., & Olieman, A. (1992). Selective intestinal decontamination for prevention of wound colonization in severely burned patients: a retrospective analysis. *Burns*, *18*(2), 98-102. doi: 10.1016/0305-4179(92)90002-c

- Manson, W. L., Pernot, P. C. J., Fidler, V., Sauer, E. W., & Klasen, H. J. (1992). Colonization of burns and the duration of hospital stay of severely burned patients. *Journal of Hospital Infection*, 22(1), 55-63. doi: 10.1016/0195-6701(92)90130-e
- Martin, M., Showalter, R., & Silverman, M. (1989). Identification of a locus controlling expression of luminescence genes in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol*, 171(5), 2406-2414. doi: 10.1128/jb.171.5.2406-2414.1989
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprMefflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(12), 3322-3327. doi: 10.1128/aac.44.12.3322-3327.2000
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., & Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 183(21), 6454-6465. doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001
- May, T. B., Shinabarger, D., Boyd, A., & Chakrabarty, A. M. (1994). Identification of amino acid residues involved in the activity of phosphomannose isomerase-guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 269(7), 4872-4877.
- McCarthy, M. W. (2019). Teixobactin: a novel anti-infective agent. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 17(1), 1-3. doi: 10.1080/14787210.2019.1550357
- McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K., & Yahr, T. L. (2002). ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol*, 46(4), 1123-1133. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03228.x
- McClure, C. D., & Schiller, N. L. (1996). Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. *Curr Microbiol*, 33(2), 109-117. doi: 10.1007/s002849900084
- McInnis, C. E., & Blackwell, H. E. (2011). Thiolactone modulators of quorum sensing revealed through library design and screening. *Bioorg Med Chem*, 19(16), 4820-4828. doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.071
- McMorrán, B. J., Kumara, H., Sullivan, K., & Lamont, I. L. (2001). Involvement of a transferrinase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 147(Pt 6), 1517-1524. doi: 10.1099/00221287-147-6-1517
- McMorrán, B. J., Merriman, M. E., Rombel, I. T., & Lamont, I. L. (1996). Characterisation of the *pvdE* gene which is required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 176(1-2), 55-59. doi: 10.1016/0378-1119(96)00209-0
- Mei, G. Y., Yan, X. X., Turak, A., Luo, Z. Q., & Zhang, L. Q. (2010). AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Appl Environ Microbiol*, 76(15), 4933-4942. doi: 10.1128/AEM.00477-10
- Meneely, K. M., Barr, E. W., Bollinger, J. M., Jr., & Lamb, A. L. (2009). Kinetic mechanism of ornithine hydroxylase (PvdA) from *Pseudomonas aeruginosa*: substrate triggering of O<sub>2</sub> addition but not flavin reduction. *Biochemistry*, 48(20), 4371-4376. doi: 10.1021/bi900442z
- Merriman, T. R., Merriman, M. E., & Lamont, I. L. (1995). Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: PvdD has similarity to peptide synthetases. *J Bacteriol*, 177(1), 252-258. doi: 10.1128/jb.177.1.252-258.1995
- Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, 174(3), 135-142. doi: 10.1007/s002030000188
- Meyer, J. M., & Abdallah, M. A. (1978). The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology*, 107(2), 319-328. doi: 10.1099/00221287-107-2-319
- Meyer, J. M., Azelvandre, P., & Georges, C. (1992). Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Biofactors*, 4(1), 23-27.

- Meyer, J. M., Hohnadel, D., Khan, A., & Cornelis, P. (1990). Pyoverdinin-facilitated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: immunological characterization of the ferripyoverdinin receptor. *Mol Microbiol*, 4(8), 1401-1405. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00719.x
- Meyer, J. M., & Hornsperger, J. M. (1978). Role of Pyoverdinin Pf, the Iron-binding Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in Iron Transport. *Journal of General Microbiology*, 107(2), 329-331. doi: 10.1099/00221287-107-2-329
- Miao, E. A., Ernst, R. K., Dors, M., Mao, D. P., & Aderem, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2562-2567. doi: 10.1073/pnas.0712183105
- Micek, S. T., Lloyd, A. E., Ritchie, D. J., Reichley, R. M., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(4), 1306-1311. doi: 10.1128/AAC.49.4.1306-1311.2005
- Miyayama, Y., Kaneko, Y., Yanagihara, K., Morohoshi, T., Morinaga, Y., Nakamura, S., . . . Kohno, S. (2013). Efficacy of AiiM, an N-acylhomoserine lactonase, against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model of acute pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(8), 3653-3658. doi: 10.1128/AAC.00456-13
- Miller, A. K., Brannon, M. K., Stevens, L., Johansen, H. K., Selgrade, S. E., Miller, S. I., . . . Moskowitz, S. M. (2011). PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(12), 5761-5769. doi: 10.1128/AAC.05391-11
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55, 165-199. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4), 727-737. doi: 10.1128/AAC.43.4.727
- Mion, S., Remy, B., Plener, L., Bregeon, F., Chabriere, E., & Daude, D. (2019). Quorum Quenching Lactonase Strengthens Bacteriophage and Antibiotic Arsenal Against *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Front Microbiol*, 10, 2049. doi: 10.3389/fmicb.2019.02049
- Miranda, G., Kelly, C., Solorzano, F., Leanos, B., Coria, R., & Patterson, J. E. (1996). Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 34(12), 3138-3141. doi: 10.1128/JCM.34.12.3138-3141.1996
- Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C., & Holder, I. A. (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun*, 38(3), 1296-1298.
- Moradali, M. F., Donati, I., Sims, I. M., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2015). Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 6(3), e00453-00415. doi: 10.1128/mBio.00453-15
- Morales, E., Gonzalez-Valdez, A., Servin-Gonzalez, L., & Soberon-Chavez, G. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: the case of strain 148, a virulent dolphin isolate. *FEMS Microbiol Lett*, 364(12). doi: 10.1093/femsle/fnx119
- Morihara, K., Tsuzuki, H., & Oda, K. (1979). Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor. *Infect Immun*, 24(1), 188-193.
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., & Ikeda, T. (2008). Identification and characterization of N-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella sp.* strain MIB015. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72(7), 1887-1893. doi: 10.1271/bbb.80139
- Morohoshi, T., Someya, N., & Ikeda, T. (2009). Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(9), 2124-2127. doi: 10.1271/bbb.90283
- Morohoshi, T., Wang, W. Z., Someya, N., & Ikeda, T. (2011). Genome sequence of *Microbacterium testaceum* StLB037, an N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium isolated from potato leaves. *J Bacteriol*, 193(8), 2072-2073. doi: 10.1128/JB.00180-11

- Mossialos, D., Meyer, J. M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Koedam, N., Baysse, C., . . . Cornelis, P. (2000). Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl Environ Microbiol*, *66*(2), 487-492. doi: 10.1128/aem.66.2.487-492.2000
- Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J. P., Koedam, N., . . . Cornelis, P. (2002). Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol*, *45*(6), 1673-1685. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03120.x
- Mukherji, R., Varshney, N. K., Panigrahi, P., Suresh, C. G., & Prabhune, A. (2014). A new role for penicillin acylases: degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme Microb Technol*, *56*, 1-7. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.12.010
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, *4*(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Muntean, D., Horhat, F. G., Baditoiu, L., Dumitrascu, V., Bagiu, I. C., Horhat, D. I., . . . Licker, M. (2018). Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli: A Retrospective Study of Trends in a Tertiary Healthcare Unit. *Medicina (Kaunas)*, *54*(6). doi: 10.3390/medicina54060092
- Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Reis, C. R., Muntendam, R., Raj, H., Jeronimus-Stratingh, C. M., . . . Quax, W. J. (2014). PvdP is a tyrosinase that drives maturation of the pyoverdine chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *196*(14), 2681-2690. doi: 10.1128/JB.01376-13
- NCBI. (2020). Taxonomy Browser. 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=2033>
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, *43*(4), 496-518.
- Nestorovich, E. M., Sugawara, E., Nikaido, H., & Bezrukov, S. M. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J Biol Chem*, *281*(24), 16230-16237. doi: 10.1074/jbc.M600650200
- Newman, J. W., Floyd, R. V., & Fothergill, J. L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol Lett*, *364*(15). doi: 10.1093/femsle/fnx124
- Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet*, *43*, 197-222. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134304
- Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J., & Saier, M. H., Jr. (2000). Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol*, *2*(2), 125-144.
- Nguyen, P. D. T., Mustapha, N. A., Kadokami, K., Garcia-Contreras, R., Wood, T. K., & Maeda, T. (2019). Quorum sensing between Gram-negative bacteria responsible for methane production in a complex waste sewage sludge consortium. *Appl Microbiol Biotechnol*, *103*(3), 1485-1495. doi: 10.1007/s00253-018-9553-9
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, *264*(5157), 382-388. doi: 10.1126/science.8153625
- Nikaido, H., Nikaido, K., & Harayama, S. (1991). Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, *266*(2), 770-779.
- Nikokar, I., Tishayar, A., Flakiyan, Z., Alijani, K., Rehana-Banisaeed, S., Hossinpour, M., . . . Araghian, A. (2013). Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iran J Microbiol*, *5*(1), 36-41.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *287*(1), L94-103. doi: 10.1152/ajplung.00025.2004
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations (pp. 1-20). Review on Antimicrobial Resistance: Her Majesty's Government.

- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations (pp. 1-84). Review on Antimicrobial Resistance: Her Majesty's Government.
- Ochsner, U. A., & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(14), 6424-6428. doi: 10.1073/pnas.92.14.6424
- Odumosu, B. T., Adeniyi, B. A., & Chandra, R. (2013). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, *12*, 29. doi: 10.1186/1476-0711-12-29
- Ogunnariwo, J., & Hamilton-Miller, J. M. (1975). Brown- and red-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*: differentiation between melanin and pyorubrin. *J Med Microbiol*, *8*(1), 199-203. doi: 10.1099/00222615-8-1-199
- Ohman, D. E., Cryz, S. J., & Iglewski, B. H. (1980). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol*, *142*(3), 836-842. doi: 10.1128/JB.142.3.836-842.1980
- Okamoto, K., Gotoh, N., & Nishino, T. (2002). Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *46*(8), 2696-2699. doi: 10.1128/aac.46.8.2696-2699.2002
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prevost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2016). The BioFilm Ring Test: a Rapid Method for Routine Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Kinetics. *J Clin Microbiol*, *54*(3), 657-661. doi: 10.1128/JCM.02938-15
- Olvera, C., Goldberg, J. B., Sanchez, R., & Soberon-Chavez, G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, *179*(1), 85-90. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08712.x
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., . . . et al. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, *5*(3), 197-211. doi: 10.1093/protein/5.3.197
- Orgad, O., Oren, Y., Walker, S. L., & Herzberg, M. (2011). The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling*, *27*(7), 787-798. doi: 10.1080/08927014.2011.603145
- Osawa, R., & Singh, N. (2009). Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care*, *13*(3), R68. doi: 10.1186/cc7875
- Owusu-Anim, D., & Kwon, D. H. (2012). Differential Role of Two-Component Regulatory Systems (*phoPQ* and *pmrAB*) in Polymyxin B Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microbiol*, *2*(1). doi: 10.4236/aim.2012.21005
- Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01210
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*, *37*(1), 177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *14*(9), 576-588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89
- Park, S. Y., Kang, H. O., Jang, H. S., Lee, J. K., Koo, B. T., & Yum, D. Y. (2005). Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol*, *71*(5), 2632-2641. doi: 10.1128/AEM.71.5.2632-2641.2005
- Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*, *13*(1), 27-33. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.007
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr., & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(8), 4360-4365. doi: 10.1073/pnas.96.8.4360
- Parsons, J. F., Greenhagen, B. T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., & Ladner, J. E. (2007). Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, *46*(7), 1821-1828. doi: 10.1021/bi6024403



- Parsot, C., Hamiaux, C., & Page, A. L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol*, 6(1), 7-14. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00002-4
- Passador, L., Tucker, K. D., Guertin, K. R., Journet, M. P., Kende, A. S., & Iglewski, B. H. (1996). Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. *J Bacteriol*, 178(20), 5995-6000. doi: 10.1128/jb.178.20.5995-6000.1996
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., & Attree, I. (2005). PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett*, 253(1), 95-101. doi: 10.1016/j.femsle.2005.09.028
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 657-686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Pavlovskis, O. R., & Wretling, B. (1979). Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection. *Infect Immun*, 24(1), 181-187.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1), 197-201. doi: 10.1073/pnas.91.1.197
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5), 1490-1494. doi: 10.1073/pnas.92.5.1490
- Pederson, K. J., & Barbieri, J. T. (1998). Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, 30(4), 751-759. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01106.x
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M. H., & Velazquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect Genet Evol*, 57, 106-116. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.026
- Perdu, C., Huber, P., Bouillot, S., Blocker, A., Elsen, S., Attree, I., & Faudry, E. (2015). ExsB is required for correct assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion apparatus in the bacterial membrane and full virulence in vivo. *Infect Immun*, 83(5), 1789-1798. doi: 10.1128/IAI.00048-15
- Pier, G. B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*, 297(5), 277-295. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.012
- Pirii, L. E., Friedrich, A. W., Rossen, J. W. A., Vogels, W., Beerthuis, G., Nieuwenhuis, M. K., . . . Bathoorn, E. (2018). Extensive colonization with carbapenemase-producing microorganisms in Romanian burn patients: infectious consequences from the Colectiv fire disaster. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 37(1), 175-183. doi: 10.1007/s10096-017-3118-1
- Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, 61(17), 2200-2223. doi: 10.1007/s00018-004-4060-9
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2), 479-487. doi: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., . . . Nishino, T. (1996). Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 21(4), 713-724. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.281397.x
- Poole, K., Heinrichs, D. E., & Neshat, S. (1993). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol*, 10(3), 529-544. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00925.x
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., & Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol*, 175(22), 7363-7372. doi: 10.1128/jb.175.22.7363-7372.1993

- Poole, K., Neshat, S., & Heinrichs, D. (1991). Pyoverdine-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol Lett*, 78(1), 1-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04406.x
- Priya, S. (2018). Why is QUORUM SENSING among bacteria important? , from <http://www.talismanian.com/why-quorum-sensing-among-bacterias-are-important/>
- ProtParam, E. (2020). ExpASy ProtParam. from <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?A0A0F2C5I2@noft@>
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberon-Chavez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol*, 40(3), 708-718. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13(6), 151-171. doi: 10.1016/j.drup.2010.08.003
- Ramsey, D. M., & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol*, 56(2), 309-322. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W. J., Ekmann, K. S., Larsen, J. L., . . . Gram, L. (2004). An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by Vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol*, 27(3), 350-359. doi: 10.1078/0723-2020-00268
- Ratjen, F., Brockhaus, F., & Angyalosi, G. (2009). Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a review. *J Cyst Fibros*, 8(6), 361-369. doi: 10.1016/j.jcf.2009.08.004
- Ravel, J., & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends in Microbiology*, 11(5), 195-200. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00076-3
- Rawat, D., & Nair, D. (2010). Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*, 2(3), 263-274. doi: 10.4103/0974-777X.68531
- Rehm, B. H., Boheim, G., Tommassen, J., & Winkler, U. K. (1994). Overexpression of algE in *Escherichia coli*: subcellular localization, purification, and ion channel properties. *J Bacteriol*, 176(18), 5639-5647. doi: 10.1128/jb.176.18.5639-5647.1994
- Rehm, B. H., Grabert, E., Hein, J., & Winkler, U. K. (1994). Antibody response of rabbits and cystic fibrosis patients to an alginate-specific outer membrane protein of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog*, 16(1), 43-51. doi: 10.1006/mpat.1994.1004
- Reichelt, J. L., & Borowitzka, M. A. (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. *Hydrobiologia*, 116-117(1), 158-168. doi: 10.1007/bf00027657
- Reimer, A., Edvaller, B., & Johansson, B. (2000). Concentrations of the *Pseudomonas aeruginosa* toxin pyocyanin in human ear secretions. *Acta Otolaryngol Suppl*, 543, 86-88. doi: 10.1080/000164800454062
- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., . . . Haas, D. (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 148(Pt 4), 923-932. doi: 10.1099/00221287-148-4-923
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. (2006a). Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett*, 580(16), 3883-3888. doi: 10.1016/j.febslet.2006.05.077
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. (2006b). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 72(1), 298-305. doi: 10.1128/AEM.72.1.298-305.2006
- Renau Escrig, A. I., Salavert, M., Vivo, C., Canton, E., Perez Del Caz, M. D., & Peman, J. (2016). Candidemia in major burns patients. *Mycoses*, 59(6), 391-398. doi: 10.1111/myc.12488
- Rietsch, A., & Mekalanos, J. J. (2006). Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 59(3), 807-820. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04990.x

- Riley, L. M., Weadge, J. T., Baker, P., Robinson, H., Codee, J. D., Tipton, P. A., . . . Howell, P. L. (2013). Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX: role of AlgX in alginate acetylation. *J Biol Chem*, 288(31), 22299-22314. doi: 10.1074/jbc.M113.484931
- Ringel, M. T., & Bruser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microb Cell*, 5(10), 424-437. doi: 10.15698/mic2018.10.649
- Ringel, M. T., Drager, G., & Bruser, T. (2018). PvdO is required for the oxidation of dihydropyoverdine as the last step of fluorophore formation in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 293(7), 2330-2341. doi: 10.1074/jbc.RA117.000121
- Robles-Price, A., Wong, T. Y., Sletta, H., Valla, S., & Schiller, N. L. (2004). AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 186(21), 7369-7377. doi: 10.1128/JB.186.21.7369-7377.2004
- Rocchetta, H. L., Burrows, L. L., & Lam, J. S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(3), 523-553.
- Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A., & Olson, J. C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun*, 71(9), 5296-5305. doi: 10.1128/iai.71.9.5296-5305.2003
- Romero, M., Diggle, S. P., Heeb, S., Camara, M., & Otero, A. (2008). Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett*, 280(1), 73-80. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01046.x
- Rosales, S. P. d. L. (2019). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana México 2018. Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antimicrobianos. Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roy, D., Liston, D. R., Idone, V. J., Di, A., Nelson, D. J., Pujol, C., . . . Andrews, N. W. (2004). A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science*, 304(5676), 1515-1518. doi: 10.1126/science.1098371
- Roychoudhury, S., May, T. B., Gill, J. F., Singh, S. K., Feingold, D. S., & Chakrabarty, A. M. (1989). Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase. A key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 264(16), 9380-9385.
- Ryall, B., Davies, J. C., Wilson, R., Shoemark, A., & Williams, H. D. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *Eur Respir J*, 32(3), 740-747. doi: 10.1183/09031936.00159607
- 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(1). doi: 10.1128/AAC.01856-17
- Saito, K., Yoneyama, H., & Nakae, T. (1999). *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol Lett*, 179(1), 67-72. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08709.x
- Salkowski, A. A., & Penney, D. G. (1994). Cyanide poisoning in animals and humans: a review. *Vet Hum Toxicol*, 36(5), 455-466.
- Sanderson, K., Wescombe, L., Kirov, S. M., Champion, A., & Reid, D. W. (2008). Bacterial cyanogenesis occurs in the cystic fibrosis lung. *Eur Respir J*, 32(2), 329-333. doi: 10.1183/09031936.00152407
- Saulnier, J. M., Curtil, F. M., Duclos, M.-C., & Wallach, J. M. (1989). Elastolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 995(3), 285-290. doi: 10.1016/0167-4838(89)90048-4
- Schalk, I. J., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2002). A new mechanism for membrane iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Soc Trans*, 30(4), 702-705. doi: 10.1042/bst0300702
- Schroth, M. N., Cho, J. J., Green, S. K., Kominos, S. D., & Microbiology Society, P. (2018). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. *J Med Microbiol*, 67(8), 1191-1201. doi: 10.1099/jmm.0.000758

- Schurr, M. J., Martin, D. W., Mudd, M. H., Hibler, N. S., Boucher, J. C., & Deretic, V. (1993). The algD promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell Mol Biol Res*, 39(4), 371-376.
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2006). A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*, 296(2-3), 73-81. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.036
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics*, 8, 287. doi: 10.1186/1471-2164-8-287
- 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. *J Bacteriol*, 185(7), 2066-2079. doi: 10.1128/jb.185.7.2066-2079.2003
- Shafikhani, S. H., & Engel, J. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(42), 15605-15610. doi: 10.1073/pnas.0605949103
- Shafikhani, S. H., Morales, C., & Engel, J. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell Microbiol*, 10(4), 994-1007. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01102.x
- Sharma, B. R. (2007). Infection in patients with severe burns: causes and prevention thereof. *Infect Dis Clin North Am*, 21(3), 745-759, ix. doi: 10.1016/j.idc.2007.06.003
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Jr., Rinehart, K. L., & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6036-6041. doi: 10.1073/pnas.94.12.6036
- Shen, D. K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D., . . . Polack, B. (2008). Orf 1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci*, 21(2), 103-109. doi: 10.1016/S0895-3988(08)60014-8
- Shepherd, R. W., & Lindow, S. E. (2009). Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol*, 75(1), 45-53. doi: 10.1128/AEM.01723-08
- Sheridan, R., Weber, J., Chang, P., Schulz, J., Goverman, J., Friedstat, J., . . . Pasternack, M. (2018). Multi-drug resistant gram negative bacteria colonization and infection in burned children: Lessons learned from a 20-year experience. *Burns Open*, 2(1), 43-46. doi: 10.1016/j.burnso.2017.09.002
- Sheridan, R. L., Schulz, J. T., Weber, J. M., Ryan, C. M., Pasternack, M. S., & Tompkins, R. G. (2000). Cutaneous herpetic infections complicating burns. *Burns*, 26(7), 621-624. doi: 10.1016/s0305-4179(00)00025-5
- Shinabarger, D., Berry, A., May, T. B., Rothmel, R., Fialho, A., & Chakrabarty, A. M. (1991). Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 266(4), 2080-2088.
- Simanski, M., Babucke, S., Eberl, L., & Harder, J. (2012). Paraoxonase 2 acts as a quorum sensing-quenching factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 132(9), 2296-2299. doi: 10.1038/jid.2012.128
- SINAVE, D. (2018). Boletín Epidemiológico. . In D. G. d. Epidemiología (Ed.). Dirección General de Epidemiología: Secretaria de Salud.
- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., . . . Quax, W. J. (2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun*, 74(3), 1673-1682. doi: 10.1128/IAI.74.3.1673-1682.2006
- Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*, 6(1), 56-60. doi: 10.1016/s1369-5274(03)00008-0
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F., & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(6), 718-725. doi: 10.1007/s00253-005-0150-3

- Sobouti, B., Momeni, M., Masalegooyan, N., Ansari, I., & Rahbar, H. (2018). Herpes simplex virus infection in minor burn injury: a case report. *Int J Burns Trauma*, 8(6), 149-152. doi: 30697453
- Sonderholm, M., Kragh, K. N., Koren, K., Jakobsen, T. H., Darch, S. E., Alhede, M., . . . Bjarnsholt, T. (2017). Pseudomonas aeruginosa Aggregate Formation in an Alginate Bead Model System Exhibits In Vivo-Like Characteristics. *Appl Environ Microbiol*, 83(9). doi: 10.1128/AEM.00113-17
- Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yanez, M., Merino, E., Castillo-Juarez, I., Cortes-Lopez, H., Gonzalez-Pedrajo, B., . . . Soberon-Chavez, G. (2019). Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhlR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology (Reading)*, 165(4), 425-432. doi: 10.1099/mic.0.000778
- Srikumar, R., Paul, C. J., & Poole, K. (2000). Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182(5), 1410-1414. doi: 10.1128/jb.182.5.1410-1414.2000
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., . . . Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964. doi: 10.1038/35023079
- Struck, M. F., & Gille, J. (2013). Fungal infections in burns: a comprehensive review. *Ann Burns Fire Disasters*, 26(3), 147-153.
- Strudwick, X. L., & Cowin, A. J. (2018). The Role of the Inflammatory Response in Burn Injury. doi: 10.5772/intechopen.71330
- Subedi, D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (2018). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom*, 101(2), 162-171. doi: 10.1111/cxo.12621
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*, 453(2), 254-267. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090
- Sundin, C., Thelaus, J., Broms, J. E., & Forsberg, A. (2004). Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. *Microb Pathog*, 37(6), 313-322. doi: 10.1016/j.micpath.2004.10.005
- Sutterwala, F. S., Mijares, L. A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B. I., & Flavell, R. A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med*, 204(13), 3235-3245. doi: 10.1084/jem.20071239
- Suzuki, S. M., Stevens, R. C., Richter, R. J., Cole, T. B., Park, S., Otto, T. C., . . . Furlong, C. E. (2010). Engineering human PON1 in an *E. coli* expression system. *Adv Exp Med Biol*, 660, 37-45. doi: 10.1007/978-1-60761-350-3\_5
- Tacconelli, E. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics (pp. 1-7). World Health Organization: World Health Organization.
- Tatnell, P. J., Russell, N. J., & Gacesa, P. (1994). GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. *Microbiology*, 140 ( Pt 7), 1745-1754. doi: 10.1099/13500872-140-7-1745
- Tavares, I. M., Leitao, J. H., Fialho, A. M., & Sa-Correia, I. (1999). Pattern of changes in the activity of enzymes of GDP-D-mannuronic acid synthesis and in the level of transcription of algA, algC and algD genes accompanying the loss and emergence of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*, 150(2), 105-116. doi: 10.1016/s0923-2508(99)80028-x
- Taxonomy, N. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomy. 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=287>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33(9), 2233-2239. doi: 10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995
- Thibodeau, P. H., & Butterworth, M. B. (2013). Proteases, cystic fibrosis and the epithelial sodium channel (ENaC). *Cell Tissue Res*, 351(2), 309-323. doi: 10.1007/s00441-012-1439-z

- Thomas, J., Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Acharya, K., Shinge, D., Seelan, T. S., . . . Chandrasekaran, N. (2014). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *116*, 372-377. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.019
- Tian, Z. X., Yi, X. X., Cho, A., O'Gara, F., & Wang, Y. P. (2016). CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical *nalB*-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*, *12*(10), e1005932. doi: 10.1371/journal.ppat.1005932
- Tinh, N. T., Linh, N. D., Wood, T. K., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *J Appl Microbiol*, *103*(1), 194-203. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03217.x
- Toh, B. E., Paterson, D. L., Kamolvit, W., Zowawi, H., Kvaskoff, D., Sidjabat, H., . . . Huber, C. A. (2015). Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*, *118*, 128-132. doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.006
- Totter, J. R., & Moseley, F. T. (1953). Influence of the concentration of iron on the production of fluorescein by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *65*(1), 45-47.
- Tran, N. K., Wisner, D. H., Albertson, T. E., Cohen, S., Greenhalgh, D., Palmieri, T. L., . . . Kost, G. J. (2012). Multiplex polymerase chain reaction pathogen detection in patients with suspected septicemia after trauma, emergency, and burn surgery. *Surgery*, *151*(3), 456-463. doi: 10.1016/j.surg.2011.07.030
- Tremblay, J., Richardson, A. P., Lepine, F., & Deziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol*, *9*(10), 2622-2630. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01396.x
- Turan, N. B., & Engin, G. Ö. (2018). Quorum Quenching. *81*, 117-149. doi: 10.1016/bs.coac.2018.02.003
- Ugolotti, E., Marco, E. D., Bandettini, R., Tripodi, G., & Biassoni, R. (2016). The whole genome sequencing of *Acinetobacter-calcoaceticus-baumannii* complex strains involved in suspected outbreak in an Intensive Care Unit of a pediatric hospital. *Journal of Hospital Administration*, *5*(6). doi: 10.5430/jha.v5n6p81
- Uroz, S., Chhabra, S. R., Camara, 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*(Pt 10), 3313-3322. doi: 10.1099/mic.0.27961-0
- Uroz, S., Oger, P., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P., & Dessaux, Y. (2007). N-acyl homoserine lactones are degraded via an amidolytic activity in *Comamonas sp.* strain D1. *Arch Microbiol*, *187*(3), 249-256. doi: 10.1007/s00203-006-0186-5
- Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W., & Whyte, M. K. (2002). Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol*, *168*(4), 1861-1868. doi: 10.4049/jimmunol.168.4.1861
- van der Plas, M. J., Bhongir, R. K., Kjellstrom, S., Siller, H., Kasetty, G., Morgelin, M., & Schmidtchen, A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. *Nat Commun*, *7*, 11567. doi: 10.1038/ncomms11567
- Vance, R. E., Rietsch, A., & Mekalanos, J. J. (2005). Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *in vivo*. *Infect Immun*, *73*(3), 1706-1713. doi: 10.1128/IAI.73.3.1706-1713.2005
- Vandenende, C. S., Vlasschaert, M., & Seah, S. Y. (2004). Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, *186*(17), 5596-5602. doi: 10.1128/JB.186.17.5596-5602.2004
- Ventre, I., Ledgham, F., Prima, V., Lazdunski, A., Foglino, M., & Sturgis, J. N. (2003). Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using GFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol*, *48*(1), 187-198. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03422.x

- Villalon, P., Ortega, M., Saez-Nieto, J. A., Carrasco, G., Medina-Pascual, M. J., Garrido, N., & Valdezate, S. (2019). Dynamics of a Sporadic Nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* Complex Population. *Front Microbiol*, *10*, 593. doi: 10.3389/fmicb.2019.00593
- Visca, P., Ciervo, A., & Orsi, N. (1994). Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdinin biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *176*(4), 1128-1140. doi: 10.1128/jb.176.4.1128-1140.1994
- Visca, P., Serino, L., & Orsi, N. (1992). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants blocked in the synthesis of pyoverdinin. *J Bacteriol*, *174*(17), 5727-5731. doi: 10.1128/jb.174.17.5727-5731.1992
- von Bodman, S. B., Willey, J. M., & Diggle, S. P. (2008). Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol*, *190*(13), 4377-4391. doi: 10.1128/JB.00486-08
- Wahjudi, M., Papaioannou, E., Hendrawati, O., van Assen, A. H. G., van Merkerk, R., Cool, R. H., . . . Quax, W. J. (2011). PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiology*, *157*(Pt 7), 2042-2055. doi: 10.1099/mic.0.043935-0
- Wang, W. Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N., & Ikeda, T. (2010). AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. *Appl Environ Microbiol*, *76*(8), 2524-2530. doi: 10.1128/AEM.02738-09
- Wang, Y., Beekman, J., Hew, J., Jackson, S., Issler-Fisher, A. C., Parungao, R., . . . Maitz, P. K. M. (2018). Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev*, *123*, 3-17. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.018
- Way, J. L. (1984). Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *24*, 451-481. doi: 10.1146/annurev.pa.24.040184.002315
- Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P., & Benziman, M. (1997). c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett*, *416*(2), 207-211. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01202-7
- Weissman, C. (1990). The metabolic response to stress: an overview and update. *Anesthesiology*, *73*(2), 308-327. doi: 10.1097/00000542-199008000-00020
- Welte, W., Nestel, U., Wacker, T., & Diederichs, K. (1995). Structure and function of the porin channel. *Kidney Int*, *48*(4), 930-940. doi: 10.1038/ki.1995.374
- Whiteley, M., & Greenberg, E. P. (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol*, *183*(19), 5529-5534. doi: 10.1128/JB.183.19.5529-5534.2001
- Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(24), 13904-13909. doi: 10.1073/pnas.96.24.13904
- Whitney, J. C., Colvin, K. M., Marmont, L. S., Robinson, H., Parsek, M. R., & Howell, P. L. (2012). Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, *287*(28), 23582-23593. doi: 10.1074/jbc.M112.375378
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res*, *44*(D1), D646-653. doi: 10.1093/nar/gkv1227
- Wittgens, A., Kovacic, F., Muller, M. M., Gerlitzki, M., Santiago-Schubel, B., Hofmann, D., . . . Rosenau, F. (2017). Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl Microbiol Biotechnol*, *101*(7), 2865-2878. doi: 10.1007/s00253-016-8041-3
- Wolter, D. J., Hanson, N. D., & Lister, P. D. (2004). Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett*, *236*(1), 137-143. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.039
- Wolter, D. J., & Lister, P. D. (2013). Mechanisms of beta-lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Pharm Des*, *19*(2), 209-222.



- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., . . . Doring, G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas infections* of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*, *109*(3), 317-325. doi: 10.1172/JCI13870
- Wright, G. (2015). Antibiotics: An irresistible newcomer. *Nature*, *517*(7535), 442-444. doi: 10.1038/nature14193
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*, *57*(10), 1451-1470. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002
- Xiang, D. F., Kolb, P., Fedorov, A. A., Meier, M. M., Fedorov, L. V., Nguyen, T. T., . . . Raushel, F. M. (2009). Functional annotation and three-dimensional structure of Dr0930 from *Deinococcus radiodurans*, a close relative of phosphotriesterase in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, *48*(10), 2237-2247. doi: 10.1021/bi802274f
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., & Achong, M. K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, *101*(2), 311-320. doi: 10.1172/JCI1368
- Yahr, T. L., Goranson, J., & Frank, D. W. (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol*, *22*(5), 991-1003. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.01554.x
- Yan, J. J., Hsueh, P. R., Lu, J. J., Chang, F. Y., Ko, W. C., & Wu, J. J. (2006). Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother*, *58*(3), 530-536. doi: 10.1093/jac/dkl266
- Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, *38*(5), 1447-1459. doi: 10.1007/s00726-009-0358-0
- Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010). An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*, *2*(3), 412-418. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x
- Yilmaz, C., & Ozcengiz, G. (2017). Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochem Pharmacol*, *133*, 43-62. doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.005
- Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., & Nation, R. L. (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, *60*(6), 1206-1215. doi: 10.1093/jac/dkm357
- 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*, *79*(3), 271-289. doi: 10.1007/s40265-019-1055-2
- Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagace-Wiens, P. R., . . . Karlowsky, J. A. (2013). Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination. *Drugs*, *73*(2), 159-177. doi: 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), 1427-1442. doi: 10.1007/s11802-019-4073-5
- Zielinski, N. A., Chakrabarty, A. M., & Berry, A. (1991). Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encoding phosphomannomutase. *J Biol Chem*, *266*(15), 9754-9763.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., . . . Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol*, *68*(5), 2198-2208. doi: 10.1128/aem.68.5.2198-2208.2002
- Zlosnik, J. E., Tavankar, G. R., Bundy, J. G., Mossialos, D., O'Toole, R., & Williams, H. D. (2006). Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *152*(Pt 5), 1407-1415. doi: 10.1099/mic.0.28396-0



- Zlosnik, J. E., & Williams, H. D. (2004). Methods for assaying cyanide in bacterial culture supernatant. *Lett Appl Microbiol*, 38(5), 360-365. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01489.x
- Zong, Y., Fang, F., Meyer, K. J., Wang, L., Ni, Z., Gao, H., . . . Rao, Y. (2019). Gram-scale total synthesis of teixobactin promoting binding mode study and discovery of more potent antibiotics. *Nat Commun*, 10(1), 3268. doi: 10.1038/s41467-019-11211-y
- Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J. S., & Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 74(6), 3134-3147. doi: 10.1128/IAI.01772-05