



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Efecto de la inhibición del *quorum sensing* de
Pseudomonas aeruginosa PA01 sobre su sensibilidad
a antibióticos”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

KAREN DAMAHESI CRUZ PAVÓN

DIRECTOR DE TESIS:

BIOL. ERICK JOSÉ LÓPEZ ARREDONDO



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2021



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.

“Lo que en un principio movió a los hombres a hacer las primeras indagaciones filosóficas fue, como lo es hoy, la admiración. Entre los objetos que admiraban y de que no podían darse razón, se aplicaron primero a los que estaban a su alcance; después, avanzando paso a paso, quisieron explicar los más grandes fenómenos; por ejemplo, las diversas fases de la Luna, el curso del Sol y los astros, y, por último, la formación del universo. Ir en busca de una explicación y admirarse, es reconocer que se ignora”

Aristóteles.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de ser universitaria, y de tener una educación de alta calidad. Por abrirme las puertas del CCH Azcapotzalco y posteriormente de la FES Iztacala. Por permitirme conocer a personas maravillosas que cambiaron mi vida y por regalarme las mejores experiencias, por ahora.

A mi director de tesis, Erick, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y de confiar en mí. Por resolver todas las dudas que tenía, y por nuestras pláticas nerds en el laboratorio. Gracias por ser un gran profesor y guía.

Al Dr. Salvador, por abrirme las puertas de su laboratorio desde el primer momento, por sus consejos académicos, y por siempre recordarnos la importancia de la pregunta de investigación. A mis sinodales Hugo Perales, Ramón Moreno y Llarai Gaviria. Gracias por sus correcciones y recomendaciones que hicieron para la elaboración de este trabajo.

A mis padres, por ser el mejor equipo y porque sin ustedes yo no estaría aquí. A mi mamá, María Guadalupe, por siempre apoyarme en mis decisiones, por siempre estar ahí para mí y por ser la mamá más genial que me pudo tocar. Por escucharme y aguantarme en mis peores días. Gracias por tu cariño, tu amor, tu dedicación y tu ingenio, espero algún día poder devolverte todo lo que me has dado. A mi papá, Genaro, por ser el mejor papá del mundo. Por quererme mucho, por cuidar de mí, por tu esfuerzo y por ser el mejor acompañante de camino a casa saliendo de la escuela. Gracias por ser uno de los pilares más importantes en mi formación, por tus consejos y regaños. ¡Los amo! Gracias por crear la hermosa familia que somos y por todo lo que me han enseñado.

A mi hermano, Alan, por ser una gran persona a la que puedo acudir cuando tengo algún problema o duda existencial. Por ser un hermano muy chido y por ir por las tortillas, la comida no sería lo mismo sin ti. Aquí estoy para lo que necesites.

Gracias a todos aquellos que se cruzaron conmigo este arduo camino de universidad. A David, Fer y Carol por ser un gran equipo y por la invaluable amistad. A Apu, Paco y Efi por todo lo que hemos pasado, por su amistad y por recordarme que la vida no sólo se trata de estudiar. A César, por tantas cosas aprendidas y vividas. Gracias por escucharme, por todo el apoyo que me has dado estos últimos años, por tu valiosa amistad, y por ser tan tú, te quiero.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	6
1. Introducción a los antibióticos.....	6
1.1 Definición	6
1.2 Clasificación	7
2. Resistencia a antibióticos.....	9
2.1 Mecanismos de resistencia a antibióticos	10
2.2 Regulación de los mecanismos de resistencia	12
2.3 Métodos de estudio	14
3. <i>Quorum sensing</i>	16
3.1 Mecanismo del sistema quorum sensing.....	17
3.2 Clasificación de los sistemas de quorum sensing	17
3.3 Participación del QS en bacterias	18
3.4 Métodos de estudio	19
PREGUNTA.....	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Determinación de la CMI.	22
Prueba de inhibición de quorum sensing con ácido salicílico.	22
Ensayos de resistencia con inhibición del sistema QS.	23
Diseño experimental.	23
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN	33
REFERENCIAS	34

RESUMEN

Los antibióticos son medicamentos que se usan para tratar enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Su uso y descubrimiento dio paso a un creciente problema en los últimos años, la resistencia antimicrobiana. El *quorum sensing* (QS) es un proceso fisiológico bacteriano que está estrechamente relacionado con la resistencia a antibióticos. El QS regula factores de virulencia, y algunos mecanismos de resistencia como la producción de bombas efectoras de múltiples antibióticos, la formación de biopelícula, y la regulación del metabolismo central. Por ello, nos preguntamos ¿Cuál es el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia a antibióticos? El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*. Para esto, usamos ácido salicílico como inhibidor de QS, y se evaluó su eficacia con las pruebas de proteasas y swarming. Se determinó la CMI usando el método de dilución en caldo para evaluar el efecto de la inhibición de QS sobre la resistencia. Los antibióticos usados fueron: ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol.

Se obtuvo una disminución en la resistencia del 70 % en tobramicina (CMI 0.54 µg/mL), 37.5 % en ciprofloxacino (CMI 0.12 µg/mL) y 0 % en cloranfenicol (CMI 16.5 µg/mL) en *P. aeruginosa*. La solubilidad de los antibióticos usados es de 1000 mg/mL en tobramicina, 30 mg/mL en ciprofloxacino y 2.5 mg/mL en cloranfenicol. Se encontró una relación del 98 % entre la solubilidad del antibiótico y la disminución en la resistencia. Proponemos que la inhibición del QS permite la acumulación del ciprofloxacino y la tobramicina dentro de la célula favoreciendo su efecto bactericida. Se concluye que la inhibición del QS disminuye la resistencia a antibióticos con una mayor polaridad. En el antibiótico no polar, no se observó ningún cambio.

INTRODUCCIÓN

Entender la comunicación bacteriana puede ser la solución a uno de los mayores problemas que se presentan actualmente, la resistencia a antibióticos. La resistencia a antibióticos es importante debido a que reduce la efectividad de los tratamientos e incrementa la mortalidad humana por enfermedades infecciosas. Las bacterias tienen un arsenal de armas que les permite sobrevivir a concentraciones por encima de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y por lo tanto volverse resistentes a un antibiótico (Brauner *et al.*, 2016). Dentro de los mecanismos de resistencia bacteriana hay algunos que son regulados por *quorum sensing* (QS). El QS es un mecanismo de coordinación metabólica, el cual es dependiente de la densidad poblacional. Algunos mecanismos de resistencia a antibióticos regulados por QS son: el desarrollo de biopelículas (Díaz *et al.*, 2011), la expresión de bombas eefectoras de múltiples antibióticos (Maseda *et al.*, 2004) y la regulación del metabolismo central (Goo *et al.*, 2015).

Durante el tratamiento de infecciones bacterianas los antibióticos se administran en conjunto con otros medicamentos o sustancias que potencialmente interfieren con el sistema de QS. Por ejemplo, el ibuprofeno y el diclofenaco inhiben la formación de biopelículas (Rešliński *et al.*, 2015), la aspirina disminuye la producción de factores de virulencia (El-Mowafy *et al.*, 2014), e incluso algunos extractos de plantas de uso común interfieren con el QS (Vattem *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009; Koh y Tham, 2011). Por lo anterior nos preguntamos ¿Cuál es el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia bacteriana a antibióticos?

El objetivo de esta investigación es determinar el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia a antibióticos. Usaremos como modelo a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ya que su inhibición de QS por ácido salicílico ha sido ampliamente demostrada (Prithiviraj *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014). Para esto determinaremos el efecto de la inhibición del sistema QS sobre la CMI de ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol en *P. aeruginosa*. Lo que nos permitirá determinar el papel del QS sobre la resistencia a antibióticos.

MARCO TEÓRICO

1. Introducción a los antibióticos

1.1 Definición

Los antibióticos son medicamentos que se usan para tratar las enfermedades infecciosas por bacterias. El objetivo principal de la terapia con antibióticos consiste en disminuir el número de patógenos para que finalmente el sistema inmune los elimine en su totalidad (Seija y Vignoli, 2006). Un antibiótico es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento bacteriano a bajas concentraciones sin causar toxicidad en el hospedero (Singh *et al.*, 2017). Se pueden dividir según el efecto que tenga sobre la bacteria en bactericida, que matan al organismo blanco y bacteriostático, que inhiben el crecimiento (Cabrera *et al.*, 2007).

Para que el antibiótico tenga un efecto sobre la bacteria, debe pasar por un proceso llamado captación del antibiótico. Este proceso se divide en cuatro etapas: la captación de la sustancia por el patógeno, la unión de la sustancia al blanco, su acumulación en el blanco y la interacción con el objetivo (Denyer y Maillard, 2002). La actividad del antibiótico puede verse afectada en alguna de estas etapas, y por eso es importante identificarlas al momento de administrar una clase de antibiótico en un tratamiento.

La captación del antibiótico puede ser afectado por dos factores, la permeabilidad de la membrana y la naturaleza del antibiótico. La permeabilidad de la membrana está determinada por difusión facilitada y por el transporte activo (Denyer y Maillard, 2002). En la difusión facilitada las moléculas hidrófilas pequeñas (<600 Da) atraviesan la membrana por medio de porinas las cuales confieren un ambiente acuoso (Tamber *et al.*, 2006). Hay proteínas como la FhuABCD de *E. coli* que transporta activamente la albomicina al interior de la bacteria, debido a que el antibiótico es un análogo estructural de sideróforos (Braun y Braun, 2002). Por otro lado, para que el antibiótico pueda penetrar hacia la célula debe presentar características físicas como carga y anfipatía para que exista un equilibrio hidrofílico-lipofílico que permita su captación (Denyer y Maillard, 2002).

1.2 Clasificación

Se han desarrollado y encontrado antibióticos con diferentes mecanismos de acción. A continuación se presentan los grupos más importantes de antibióticos clasificados según su estructura química, se menciona su mecanismo de acción, sus principales representantes y su especificidad.

Tabla 1. Clasificación y principales características de los antibióticos (obtenido de Brock, 1961; Schwarz *et al.*, 2004; Seija y Vignoli, 2006; Etebu y Ariekpar, 2016; Singh *et al.*, 2017).

Antibiótico	Mecanismo de acción	Estructura general	Principales representantes	Especificidad	Tipo de acción en concentración fisiológica
β-lactámicos	Se unen a las proteínas de unión a la penicilina (PBP). Inhiben la síntesis de la pared celular.	Se componen de un sistema de anillos bicíclicos, uno de estos anillos es betalactámico (compuesto de 3 carbonos y 1 nitrógeno muy reactivo).	Penicilina, cefalosporina, carbapenem y monobactámicos	Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas. No tienen acción sobre micoplasmas por carecer de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como <i>Chlamydia</i> y <i>Rickettsia</i> .	Bactericida lenta.
Glicopéptidos	Forman un complejo con el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina del Lípido II, pentapéptido precursor del peptidoglicano. Alteran la síntesis de ARN. Inhiben la síntesis de la pared celular.	Se conforman por un péptido cíclico de 7 aminoácidos, a los que se unen 2 azúcares.	Vancomicina y teicoplanina.	Gram positivas.	Bactericida.
Lipopéptido	Se inserta en la membrana celular causando despolarización y la formación de agujeros.	Están formados por lípidos unidos a un péptido.	Daptomicina	De amplio espectro sobre bacterias Gram positivas.	Bactericida.

Aminoglucósidos	Se unen a la subunidad 30S del ribosoma. Interfieren con la síntesis proteica de la bacteria.	Presentan dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol.	Estreptomicina, kanamicina, gentamicina, neomicina, tobramicina.	Son de amplio espectro, actúan sobre Gram positivas y Gram negativas. No tienen acción sobre bacterias anaerobias.	Bactericida.
Tetraciclinas	Se unen a la subunidad 30S del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas.	Se caracterizan por tener cuatro anillos de hidrocarburos.	Tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, limeciclina, demeclociclina, metaciclina y tigeclina.	De amplio espectro en bacterias Gram negativas y Gram positivas.	Bacteriostática y bactericida en dosis altas.
Macrólidos	Se unen a la subunidad 50S ribosomal inhibiendo la síntesis de proteínas.	Se caracterizan por tener anillos de lactosa macrocíclica de 14, 15 o 16 carbonos con azúcares desoxidantes inusuales (L-cladinoso y D-desosamina) unidos.	Eritromicina, claritromicina, azitromicina y espiramicina.	De amplio espectro en bacterias Gram positivas y Gram negativas.	Bacteriostática y en ocasiones bactericida.
Oxazolidinonas	Se une a la subunidad 50S ribosomal inhibiendo la síntesis de proteínas.	Son antibióticos sintéticos que se caracterizan por tener anillos de 2-oxazolidona.	Linezolid.	De amplio espectro sobre bacterias Gram positivas.	Bacteriostática y bactericida.
Quinolonas	Inhiben la ADN girasa, enzima encargada del superenrollamiento del ADN cromosómico, causando rupturas de doble cadena.	Derivan de una molécula básica formada por un anillo doble que contiene un residuo N en la posición 1.	Ácido nalidíxico, ácido pipemídico, norfloxacin, ciprofloxacino, levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina.	Tienen actividad sobre Gram positivas, Gram negativas, enterobacterias y bacterias anaerobias.	Bactericida.

Cloranfenicol	Se une a la subunidad 50S ribosomal inhibiendo la síntesis de proteínas.	Se caracteriza por tener una cadena lateral de propano con un grupo p-nitrofenilo (en C-1), un N-dicloroacetilo (en C-2) unido a un 1,3-propanodiol con dos centros quirales (C-1 y C-2).	Cloranfenicol, azidamfenicol, thiamphenicol, florfenicol	De amplio espectro en bacterias Gram positivas, negativas, espiroquetas, <i>Chlamydia</i> , <i>Rickettsia</i> , micoplasmas y protozoos.	Bacteriostática.
----------------------	--	---	--	--	------------------

2. Resistencia a antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos revolucionó los tratamientos contra las infecciones. Sin embargo, trajo consigo una desventaja, el inevitable desarrollo de la resistencia a antibióticos. Por ejemplo, Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1928, y a pesar de su advertencia sobre la posibilidad de que las bacterias podrían volverse resistentes a la penicilina (Fleming, 1929), para 1940 ya se había encontrado una enzima que la destruía (Abraham y Chain, 1940). Actualmente se les denomina “superbacterias” a los patógenos que provocan altas tasas de mortalidad y morbilidad debido a múltiples mutaciones que les confieren resistencia a uno o más antibióticos (Davies y Davies, 2010). Es por esto que el estudio de la resistencia a antibióticos se ha convertido en uno de los temas más importantes en los últimos tiempos.

La manera en la que se puede comparar la resistencia de una bacteria a los antibióticos es diversa, sin embargo en la mayoría de los casos se busca encontrar la concentración letal del antibiótico. En el laboratorio, esto se logra determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI es la concentración más baja que inhibe el crecimiento de una población bacteriana cultivada (Lukačišinová y Bollenbach, 2017). Una población que puede crecer a concentraciones mayores de la CMI se considera que es resistente. Mientras que una población bacteriana que pueda sobrevivir por más tiempo a altas concentraciones de antibióticos, pero sin que cambie la CMI, se considera tolerante (Brauner *et al.*, 2016; Levin-Reisman *et al.*, 2019).

2.1 Mecanismos de resistencia a antibióticos

La resistencia bacteriana puede tener distintos orígenes. Puede ser propia y depender de la biología del microorganismo (intrínseca) o adquirida por la captación de ADN extracromosómico (extrínseca) (Cabrera *et al.*, 2007; Giedraitienė *et al.*, 2011). A continuación se resumen los mecanismos de resistencia en bacterias:

Intrínsecos

- **Mutaciones:** Las mutaciones ocurren cuando hay un error en la replicación o por una reparación incorrecta del ADN. Cuando la tasa de mutaciones en una pequeña población bacteriana aumenta se les llama hipermutadores (Giedraitienė *et al.*, 2011). Los hipermutadores pueden dar origen a bacterias con características resistentes a antibióticos. Se han encontrado hipermutadores en poblaciones de algunas enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Džidić *et al.*, 2008).
- **Modificación enzimática del antibiótico:** Las bacterias expresan enzimas que cambian la estructura original del antibiótico, y hacen que éste pierda su actividad (Tafur *et al.*, 2008). Las betalactamasas hidrolizan el anillo beta lactámico en este tipo de antibióticos. Se conocen 4 tipos de betalactamasas: penicilinasas, betalactamasas, cefalosporinasas y oxacilinasas (Cabrera *et al.*, 2007). Otro tipo de antibióticos que se ven afectados por enzimas son los aminoglucósidos. Se conocen 3 tipos de enzimas que los inactivan: las O-fosfotransferasas (OPH), O-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT) (Cabrera *et al.*, 2007; Tafur *et al.*, 2008).
- **Bombas de expulsión:** Las bombas de expulsión toman el antibiótico del espacio periplasmático y lo expulsan al exterior de la bacteria, evitando su unión al blanco (Tafur *et al.*, 2008). Las bombas de expulsión en las Gram negativas, se conforman por tres proteínas: una anclada a la membrana citoplasmática, una que atraviesa el espacio periplásmico, y la tercera en la membrana externa (Cabrera *et al.*, 2007). La mayoría de los antibióticos excepto las polimixinas son susceptibles de expulsión. MexAB-*oprM* expulsa antibióticos betalactámicos y quinolonas, MexXY-*oprM* extruye aminoglucósidos y MexEF-*oprN* extruye carbapenems y quinolonas (Lambert, 2002).

- **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** La permeabilidad de la membrana externa puede modificarse por la expresión de porinas. Los cambios en ésta pueden llevar a que no se permita el paso de moléculas al interior de la bacteria (Tafur *et al.*, 2008).
- **Alteraciones en el sitio de acción:** Las bacterias pueden modificar el sitio de acción del antibiótico, inhibiendo que éste se una al blanco y no interrumpa las funciones vitales de la bacteria (Tafur *et al.*, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* se ha vuelto resistente a las quinolonas debido a una mutación en el gen *gyrA* que codifica para la subunidad A de la ADN-girasa, sitio blanco del antibiótico (Lambert, 2002; Cabrera *et al.*, 2007).
- **Producción de biopelícula:** Las biopelículas generan un estado metabólico heterogéneo en la colonia en donde algunas pueden tener baja actividad fisiológica o latencia (Bjarnsholt *et al.*, 2005; Bouyahya *et al.*, 2017). Si las bacterias se encuentran en un estado fisiológico bajo, algunos antibióticos no pueden unirse al sitio blanco o no pueden tener un efecto óptimo sobre la inhibición bacteriana.

Extrínsecos:

- **Transducción:** ocurre cuando una bacteria obtiene ADN de otra a través de fagos (Cabrera *et al.*, 2007). Los bacteriofagos son un tipo de virus bacteriano que puede insertarse en su cromosoma (Giedraitienė *et al.*, 2011).
- **Conjugación:** cuando una bacteria transfiere plásmidos a otra a través de una hebra sexual (pili) (Cabrera *et al.*, 2007). Los plásmidos pueden codificar genéticamente para resistencia a la mayoría de los antibióticos, a metales pesados, y para factores de virulencia que permitan a la bacteria sobrevivir en ambientes con dosis letales de antibióticos (Giedraitienė *et al.*, 2011).
- **Transformación:** es la transferencia de genes de una bacteria lisada a otra que lo recibe e incorpora en su ADN (Cabrera *et al.*, 2007).

2.2 Regulación de los mecanismos de resistencia

Las bacterias pueden regular sus mecanismos de resistencia por diferentes vías y dependiendo del tipo de bacteria. Por ejemplo, la expresión de betalactamasas es regulada por dos vías, la expresión de bombas efectoras de múltiples antibióticos depende del *quorum sensing* (QS) y de la presencia de fármacos, la permeabilidad de la membrana externa de la expresión de porinas, y la producción de biopelícula se regula por tres vías generales. A continuación se presentan las diferentes vías y mecanismos de regulación en algunos mecanismos de resistencia.

Las bacterias Gram negativas pueden regular la expresión de betalactamasas por la vía AmpG–AmpR–AmpC (Zeng y Lin, 2013). En esta vía, el antibiótico betalactámico rompe el balance en la biosíntesis de peptidoglicano y se liberan oligopéptidos en el periplasma. Éstos son transportados al citoplasma por el transportador AmpG. Los oligopéptidos son los inductores de la producción de betalactamasas a través de su interacción con AmpR (Park y Uehara, 2008). AmpR es un regulador transcripcional que se une en una región del ADN río arriba del promotor AmpC (Lindquist *et al.*, 1989). En *P. aeruginosa* se ha encontrado que AmpR es un factor de transcripción global. Debido a que además de regular la expresión de betalactamasas, también regula el QS, la producción de proteasas extracelulares, piocianina (Kong *et al.*, 2005), la expresión de MexEF-OprN y la formación de biopelícula (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Las bombas expulsoras de múltiples antibióticos pueden regularse mediante diferentes factores. Por ejemplo, MexAB-OprM siempre está expresada a niveles bajos que, a diferencia de las otras bombas se caracterizan por ser estrictamente reguladas (Chuanchuen *et al.*, 2002). Se ha demostrado que algunas de ellas, como en el caso de MexXY, se expresan en mutantes que son expuestas a diferentes antibióticos (Masuda *et al.*, 2000; Askoura *et al.*, 2011). En el caso de los biocidas, los sistemas en *P. aeruginosa* MexCD-OprJ y MexJK se expresan en la presencia de triclosán (Chuanchuen *et al.*, 2001; Chuanchuen *et al.*, 2002). Además de la presencia de antibióticos biocidas, las bombas efectoras de múltiples antibióticos también se pueden regular positivamente cuando las bacterias detectan el *quorum* por medio de autoinductores, como en el caso de MexAB-OprM (Maseda *et al.*, 2004).

La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas, las cuales permiten atravesar moléculas polares hacia el interior de las bacterias Gram negativas. Se ha encontrado que un medio con alta osmolaridad, alta temperatura o con agentes tóxicos favorecen la expresión de OmpC, y que un medio con poca osmolaridad, baja temperatura incrementa a OmpF y disminuye el nivel de OmpC (Lugtenberg *et al.*, 1976; Pratt *et al.*, 1996). Cuando la membrana externa se expone a condiciones limitadas de nitrógeno y ricas en glucosa la expresión de OmpC aumenta en comparación con OmpF (Liu y Ferenci, 1998). Finalmente, se ha encontrado que la permeabilidad de la membrana externa también puede ser regulada por un sistema de dos componentes (PprA y PprB) el cual hizo más susceptible a aminoglucósidos a una cepa mutante de *P. aeruginosa* (Wang *et al.*, 2003).

La regulación de la formación de la biopelícula y los exopolisacáridos puede originarse por diferentes vías. Los polisacáridos que conforman principalmente la biopelícula son Psl, Pel y alginato, los cuales juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura y la resistencia a antibióticos de la biopelícula (Friedman y Kolter, 2003; Ma *et al.*, 2007; Wei y Ma, 2013). La vía del bis-(3'-5')-monofosfato de guanosina dimérico cíclico (c-di-GMP), un segundo mensajero intracelular, reduce la expresión de los flagelos y estimula la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos (Hengge, 2009). Los genes para pili y flagelos se reprimen en las biopelículas maduras, sin embargo están involucrados en las etapas de fijación y de formación de microcolonias del desarrollo de biopelículas (Whiteley *et al.*, 2001). El sistema QS participa en la expresión de LasI durante la etapa inicial en la formación de la biopelícula (De Kievit *et al.*, 2001), LasI regula la expresión del gen *pel* en *P. aeruginosa* (Sakuragi y Kolter, 2007). El sistema de QS RhlR/RhlI se activa durante la etapa de maduración de la biopelícula en *P. aeruginosa* (Sauer *et al.*, 2002). Por último, la señal de quinolona de *Pseudomonas* provocan la liberación de ADN extracelular por medio de los polisacáridos Pel y Psl (Yang *et al.*, 2011).

2.3 Métodos de estudio

Los métodos para el estudio de la resistencia microbiana a antibióticos pueden clasificarse en cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos permiten conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) del antibiótico. Los métodos cualitativos son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente (Taroco *et al.*, 2006).

Métodos cualitativos

Método de difusión en disco: Este método consiste en depositar discos de papel filtro impregnados con los diferentes antibióticos en la superficie de una placa de agar Müller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo a una concentración igual a la escala 0.5 de McFarlane. En cuanto el disco se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el antibiótico se difunde, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Taroco *et al.*, 2006). Posteriormente cada plato es observado en luz directa y cada halo de inhibición es medido. La interpretación del diámetro de los halos de inhibición se basa según las guías de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y el organismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico según sea el caso (Herrera, 1999).

Su ventaja es que es un método sencillo, barato, de fácil control y estandarización. Además de que el medio puede modificarse dependiendo de los requerimientos nutricionales del microorganismo a estudiar (Taroco *et al.*, 2006). Pero por ser un método cualitativo su mayor desventaja está en que no se puede determinar la CMI, además de que no se pueden determinar el número de UFC que se inoculan en la placa.

Métodos moleculares: Estas técnicas permiten la determinación de material genético en una muestra. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha adquirido un gran valor de diagnóstico actualmente. Se divide en 3 etapas: la primera consiste en la extracción del material genético, la segunda corresponde a la amplificación del material genético y en la última se lleva a cabo la detección del material genético mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo este método no permite la identificación bacteriana y se aplica en su mayoría en colonias aisladas previamente (March-Rosselló, 2017).

Métodos cuantitativos

Método de gradiente antibiótico (E-TEST): Este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En donde se puede medir y determinar directamente la CMI. Consiste en colocar una tira de plástico no poroso que incorpora un gradiente predefinido de antibiótico equivalente a 15 diluciones sobre la superficie húmeda del agar. El inóculo se prepara de la misma forma que en el método de difusión en disco. Posterior a la incubación de la placa, se observará una zona de inhibición en forma elipsoidal y simétrica. El valor de la CMI se considera en donde la elipse corta la tira, en caso de que la lectura se determine entre dos puntos, se debe escoger la concentración más alta (Taroco *et al.*, 2006). Por otro lado, si se observan colonias creciendo en la zona de inhibición podrían tratarse de pequeñas colonias resistentes (Herrera, 1999).

Es un método alternativo cuantitativo para determinar la sensibilidad antimicrobiana y tiene buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para la determinación de la CMI (Herrera, 1999; Taroco *et al.*, 2006). Por ser muy similar al método de difusión en disco, una de las desventajas de este método es que no se pueden determinar el número de UFC que se siembran en la placa.

Métodos de dilución: Estos son métodos cuantitativos que permiten la determinación de la CMI por medio de concentraciones decrecientes de un antibiótico en un inóculo bacteriano estandarizado. Al igual que en los métodos pasados, se debe controlar el medio de cultivo, el inóculo bacteriano y el antibiótico. Estos métodos se pueden dividir en: dilución en agar, dilución en tubo y microtitulación (Herrera, 1999).

En la técnica de dilución en agar, se preparan tubos con el agar a escoger, principalmente Mueller-Hinton, con una concentración definida de antibiótico. Se homogeniza y se chorrea en una placa de petri vacía. De esta forma se logra tener una placa de agar homogeneizado con antibiótico a una concentración determinada. Las concentraciones a elegir en la que inicia el gradiente dependen del antibiótico y del tipo de cepa a probar. Posteriormente en la superficie del agar se colocan 20 µL de un inóculo estandarizado. Se debe realizar una caja con agar sin antibiótico para usarla como control positivo de crecimiento. Las cajas se incuban a una determinada temperatura de 18 a 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las cajas se revisan y se compara el crecimiento bacteriano contra el control positivo. Si la cepa logra crecer en la superficie del medio se reporta como resistente a esa concentración de antibiótico, si no crece, se reporta como sensible. Sin embargo esta técnica puede ser muy compleja y lenta debido a la cantidad de medios de cultivo con antibiótico a realizar (Herrera, 1999).

Una alternativa similar a la dilución en agar, es la dilución en tubo. En esta técnica se prepara una serie de tubos estériles con caldo, a cada tubo se le añade una concentración decreciente de antibiótico y se ajustan todos a un mismo volumen. Al igual que en la técnica de dilución en agar,

se debe dejar un tubo con caldo sin antibiótico como control positivo de crecimiento. Posteriormente se agrega el mismo volumen de un inóculo estandarizado en caldo a todos los tubos. Los tubos se incuban a una determinada temperatura de 16 a 20 horas (Taroco *et al.*, 2006). La CMI se determina en el tubo en donde no se observa turbidez, lo que indica que no hubo desarrollo bacteriano. Esta técnica es denominada como “el estándar dorado de las pruebas de sensibilidad”, y es la técnica de referencia a pesar de presentar el riesgo por contaminación (Herrera, 1999).

Finalmente, la técnica de microtitulación deriva de esta última, en donde se emplea una placa plástica estéril con tapa de 96 pozos. En cada placa se puede determinar la CMI para ocho cepas diferentes, o en otro caso, la CMI de ocho antibióticos diferentes en una cepa. Para preparar las diluciones del antibiótico, se parte de una solución madre de antibiótico que se diluye en los pozos de manera decreciente. Se inoculan los pozos con el mismo volumen de un inóculo estandarizado. Al igual que en la dilución en caldo, la CMI se determina en el pozo que no presenta turbidez (Herrera, 1999).

En estos últimos métodos, además de poder determinar la CMI también se puede obtener la CBM. Para obtenerla, se debe extraer 10 μ L de los tubos en los que no se observó crecimiento y se inoculan en un nuevo medio de cultivo sin antibiótico. Posterior a la incubación, se cuentan las UFC que crecen y se comparan con las del inóculo inicial. Generalmente la CMB se encuentra en una o dos diluciones más alta que la CMI (Herrera, 1999).

3. Quorum sensing

El *quorum sensing* (QS) es un proceso de regulación genética que ocurre en las bacterias. Este mecanismo se basa en la secreción de moléculas autoinductoras que al llegar a cierta concentración debido a la densidad celular, se inicia una respuesta coordinada en la población (Díaz *et al.*, 2011; LaSarre y Federle, 2013). Por ejemplo, pueden producir biopelícula (Demain y Fang, 2000), se regula la competencia por la supervivencia (Duan *et al.*, 2009), la bioluminiscencia (Eberhard *et al.*, 1981) y regulan la captación y secreción de nutrientes (Duan *et al.*, 2009).

El QS regula factores de virulencia y algunos mecanismos de resistencia por lo que juega un papel importante en las enfermedades infecciosas. El QS regula múltiples factores de virulencia como la elastasa (*lasB*), proteasa LasA (*lasA*), proteasa alcalina (*aprA*), ramnolípidos y la exotoxina A (*toxA*) en *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 2000; Whitehead *et al.*, 2001). En el caso de la resistencia a antibióticos, el QS regula la expresión del pili tipo IV usado para la fijación al sustrato y la formación de biopelículas (Williams *et al.*, 2000; Hentzer y Givskov, 2003), y además regula la expresión de bombas efectoras de múltiples antibióticos (Antunes *et al.*, 2010). Lo anterior se ve reflejado en un decremento en el daño y la mortalidad causados por cepas

deficientes en la producción de autoinductores de *P. aeruginosa* en comparación con las cepas de vida libre (Antunes *et al.*, 2010). Por lo tanto las bacterias que expresan el sistema QS resultan ser más letales que las que no.

La inhibición del QS se ha investigado como una alternativa a los tratamientos mediados por antibióticos. Se ha desarrollado la hipótesis de que si se bloquea este tipo de comunicación bacteriana, disminuiría su grado de virulencia y su capacidad de realizar una infección exitosa, y en consecuencia serían eliminadas con mayor éxito (Hentzer y Givskov, 2003; LaSarre y Federle, 2013).

3.1 Mecanismo del sistema quorum sensing

El sistema general de QS se compone principalmente por una sintasa, un autoinductor y un receptor. Durante su crecimiento, las bacterias producen enzimas que sintetizan los autoinductores. Después de la síntesis, los autoinductores se difunden y se acumulan en el medio. Cuando el autoinductor alcanza un umbral crítico de concentración la interacción con su receptor se vuelve favorable. Se activan diferentes cascadas de transducción de señales que provocan la inducción o represión de los genes diana. Es importante mencionar que la sensación de *quorum* no es fija, y dependerá de la tasa de producción y pérdida de los autoinductores. Por lo tanto, la expresión y concentración de las moléculas autoinductoras son un reflejo de las condiciones del medio que las bacterias pueden percibir.

3.2 Clasificación de los sistemas de quorum sensing

Los sistemas de *quorum* se pueden dividir en tres categorías dependiendo del autoinductor que sintetizan las bacterias. La detección del *quorum* puede ser por medio de acil homoserin lactonas (AHL, también conocidas como AI-1), a base de péptidos y de AI-2. Se divide de esta forma, debido a que históricamente son los autoinductores más estudiados (LaSarre y Federle, 2013).

Las bacterias Gram negativas tienen sintasas de tipo LuxI que son enzimas encargadas de sintetizar las AHL. Las sintasas LuxI utilizan como sustrato S-adenosilmetionina (SAM) y una proteína acilo-transportadora acilada (acil-ACP) (Parsek *et al.*, 1999). Generalmente las AHL se componen de un anillo de homoserina lactona (HSL) unido a una cadena de acilo de hasta 18 átomos de carbono. Los miembros de la familia LuxR son los receptores de señal de las AHL y también son reguladores transcripcionales de los genes diana (LaSarre y Federle, 2013).

Por su parte, las bacterias Gram positivas no poseen homólogos del sistema LuxI-LuxR y en su lugar sintetizan oligopéptidos como moléculas señalizadoras. Los oligopéptidos se sintetizan ribosomalmente dentro de las células (Williams, 2007). Son transportados activamente debido a su impermeabilidad a la membrana y están sujetos a modificaciones como la ciclación (LaSarre y Federle, 2013). Los receptores de péptidos en Gram positivas son proteínas pertenecientes al sistema de dos componentes con un sensor de cinasa que provoca una cascada de fosforilación (Miller y Bassler, 2001; LaSarre y Federle, 2013). Una vez que se fosforila la proteína reguladora, se une al ADN y activa la transcripción de los genes diana (Miller y Bassler, 2001).

Otro tipo de autoinductor presente tanto en Gram positivas como Gram negativas es el AI-2. Se sintetiza a partir de SAM y por la acción de metiltransferasas se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH). Posteriormente la nucleosidasa Pfs elimina adenina de SAH y produce S-ribosilhomocisteína (SRH). Las sintasas de la familia LuxS son las responsables de actuar en SRH para formar AI-2 (Schauder *et al.*, 2001). La molécula resultante es la 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), sufre reordenamiento espontáneo en múltiples compuestos de furanona cíclica y, como grupo se denominan AI-2 (LaSarre y Federle, 2013).

3.3 Participación del QS en bacterias

Los sistemas de detección de *quorum* mediados por LuxI / LuxR de *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia carotovora* son los más estudiados en bacterias Gram negativas. *V. fischeri* vive en asociación simbiótica con hospederos eucariotas, y en cada uno ha desarrollado un órgano especializado que es habitado por la bacteria (Ruby y McFall-Ngai, 1992). La producción de luz por *V. fischeri* es regulada por la detección de *quorum* a una densidad celular alta (Visick y McFall-Ngai, 2000). *P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista que tiene dos pares homólogos de LuxI/LuxR, LasI/LasR (Passador *et al.*, 1993) y RhII/RhlR (Brint y Ohman, 1995), ambos sistemas se encargan de regular sus factores de virulencia. Sin embargo, se ha demostrado en *P. aeruginosa* un tercer tipo de autoinductor llamado señal de quinolona de *Pseudomonas* (o PQS), la cual es regulada por el sistema Las y Rhl (Pesci *et al.*, 1999). *A. tumefaciens* es un patógeno vegetal que induce tumores en plantas por medio del plásmido Ti (Piper *et al.*, 1993), el cual es regulado por TraI/TraR, un homólogo de Lux (Fuqua y Winans, 1994). *E. carotovora* también es una bacteria patógena de plantas, la cual produce exoenzimas por medio del sistema ExpI/ExpR que degradan la pared celular de la planta hospedera (Jones *et al.*, 1993) y produce moléculas antibióticas, por medio del sistema CarI/CarR (Bainton *et al.*, 1992).

Las bacterias más estudiadas que presentan QS mediado por péptidos pequeños son *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. *S. pneumoniae* produce el péptido estimulante de la competencia para la transformación genética (CSP) el cual contiene 17 aminoácidos (Håvarstein *et al.*, 1995). Cuando el CSP es detectado por el sensor proteína cinasa ComD, se autofosforila y activa al regulador ComE, el cual transcribe para el gen *comX*. Éste es un factor necesario para la transcripción de genes estructurales que están involucrados en la competencia (Pestova *et al.*, 1996; Lee y Morrison, 1999). En *B. subtilis* hay dos péptidos mediados por QS, el ComX y CSF (factor de competencia y esporulación). ComX es un péptido de 10 aminoácidos que al final promueve la competencia. El CSF es un pentapéptido que es reconocido intracelularmente, es transportado hacia el interior por Opp (Solomon *et al.*, 1995). Bajas concentraciones intracelulares de CSF promueven la competencia, y altas concentraciones inhiben la competencia y promueven la esporulación (Solomon *et al.*, 1996). En *S. aureus* el RNAPIII regula la patogenicidad dependiente de QS, y éste a su vez es regulado por el operón *agrBDCA* (Janzon y Arvidson, 1990; Morfeldt *et al.*, 1995). Los genes *agrB* y *agrD* están involucrados en la síntesis de un péptido autoinductivo procesado (AIP) que contiene un anillo de tiolactona necesario para la correcta señalización (Ji *et al.*, 1997; Mayville *et al.*, 1999). Mientras que *agrC* es el sensor de cinasa y *agrA* es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes (Lina *et al.*, 1998).

3.4 Métodos de estudio

Como se mencionó en el apartado anterior *P. aeruginosa* se ha utilizado ampliamente como un modelo en el estudio de la detección del QS. Principalmente porque su sistema de QS es uno de los mejor caracterizados hasta la fecha, y se sabe que regula varios mecanismos de virulencia y resistencia a antibióticos (Hentzer *et al.*, 2002; Karatuna y Yagci, 2010). El sistema LasI/LasR de *P. aeruginosa* sintetiza su AHL llamada N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) (Passador *et al.*, 1993). Este sistema regula la expresión de factores de virulencia y genes como: elastasa de *lasB*, proteasa de *lasA*, proteasa alcalina, exotoxina A, pioverdina y la formación de biopelícula (Davies *et al.*, 1998; Kievit e Iglewski, 2000; Whitehead *et al.*, 2001). Su segundo sistema de QS RhlI/RhlR sintetiza la N-butil-L-homoserina lactona (C4-HSL) (Brint y Ohman, 1995). Este complejo regula la producción de ramnolípidos, *lasB*, *aprA*, la producción de metabolitos secundarios, piocianina, proteasa alcalina, lectina y cianuro de hidrógeno (Kievit e Iglewski, 2000; Whitehead *et al.*, 2001).

El estudio del QS en *P. aeruginosa* se puede llevar a cabo por medio de la expresión de sus autoinductores y la expresión de los factores de virulencia. A continuación se mencionan algunos métodos de estudio del QS.

Ensayos de proteasas

Este tipo de ensayo es uno de los más utilizados en trabajos de inhibición de QS, debido a que las proteasas son un factor de virulencia dependiente de QS (Karatuna y Yagci, 2010). La actividad de la proteasa alcalina se mide creciendo las bacterias en medio LB, y se le añade 0.5 mL de sobrenadante a 1.5 mL de tampón de ensayo que contiene 50 mg de azul de remazol de piel. Los tubos se incuban durante 1 h, se centrifugan y se mide la absorbancia del sobrenadante a 590 nm (Prithiviraj *et al.*, 2005; Karatuna y Yagci, 2010).

También se puede tomar sobrenadante de una muestra, y se añade en placas de agar leche al 5%, se incuban durante toda la noche. Se fotografían las placas de y se miden las zonas claras con ayuda de una regla virtual (Skindersoe *et al.*, 2008). Las zonas claras indican que hubo actividad proteolítica.

Ensayo de swarming

El swarming es una forma de movilidad bacteriana dependiente de QS que ocurre en superficies semisólidas y requiere la producción de biosurfactantes, flagelo y pili tipo IV (Chow *et al.*, 2011). En esta técnica se usa un medio suplementado con MgSO_4 (1 mM), glucosa (0.2%), aminoácidos como fuente de nitrógeno (0.5%) y se solidifica con agar (0.5%). Una vez listo el agar, se inoculan las bacterias en la placa de agar con alícuotas tomadas directamente de los cultivos a estudiar. Las placas se incuban a 37 °C durante 24-48 h (Köhlner *et al.*, 2000; Caiazza *et al.*, 2005). El swarming se puede observar directamente en la placa y se puede medir la distancia recorrida con ayuda de una regla virtual.

PREGUNTA

¿Cuál es el efecto de la inhibición del sistema *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre su resistencia a ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol?

HIPÓTESIS

Si la inhibición del sistema *quorum sensing* disminuye la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos entonces al inhibir el *quorum sensing* se observará una disminución en la CMI de ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhibición del sistema *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre su resistencia a ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol.

Objetivos particulares

- Obtener las CMI de ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol sobre *P. aeruginosa*.
- Determinar el efecto inhibitorio en el sistema *quorum sensing* del ácido salicílico en *P. aeruginosa*.
- Evaluar el cambio en la CMI del ciprofloxacino, tobramicina y cloranfenicol en *P. aeruginosa*, con ácido salicílico como inhibidor del *quorum sensing*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la CMI.

La CMI se determinó por el método de dilución en caldo. Brevemente, se preparó una serie de 10 tubos con 5 mL de caldo nutritivo, los tubos tenían las concentraciones de antibiótico mostradas en la Tabla 2. Éstas fueron inoculadas con 10 μ L a una concentración de 1×10^6 UFC de un cultivo de 24 horas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los tubos se mantuvieron a 28°C durante 24 horas. La CMI se consideró como la menor concentración sin crecimiento bacteriano.

Tabla 2. Concentraciones de los antibióticos utilizadas para la determinación de la CMI en *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibióticos	[μ g / mL]									
Ciprofloxacino (CIP)	0	0.04	0.07	0.09	0.12	0.14	0.16	0.19	0.21	0.24
Tobramicina (TOB)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8
Cloranfenicol (CLO)	0	4.5	6	7.5	9	10.5	12	13.5	15	16.5

Prueba de inhibición de quorum sensing con ácido salicílico.

Para confirmar el efecto del ácido salicílico sobre la inhibición del QS se determinó la actividad proteolítica y swarming. Para esto se inoculó *P. aeruginosa* en cajas de agar con ácido salicílico (5 mM) y caseína de leche como indicador. Para la evaluación del swarming, se inoculó *P. aeruginosa* en agar al 0.5%, glucosa 0.5% y caldo nutritivo con ácido salicílico (5 mM). La inhibición del QS se confirmó por la disminución de halos de degradación proteica y del swarming.

Ensayos de resistencia con inhibición del sistema QS.

Para determinar el efecto de la inhibición del *quorum sensing* sobre la sensibilidad a antibióticos se colocaron 10 µL de los inóculos de *P. aeruginosa* a una concentración de 1×10^6 de cultivos de 24 horas en tubos de caldo nutritivo con y sin inhibidor de QS. A cada tubo se le añadió una concentración de antibiótico para llegar a las siguientes concentraciones de la CMI: 0%, 55.5%, 66.6%, 77.7%, 88.8%, 100% y 111.1%. Después de 24 horas se determinó el cambio en la CMI.

Diseño experimental.

Para determinar el efecto de la inhibición del QS se usó un diseño experimental en bloques, como se describe en el apartado de ensayos de resistencia.

Comparación entre la solubilidad del antibiótico y el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia.

Se realizó una relación entre la solubilidad del antibiótico y el cambio en la resistencia. La solubilidad de cada antibiótico se buscó bibliográficamente. Se realizó una regresión lineal para relacionar el cambio en la resistencia ocasionado por la inhibición de QS con la solubilidad de cada antibiótico en agua.

RESULTADOS

Determinación de la CMI.

Se determinaron las CMI de los antibióticos para usarlas como referencia en los ensayos de resistencia con inhibición del QS. Para tobramicina la CMI fue de 1.8 ($\mu\text{g/mL}$), para ciprofloxacino 0.192 ($\mu\text{g/mL}$) y para cloranfenicol 16.5 ($\mu\text{g/mL}$).

Prueba de inhibición de quorum sensing con ácido salicílico.

Como indicador de la inhibición del QS utilizamos la prueba de movilidad por swarming. En la Figura 1B se observa que el AS inhibió por completo la movilidad por este mecanismo en *P. aeruginosa* y la colonia permaneció en el mismo lugar. Mientras que en el grupo control (Figura 1A) recorrieron 1.892 ± 0.076 cm (Figura 2).

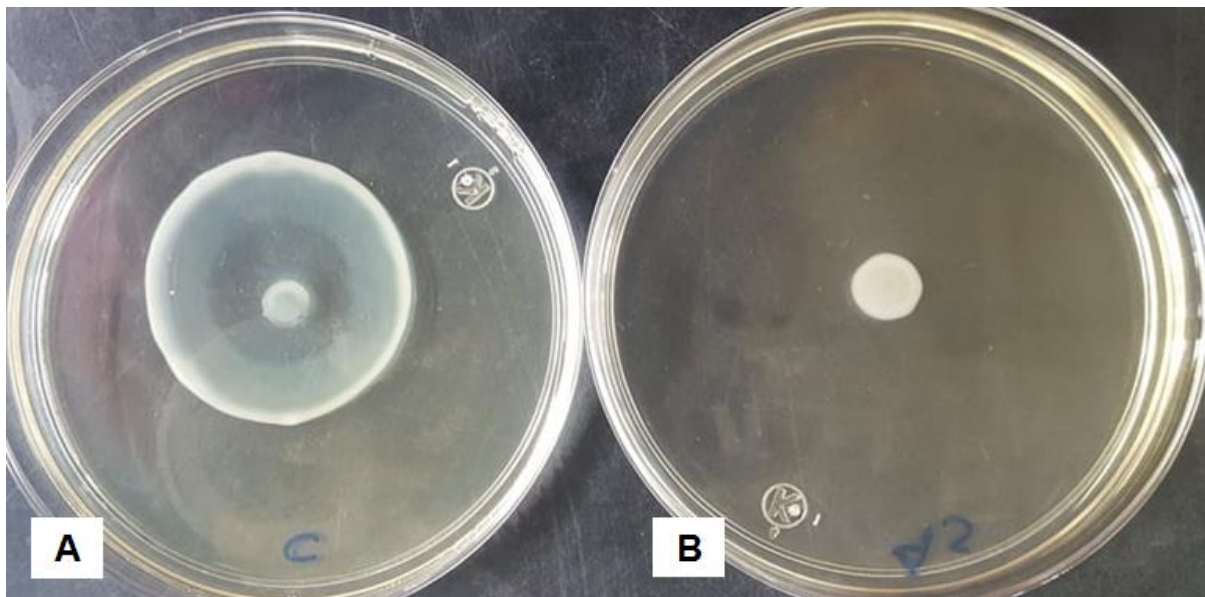


Figura 1. Efecto de la inhibición del QS con ácido salicílico en *Pseudomonas aeruginosa* sobre el swarming. **A)** Control, **B)** Tratamiento con ácido salicílico (5 mM).

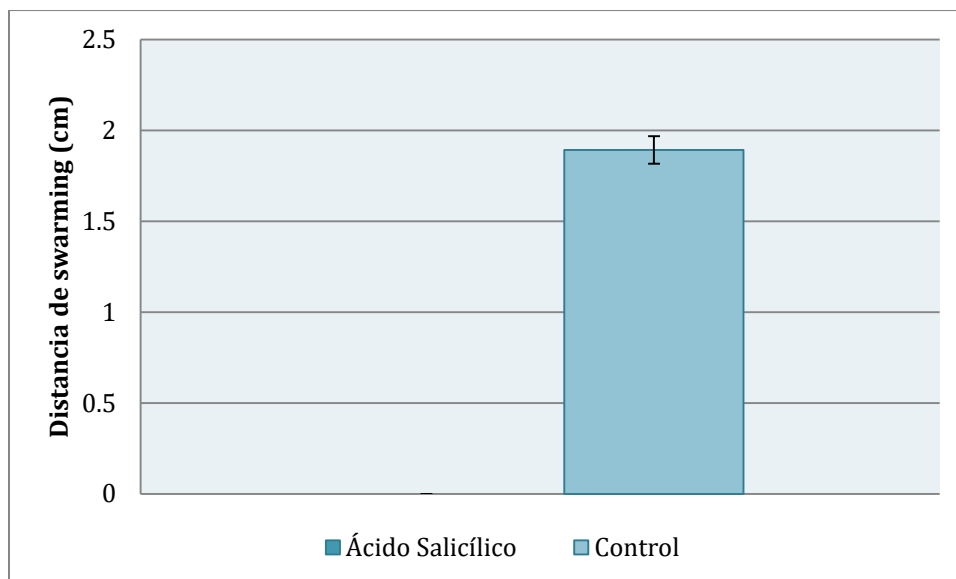


Figura 2. Efecto de la inhibición del QS con ácido salicílico en *P. aeruginosa* sobre el swarming.

En la prueba de proteólisis el ácido salicílico disminuyó 79.76 % la expresión de proteasas en *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 3). El tamaño promedio de los halos de proteólisis en el tratamiento de inhibición de QS con AS fueron de 0.073 ± 0.013 cm mientras que en el control de 0.359 ± 0.061 cm (Figura 4). El tratamiento con AS no afectó el tamaño de las colonias por lo que asumimos que su crecimiento no se vio afectado negativamente por éste, lo que descarta que el efecto sea causado por una disminución en la densidad poblacional (Figura 5).

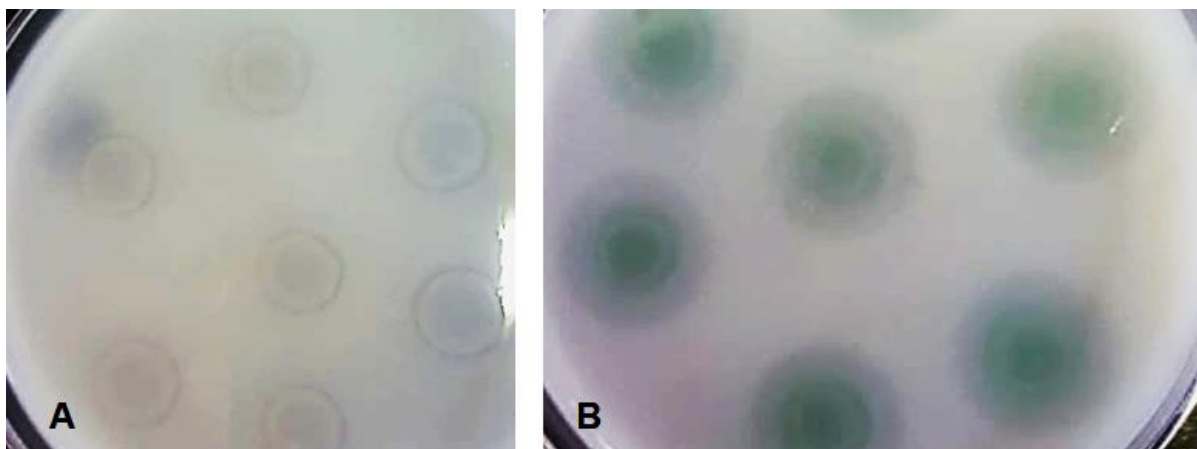


Figura 3. Efecto de la inhibición del QS con Ácido Salicílico en *Pseudomonas aeruginosa* sobre su actividad proteolítica. **A)** Tratamiento con ácido salicílico (5 mM), **B)** Control.

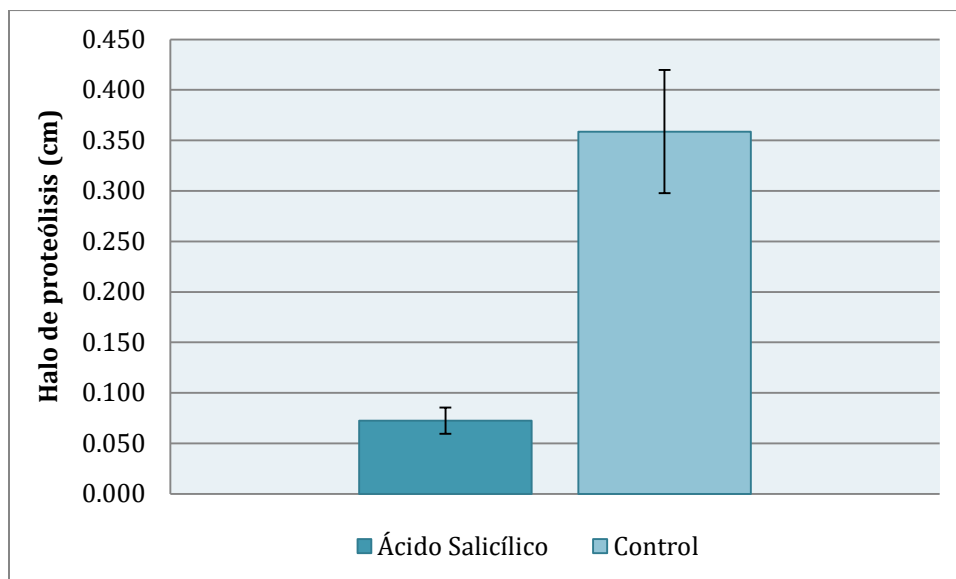


Figura 4. Efecto de la inhibición del QS con Ácido Salicílico en *P. aeruginosa* sobre la actividad de proteasas.

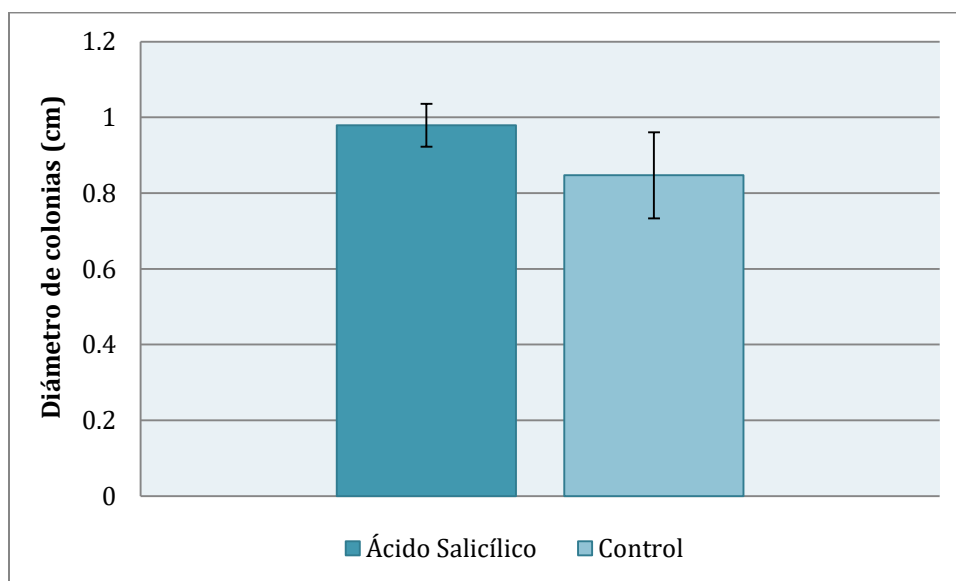


Figura 5. Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Ensayos de resistencia con inhibición del sistema QS.

En esta investigación nos preguntamos cuál es el efecto de la inhibición del QS de *Pseudomonas aeruginosa* sobre su resistencia a antibióticos.

El efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antibióticos varía dependiendo del antibiótico (Tabla 3). La inhibición de QS disminuye la resistencia a antibióticos como tobramicina y ciprofloxacino en un 70 % y 37.5 % respectivamente, mientras que no tuvo efecto sobre la resistencia al cloranfenicol (Figura 6).

Tabla 3. Efecto de la inhibición del QS sobre la CMI de diferentes antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiótico	Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)	
	Sin inhibición de QS	Con inhibición de QS
Tobramicina	1.8	0.54
Ciprofloxacino	0.192	0.12
Cloranfenicol	16.5	16.5

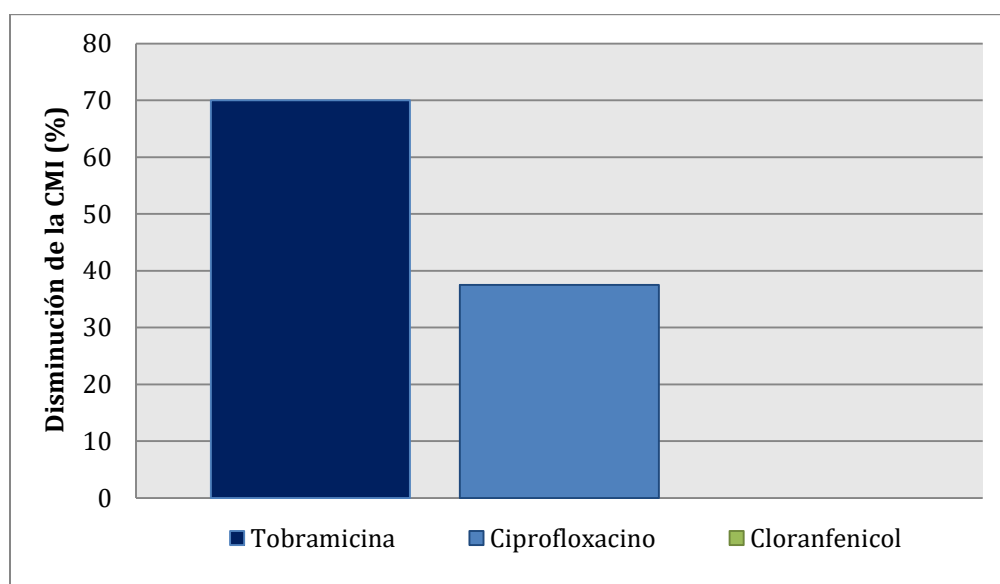


Figura 6. Efecto de la inhibición del QS sobre el cambio en la resistencia de *P. aeruginosa*.

Relación entre la solubilidad del antibiótico y el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia.

Después de evaluar el efecto de la inhibición del QS sobre el cambio en la resistencia a los antibióticos, decidimos hacer una correlación entre el cambio en la resistencia y la solubilidad del antibiótico (Figura 7). La tobramicina es el antibiótico más soluble (1000 mg/mL) (O'Neil, 2013) y se observó una disminución del 70% en la resistencia. Después sigue el ciprofloxacino con una solubilidad de 30 mg/mL (Nowara *et al.*, 1997) y una disminución en la resistencia del 37.5%. Finalmente, el cloranfenicol es el antibiótico menos soluble (2.5 mg/mL) (O'Neil, 2013) y no se registró ningún cambio en la resistencia. Con los datos expuestos en este trabajo se encontró una relación del 98% entre la solubilidad y el cambio en la resistencia.

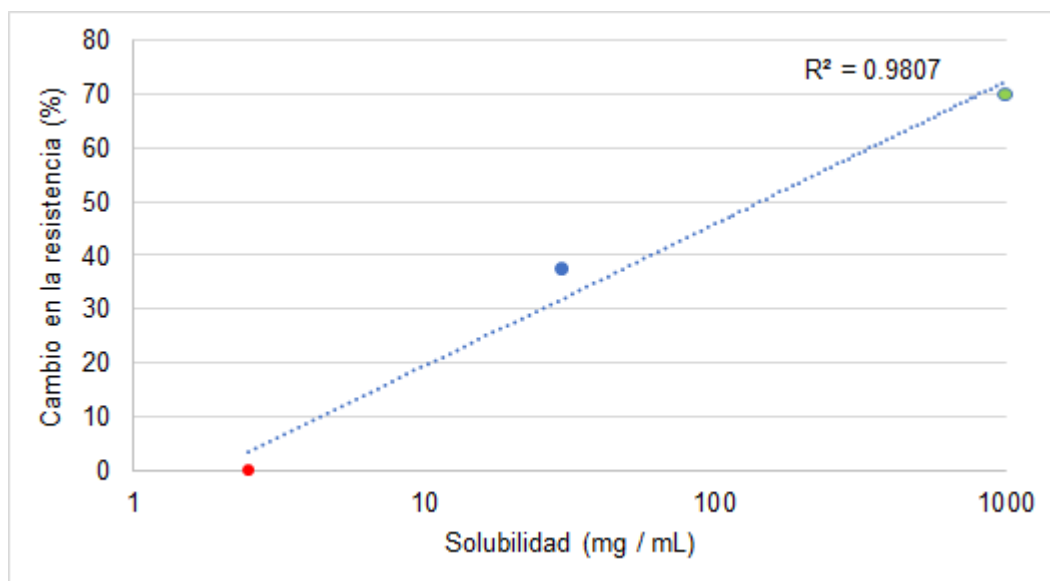


Figura 7. Efecto de la solubilidad del antibiótico sobre el cambio en la resistencia con inhibición de QS.
Rojo: Cloranfenicol, Azul: Ciprofloxacino, Verde: Tobramicina.

DISCUSIÓN

El AS es un inhibidor de QS eficaz en la disminución de la expresión de proteasas e inhibición del swarming en *P. aeruginosa* (Prithiviraj *et al.*, 2005; Chow *et al.*, 2011). En nuestros resultados, la inhibición del QS por AS disminuyó en un 79.76% la proteólisis e inhibió por completo la movilidad por swarming. Estos factores de virulencia son procesos regulados por genes relacionados al QS, como *rhIR* y *lasA* (Köhler *et al.*, 2000; Prithiviraj *et al.*, 2005). Existen otros inhibidores de QS que también han sido efectivos en la disminución de expresión de proteasas, como la Furanona C-30 (Hentzer *et al.*, 2003), el ciprofloxacino (Gupta *et al.*, 2016), y el ácido acetil salicílico (El-Mowafy *et al.*, 2014).

Encontramos que la inhibición del QS disminuye la resistencia de *P. aeruginosa* a la tobramicina (CMI de 0.54 µg/mL) y ciprofloxacino (CMI de 0.12 µg/mL) en un 70% y 37.5% respectivamente, mientras que en el grupo tratado con cloranfenicol (CMI de 16.5 µg/mL) no se observó ningún cambio. Algunos agentes inhibidores de QS han generado resultados similares a los nuestros. Estos inhibidores de QS han disminuido hasta 3 veces la resistencia a los antibióticos. Por ejemplo la furanona C-30 disminuye la resistencia a la tobramicina (Hentzer *et al.*, 2003), y de igual forma ocurre con el AS (1 mM) en donde disminuye la resistencia al ciprofloxacino en *P. aeruginosa* (Prithiviraj *et al.*, 2005).

El cambio en la resistencia a los antibióticos por inhibición de QS no se debe al mecanismo de acción del antibiótico. La TOB al igual que el CLO son antibióticos cuyo mecanismo de acción es similar, ambos se unen al ribosoma e inhiben la síntesis de proteínas (Schwarz *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2017). En los resultados se observó que la resistencia sólo disminuyó en la TOB y el CIP. Por lo que este resultado puede depender de otros factores, como la solubilidad del antibiótico y los mecanismos de resistencia dependientes de QS por parte de la bacteria.

La inhibición del QS por AS disminuye la formación de biopelícula, un mecanismo de resistencia a antibióticos (Prithiviraj *et al.*, 2005). Se ha demostrado que en biopelículas con bacterias con QS bloqueado por mutación o por administración de inhibidores de QS son más sensibles a los tratamientos con TOB y H₂O₂ (Hentzer *et al.*, 2002; Bjarnsholt *et al.*, 2005). El swarming, regulado también por QS (Köhler *et al.*, 2000), desempeña un papel importante en las primeras etapas de formación de la biopelícula (Chow *et al.*, 2011), de hecho la expresión o no del swarming determina qué tan estructurada o plana se desarrollará (Shrout *et al.*, 2006). El QS también está presente en una biopelícula más desarrollada, por ejemplo en la producción de ADN extracelular (Allesen-Holm *et al.*, 2006), en la producción de ramnolípidos (Davey *et al.*, 2003) y en el sistema RhlR/RhlI que se activa durante la etapa de maduración (Sauer *et al.*, 2002). Con base en esto, podemos inferir que la inhibición de QS con AS podría afectar en el establecimiento y desarrollo de la biopelícula en *P. aeruginosa*, y a su vez aumentar su sensibilidad a los tratamientos con antibióticos como la TOB.

Existe una relación proporcional entre la solubilidad del antibiótico y el efecto de la inhibición del QS sobre la resistencia a éste. Se observó la mayor disminución de la resistencia en la TOB (70%), proponemos que se debe a que es el antibiótico más soluble de los tres, mientras que en el CIP al ser menos soluble se observó una disminución del 37.5% en la resistencia. En el caso del CLO su solubilidad es muy baja, se clasifica como antibiótico no polar, y la resistencia de *P. aeruginosa* a este antibiótico no cambió con la inhibición del QS. Con esto podemos inferir que el QS afecta algún sistema bacteriano y que el cambio en la resistencia es dependiente de la solubilidad del antibiótico.

Los antibióticos pueden entrar a la célula dependiendo de sus características y del mecanismo de transporte presente en la bacteria. Los aminoglucósidos interactúan con el LPS de la membrana externa y promueven su propia captación por medio de canales artificiales (Taber *et al.*, 1987; Chopra y Ball, 1982). Sin embargo se ha encontrado que también pueden penetrar la membrana externa por medio de porinas (Nikaido y Pagès, 2012). Los aminoglucósidos penetran la membrana interna por transporte activo y por medio de la porina OprF (Taber *et al.*, 1987;

Hancock y Brinkman, 2002; Lambert, 2002). Algo similar sucede con las quinolonas, se ha propuesto que éstas atraviesan la membrana externa e interna a través de porinas (Diver, 1989; Bryan y Bedard, 1991) y de transporte activo (Vergalli *et al.*, 2017). El cloranfenicol al tener una naturaleza hidrofóbica puede atravesar las membranas por medio de difusión pasiva (Chopra y Ball, 1982; Schwarz *et al.*, 2004). Se ha observado que antibióticos como los aminoglucósidos y quinolonas no causan alteraciones en la membrana, y que el desorden de ésta se presenta cuando se administran concentraciones altas de antibióticos (Khondker *et al.*, 2020). Una vez que los antibióticos están dentro de la célula, ésta los puede expulsar por medio de las bombas efectoras de múltiples antibióticos, y así evitar que se unan a su sitio blanco.

La proporcionalidad entre la solubilidad del antibiótico y la disminución de la resistencia a éste por la inhibición del QS, también podría ser explicado por la inhibición de las bombas efectoras de múltiples antibióticos. Lo anterior debido a que los antibióticos no polares como el CLO pueden atravesar continuamente la membrana (Chopra y Ball, 1982) por lo que su concentración no es afectada al 100% por las bombas, como sucede con los polares como CIP y TOB. La adición de autoinductores de QS en *P. aeruginosa* aumenta la producción de bombas efectoras de múltiples antibióticos y también su resistencia a antibióticos polares como la ampicilina, metronidazol y tetraciclina (Pumbwe *et al.*, 2008). Por otro lado, la inhibición de estas bombas disminuye la resistencia al aztreonam (Maseda *et al.*, 2004) y fluoroquinolonas como el levofloxacin y ciprofloxacino, antibióticos polares (Lomovskaya *et al.*, 2001; Kriengkauykiat *et al.*, 2005) en *P. aeruginosa*. Las bombas presentes en *P. aeruginosa* están relacionadas con el QS, promueven la expulsión de los autoinductores (Evans *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 1999; Parsek y Greenberg, 2000) y éstos a su vez promueven la expresión de los genes codificantes para las bombas (Maseda *et al.*, 2004; Pumbwe *et al.*, 2008). Nosotros proponemos que esta inhibición permite la acumulación del CIP y TOB dentro de la célula y favorece su acción bactericida.

Nuestra propuesta es que la inhibición del QS ocasiona un cambio en la formación de biopelícula y en la expresión de las bombas efectoras de múltiples antibióticos, permitiendo más la acumulación de los antibióticos polares que del no polar. Para poder obtener mayor información sobre este proceso, se necesitan estudios moleculares en donde se estudie la expresión de las bombas efectoras de múltiples antibióticos, la acumulación del antibiótico en la célula con QS inactivo, en donde se estudie más la interacción del AS en la célula, y se usen antibióticos con polaridades diferentes. No obstante nuestra propuesta es válida por que las bacterias con inhibición del QS disminuyeron su CMI en antibióticos polares a diferencia de las que crecieron sin inhibición. El cloranfenicol era el único antibiótico no polar y fue el único en el que no se observó disminución de la CMI. Sabemos que el mecanismo de acción no podría explicar el cambio en la resistencia, porque tanto la TOB como el CLO se unen al mismo blanco, sin embargo se observan resultados diferentes. Por último, sabemos que la presencia del AS no tuvo un efecto negativo en el crecimiento de las bacterias por que crecieron igual que en el control.

Usar la inhibición del QS y los antibióticos como un tratamiento sinérgico podría ser una solución para el problema de la resistencia bacteriana. Podríamos aplicar este conocimiento en tratamientos con antibióticos polares y evitarlo con antibióticos no polares. Sin embargo, sería interesante seguir buscando si persiste la relación entre la polaridad del antibiótico y la resistencia, según el método propuesto en este trabajo con diferentes tratamientos. Todavía quedan ciertas dudas, como ¿qué tipo de respuesta se obtendrá de antibióticos con otras características? ¿Se obtendrá el mismo efecto en los mismos antibióticos pero con un inhibidor de QS diferente? o ¿qué tanto se acumulan los antibióticos en bacterias con inhibición de QS?

CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la inhibición del sistema *quorum sensing* ocasiona una disminución de la resistencia en antibióticos polares en *Pseudomonas aeruginosa*. Usar la inhibición del QS y los antibióticos como un tratamiento sinérgico podría ser una solución para el problema de la resistencia bacteriana. Antibióticos polares como el ciprofloxacino y la tobramicina mostraron una disminución del 37.5 y 70 % respectivamente. Esta disminución de la resistencia se debe a la solubilidad de los antibióticos, contrario a lo que se observó con el cloranfenicol, en el que la CMI no cambió por ser un antibiótico no polar. El ácido salicílico resultó ser un buen inhibidor de QS, sin embargo se recomienda hacer nuevos experimentos con otros inhibidores y nuevos antibióticos para evaluar si esta relación de solubilidad-disminución de la resistencia cambia o es similar. Finalmente, la disminución de la resistencia también se le atribuye a una disminución en la expresión de las bombas efectoras de múltiples antibióticos y en la formación de biopelícula debido a la inhibición del QS.

REFERENCIAS

- Abraham, E. & Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146: 837.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular microbiology*, 59 (4): 1114-1128.
- Antunes, L. C., Ferreira, B. R., Buckner, M. M., & Finlay, B. B. 2010. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 156: 2271-2282.
- Askoura, M., Mattawa, W., Abujamel, T. & Taher, I. 2011. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan Journal of Medicine*, 6 (1): 1-8.
- Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B. & Williams, P. 1992. *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochemical Journal*, 288 (3): 997-1004.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Merighi, M., Smith, R., Narasimhan, G., Lory, S. & Mathee, K. 2012. The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. *PLOS ONE*, 7(3): 1-22.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P., Burmølle, M., Hentzer, M., Haagensen, J., Hougen, H., Calum, H., Madsen, K., Moser, C., Molin, S., Høiby, N. & Givskov, M. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, 151: 373-383.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J. & Bakri, Y. 2017. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10 (8): 729-743.
- Braun, V. & Braun, M. (2002). Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 194–201.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (5): 320.

- Brint, J. M. & Ohman, D. 1995. Synthesis of Multiple Exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* Is under the Control of RhlR-RhlI, Another Set of Regulators in Strain PAO1 with Homology to the Autoinducer-Responsive LuxR-LuxI Family. *Journal of Bacteriology*, 177 (24): 7155-7163.
- Brock, T. D. 1961. Chloramphenicol. *Bacteriological Reviews*, 25 (1): 32.
- Bryan, L. E. & Bedard, J. 1991. Impermeability to quinolones in Gram-Positive bacteria and Gram-Negative bacteria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 10 (4): 232-239.
- Cabrera, C., Gómez, R. & Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38 (2): 149-158.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q. & O'Toole, G. A. 2005. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187 (21): 7351-7361.
- Chang, C-Y., Krishnan, T., Wang, H., Chen, Y., Yin, W-F., Chong, Y-M., Tan, L. Y., Chong, T. M., & Chan, K. G. 2014. Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target. *Nature Scientific Reports*, 4: 1-8.
- Chopra, I. & Ball, P. 1982. Transport of Antibiotics into Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 23: 183-240.
- Chow, S., Gu, K., Jiang, L. & Nassour A. 2011. Salicylic Acid Affects Swimming, Twitching and Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in Decreased Biofilm Formation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 15: 22-29.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. 2001. Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (2): 428-432.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. & Schweizer, H. P. 2002. The MexJK Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprM for Antibiotic Efflux but Not for Efflux of Triclosan. *Journal of Bacteriology*, 184 (18): 5036-5044.

- Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 185 (3): 1027-1036.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, 280 (5361): 295-298.
- Davies, J. & Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3): 417-433.
- Díaz, A., Vivas, R., Puerta, L., Ahumado, M., Arévalo, L., Cabrales, R. & Herrera, A. 2011. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. *Avances en Periodoncia*, 23 (3): 195-201.
- Diver, J. M. 1989. Quinolone Uptake by Bacteria and Bacterial Killing. *Clinical Infectious Diseases*, 11 (5): 941-946.
- De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., e Iglewski, B. H. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4): 1865-1873.
- Demain, A. L. & Fang, A. 2000. The Natural Functions of Secondary Metabolites. En: Fiechter A. (Eds.) *History of Modern Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (pp. 1-39) Vol 69. Berlin, Alemania: Springer.
- Denyer, S. & Maillard, J. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92: 35-45.
- Duan, K., Sibley, C. D., Davidson, C. J. & Surette, M. G. 2009. Chemical interactions between organisms in microbial communities. *Contributions to Microbiology*, 16: 1-17.
- Džidić, S., Šušković, J. & Kos, B. 2008. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology & Biotechnology*, 46 (1): 11-21.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. & Oppenheimer, N. J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20 (9): 2444-2449.

- El-Mowafy, S. A., El Galil, K. H. A., El-Messery, S. M. & Shaaban, M. I. 2014. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 74: 25-32.
- Etebu, E. & Ariekpar, I. 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4: 90-101.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. & Poole, K. 1998. Influence of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 180 (20): 5443-5447.
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of Experimental Pathology*, 10: 226-236.
- Friedman, L. & Kolter, R. 2003. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51 (3): 675-690.
- Fuqua, W. C. & Winans, S. C. 1994. A LuxR-LuxI Type Regulatory System Activates Agrobacterium Ti Plasmid Conjugal Transfer in the Presence of a Plant Tumor Metabolite. *Journal of Bacteriology*, 176 (10): 2796-2806.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. & Pavilonis, A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kauas)*, 47 (3): 137-146.
- Gupta, P., Chhibber, S. & Harjai, K. 2016. Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian Journal of Medical Research*, 143 (5): 643-651.
- Goo, E., An, J., Kang, Y. & Hwang, I. 2015. Control of bacterial metabolism by quorum sensing. *Trends in Microbiology*, 23 (9): 567-576.
- Hancock, R. E., & Brinkman, F. S. L. 2002. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology*, 56 (1): 17-38.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D. A. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (24): 11140-11144.

- Hengge, R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews*, 7: 263–273.
- Hentzer, M. & Givskov, M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112 (9): 1300-1307.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J., Riedel, K., Rasmussen, T., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, K., Costerton, J., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby, N. & Givskov, M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, 22 (15): 3803-3815.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T., Heydorn, A., Andersen, J., Parsek, M., Rice, S., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S. & Givskov, M. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148: 87-102.
- Herrera, M. L. 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saénz Herrera*, 34: 33-41.
- Janzon, L., & Arvidson, S. 1990. The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal*, 9 (5): 1391-1399.
- Ji, G., Beavis, R., & Novick, R. P. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, 276 (5321): 2027-2030.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J. R., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S., Winson, M. K., Salmond, G. P. C., Steward, G. S. A. B. & Williams, P. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*, 12 (6): 2477-2482.
- Karatuna, O. & Yagci, A. 2010. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (12): 1770-1775.
- Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M. & Ahmad, I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 354-360.

- Khondker, A., Bider, R-C., Passos-Gastaldo, I., Wright, G. D. & Rheinstädter, M. C. 2020. Membrane interactions of non-membrane targeting antibiotics: The case of aminoglycosides, macrolides, and fluoroquinolones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1863 (1): 1-7.
- Kievit, T. e Iglewski, B. 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 68 (9): 4839-4849.
- Kong, K-F., Jayawardena, S. R., Indulkar, S. D., Puerto, A., Koh, C-L., Høiby, N. & Mathee, K. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR Is a Global Transcriptional Factor That Regulates Expression of AmpC and PoxB β -Lactamases, Proteases, Quorum Sensing, and Other Virulence Factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (11): 4567-4575.
- Koh, K. H. & Tham, F-Y. 2011. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44 (2): 144-148
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., Delden, C. & Pechère, J. C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *Journal of Bacteriology*, 182 (21): 5990-5996.
- Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O. & Wong-Beringer, A. 2005. Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2): 565-570.
- Lambert, P. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 41 (95): 22-26.
- LaSarre, B. & Federle, M. 2013. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1): 73-111.
- Lee, M. S. & Morrison, D. A. 1999. Identification of a New Regulator in *Streptococcus pneumoniae* Linking Quorum Sensing to Competence for Genetic Transformation. *Journal of Bacteriology*, 181 (16): 5004-5016.
- Levin-Reisman, I., Brauner, A., Ronin, I. & Balaban, N. Q. 2019. Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (29): 14734-14739.

- Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., Novick, R. P. & Vandenesch, F. 1998. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 28 (3): 655-662.
- Lindquist, S., Lindberg, F. & Normark, S. 1989. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC beta-lactamase gene. *Journal of Bacteriology*, 171 (7): 3746-3753.
- Liu, X. Q. & Ferenci, T. 1998. Regulation of Porin-Mediated Outer Membrane Permeability by Nutrient Limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180 (15): 3917-3922.
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H. & Lee, V. J. 2001. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (1): 105-116.
- Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H., & Berendsen, W. 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 147(3): 251-262.
- Lukačišinová, M. & Bollenbach, T. 2017. Toward a quantitative understanding of antibiotic resistance evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 46: 90-97.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose-and mannose-rich exopolysaccharide. *Journal of bacteriology*, 189 (22): 8353-8356.
- March-Rosselló, G. A. 2017. Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35 (3): 182-188.
- Maseda, H., Sawada I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T. & Nomura, N. 2004. Enhancement of the mexAB-oprM Efflux Pump Expression by a Quorum-Sensing Autoinducer and Its Cancellation by a Regulator, MexT, of the mexEF-oprN Efflux Pump Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (4): 1320-1328.
- Masuda, M., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. & Nishino, T. 2000. Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (12): 3322-3327.

- Mayville, P., Ji, G., Beavis, R., Yang, H., Goger, M., Novick, R. P., & Muir, T. W. 1999. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (4): 1218-1223.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 166-169.
- Morfeldt, E., Taylor, D. V., Von Gabain, A., & Arvidson, S. 1995. Activation of alpha toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans encoded antisense RNA, RNAIII. *The EMBO journal*, 14 (18): 4569-4577.
- Nikaido, H. & Pagès, J. M. 2012. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2): 340–363.
- Nowara, A., Burhenne, J. & Spiteller, M. 1997. Binding of Fluoroquinolone Carboxylic Acid Derivatives to Clay Minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (4): 1459-1463.
- O’Neil, M. J. 2013. *The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. (15^a ed.). Reino Unido: Royal Society of Chemistry. p. 367, 1758
- Park, J. T. & Uehara, T. 2008. How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72 (2): 211-227.
- Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (16): 8789-8793.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. & Greenberg, E. P. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (8): 4360–4365.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., e Iglewski, B. H. 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, 260 (5111): 1127-1130.
- Pearson, J. P., Van-Delden, C. e Iglewski, B. H. 1999. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *Journal of Bacteriology*, 181 (4): 1203-1210.

- Pesci, E., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 11229-11234.
- Pestova, E. V., Håvarstein, L. S. & Morrison, D. A. 1996. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two component regulatory system. *Molecular Microbiology*, 21 (4): 853-862.
- Piper, K. R., Bodman, S. B. & Farrand, S. K. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature*, 362: 448-450.
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E., & Silhavy, T. J. 1996. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 20 (5): 911-917.
- Prithiviraj, B., Bais, H. P., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E. H., Dayakar, B. D., Schweizer, H. P. & Vivanco, J. M. 2005. Down Regulation of Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Salicylic Acid Attenuates Its Virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 73 (9): 5319-5328.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A. & Wexler, H. M. 2008. Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. *Microbial Ecology*, 56: 412-419.
- Ressliński, A., Dąbrowiecki, S. & Głowacka, K. 2015. The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. *Hernia*, 19 (2): 179-185.
- Ruby, E. G. & McFall-Ngai, M. J. 1992. A Squid That Glows in the Night: Development of an Animal-Bacterial Mutualism. *Journal of Bacteriology*, 174 (15): 4865-4870.
- Sakuragi, Y. & Kolter, R. 2007. Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189 (14): 5383-5386.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184 (4): 1140-1154.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G. & Bassler, B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41 (2): 463-476.

- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. & Cloeckaert, A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (5): 519–542.
- Seija, V. & Vignoli, R. 2006. Principales grupos de antibióticos. En Departamento de bacteriología y virología (Ed.), *Temas de bacteriología y virología médica* (2ª ed.) (pp. 631-647). Uruguay: Oficina del libro FEFMUR.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M. & Parsek M. R. 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, 62 (5): 1264-1277.
- Singh, S. B., Young, K. & Silver, L. L. 2017. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133: 63–73.
- Skindersoe, M. E., Alhede, M., Phipps, R., Yang, L., Jensen, P. O., Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N. & Givskov, M. 2008. Effects of Antibiotics on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (10): 3648-3667.
- Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A. & Grossman, A. D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 9: 547-558.
- Solomon, J. M., Lazazzera, B. A. & Grossman, A. D. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 10: 2014-2024.
- Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F. & Arrow, A. S. 1987. Bacterial Uptake of Aminoglycoside Antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51 (4): 439-457.
- Tafur, J., Torres, J. & Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación colombiana de infectología*, 12 (3): 217-226.
- Tamber, S., Ochs, M. M. & Hancock, R. E. W. 2006. Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188 (1): 45-54.
- Taroco, R., Seija, V. & Vignoli, R. 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En Departamento de bacteriología y virología (Ed.), *Temas de bacteriología y virología médica* (2ª ed.) (pp. 663-671). Uruguay: Oficina del libro FEFMUR.

- Vattem, D. A., Mihalik, K., Crixell, S. H. & McLean, R. J. C. 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 78 (4): 302-310.
- Vergalli, J., Dumont, E., Cinquin, B., Maigre, L., Pajovic, J., Bacqué, E., Mourez, M., Réfrégiers, M. & Pagès, J-M. 2017. Fluoroquinolone structure and translocation flux across bacterial membrane. *Scientific Reports*, 7, 9821: 1-8.
- Visick, K. & McFall-Ngai, M. J. 2000. An Exclusive Contract: Specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Partnership. *Journal of Bacteriology*, 182 (7): 1779-1787.
- Wang, Y., Ha, U., Zeng, L. & Jin, S. 2003. Regulation of Membrane Permeability by a Two-Component Regulatory System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (1): 95-101.
- Wei, Q., & Ma, L. 2013. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10): 20983–21005.
- Whitehead, N., Barnard, A., Slater, H., Simpson, N. & Salmond, G. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 365-404.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. & Greenberg, E. P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Nature*, 413 (6858): 860-864.
- Williams, P. 2007. Quorum sensing, communications and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153: 3923-3938.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. & Bycroft, B. W. 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philosophical Transactions of the The Royal Society B*, 355: 667-680.
- Yang, L., Rybtke, M. T., Jakobsen, T. H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. 2009. Computer-Aided Identification of Recognized Drugs as *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (6): 2432-2443.
- Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J. & Molin, S. 2011. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental microbiology*, 13 (7): 1705-1717.

Zeng, X. & Lin, J. 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4 (128): 1-9.

Gracias por leer hasta acá, sigue igual de curioso. ☺