



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Resistencia contra la inhibición de la percepción de quorum por
medio de enzimas que degradan autoinductores”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QBP Estrada Velasco Angel Yahir

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Rodolfo García Contreras
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo
Dra. Ana María Fernández Presas
Facultad de Medicina

Ciudad de México, Abril, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Estrada Velasco Ángel Yahir
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **16 de mayo** del presente año, conocieron su solicitud de **Cambio de Sinodal de JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Resistencia contra la inhibición de la percepción de quorum por medio de enzimas que degradan autoinductores.**", dirigida por el/la Dr(a). **García Contreras Rodolfo**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente integrante en sustitución del Dr (a). **Georges Dreyfus Cortés (IFC) SABATICO**

Presidente: Soberón Chávez Gloria (IIBo)
Vocal: Israel Castillo Juárez (Colegio de Posgraduados)
Vocal: Mariano Martínez Vázquez (IQ)
Vocal: **Adrián Fernando Alvarez (IFC)**
Secretario: Miguel Cocotl Yañez (FM)

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de mayo de 2022
Coordinadora



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) le agradezco por la beca recibida durante mi maestría, así como el financiamiento otorgado por el proyecto CONACYT Ciencia Básica 2018-2019 A1-S-8530.

A la facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, por permitirme realizar mis estudios de posgrado dentro de este gran programa y excelentes instalaciones.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi tutor de tesis Dr. Rodolfo García Contreras por su instrucción y colaboración durante el desarrollo de este proyecto de investigación. A la Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo por su apoyo durante la realización del proyecto. A la Dra. Ana María Fernández Presas por las herramientas brindadas para llevar a cabo algunos de los protocolos que se requirieron durante el desarrollo de este proyecto. Los tres formaron un maravilloso comité tutorial, siempre ayudándome a mejorar como estudiante e investigador.

Contenido

Contenido	4
Abreviaturas	7
Figuras	8
Tablas	10
Resumen	11
1. Introducción	1
1.1. Comunicación bacteriana	1
1.1.1 <i>Quorum sensing</i> y virulencia en patógenos	4
1.2. Mecanismos de inhibición de <i>quorum sensing</i>	4
1.2.1 Bloqueo de los receptores de QS	5
1.2.2 Bloqueo de la síntesis de AI	5
1.2.3 Inactivación de las moléculas señal	7
1.2.3.1 Lactonasas	7
1.2.3.2 Acilasas	7
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.3.1 Sistemas de QS en <i>P. aeruginosa</i>	10
1.3.2 Factores de virulencia asociados al QS en <i>P. aeruginosa</i>	11
1.3.3 Moléculas utilizadas para QQ en <i>P. aeruginosa</i>	13
1.3.4 Resistencia a los sistemas de QQ	13
2. Justificación	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.1. General	17

4.2.	Específicos	17
5.	Metodología	18
5.1.	Cepas bacterianas	18
5.2.	Crecimiento bacteriano	18
5.3.	Determinación del medio en el cual se inhibió el QS	18
5.4.	Obtención y purificación de la enzima inhibidora de QS AiiM	19
5.4.1	Expresión de la enzima AiiM	19
5.4.2	Purificación de la lactonasa AiiM	19
5.4.3	Determinación de la función de la enzima AiiM	21
5.5.	Obtención de células resistentes a la enzima AiiM	21
5.5.1	Búsqueda de colonias resistentes a la enzima AiiM	21
5.6.	Obtención de sobrenadantes	21
5.7.	Determinación de factores de virulencia	22
5.7.1	Determinación de actividad caseinolítica	22
5.7.2	Determinación de la producción de piocianina	22
5.8.	Detección de los AI de <i>P. aeruginosa</i>	22
5.8.1	Extracción de AHL	22
5.8.2	Detección de C4HSL	23
5.8.2.1	Prueba T	23
5.8.2.2	Detección en sensidisco	23
5.8.3	Detección de 3O12HSL	23
6.	Resultados	25
6.1.	Purificación de la enzima AiiM	25
6.2.	Determinación de actividad anti virulencia de la enzima AiiM	26
6.3.	Condiciones ideales de crecimiento	26

6.4.	Obtención de bacterias resistentes a la enzima AiiM	27
6.5.	Caracterización de las clonas resistentes a la enzima AiiM	29
6.5.1	Factores de virulencia	30
6.5.1.1	Actividad caseinolítica	30
6.5.1.2	Piocianina	31
6.5.2	Detección de C4HSL	33
6.5.3	Detección de 3O12HSL	36
7.	Discusión	40
8.	Conclusión	42
9.	Perspectivas	43
10.	Referencias	44

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
3O12HSL	3-oxo-C12-homoserin lactona
AA	Ácido antranílico
AHL	<i>N</i> -acil homoserin lactona
AI	Auto inductores
C4HSL	butanoil homoserin lactona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
HAQ	4-hidroxi-2-aliquil quinolona
HHQ	4-hidroxi-2-heptil quinolona
HSL	Homoserin lactona
LB	Caldo Luria
LTTR	Regulador transcripcional tipo LysR
MDR	Multidrogo resistente
OMS	Organización mundial de la salud
ON	Overnight
ONPG	Orto-nitrofenil- β -galactósido
PQS	3,4-dihidroxi-2-heptil quinolona
Pqs	Señal de quinolonas de <i>Pseudomonas</i>
QQ	<i>Quorum quenching</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
SE	Sin enzima
SST	Sistemas de secreción tipo
WT	Cepas silvestres

Figuras

Figura 1 Sistemas de *quorum sensing* en *Aliivibrio fischeri*. A) Sistema de QS presente en *Aliivibrio fischeri*, se muestra en circunferencias azul a los AI que son a base de HSL, el hexágono azul es la proteína codificada por el gen *luxI* para sintetizar el AI, en la flecha roja se muestra el gen *luxR* que codifica para los receptores del AI mostrados en circunferencias rojas, cuando se unen dos de ellos son activos y pueden activar el gen *luxI*. B) Estructura del AI de *A. fischeri* a base de HSL conocido como 3 oxo-hexanoil-HSL. 2

Figura 2 Estructura química de algunas moléculas autoinductoras. a) Homoserin lactonas, donde el grupo R, puede ser de C1 a C15, b) 3-oxoacil-HSL, c) 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona [señal de quinolonas de *Pseudomonas* (PQS)], d) furanosil borato, e) Péptido 1 de autoinductores (AIP-1) de *Staphylococcus aureus*. 2

Figura 3 Mecanismos descritos para la inhibición de “*quorum sensing*” 4

Figura 4 Ruta de síntesis de HAQs y análogos del ácido antranílico. 6

Figura 5 Representación de inactivación de QS por enzimas utilizadas en QQ. A) inicio de la síntesis de HSL. B) Detección de la señal dada por HSL, activación de QS. C) hidrólisis de HSL por enzimas de QQ. 6

Figura 6 Degradación de AHL por lactonasas y acilasas 8

Figura 7 Factores de virulencia descritos en *P. aeruginosa* 8

Figura 8 Sistemas de QS en *Pseudomonas aeruginosa*, Las, Rhl y Pqs se observa sus interacciones con sus moléculas señal (A) 3OC12-HSL; C4-HSL y PQS (B) Estructuras químicas de las moléculas señal. 11

Figura 9 Crecimiento de *P. aeruginosa* PA14, mutante por transposón en *mexR*, y mutante por transposon *nalC*, línea continua es sin presencia de C-30, con línea punteada es con presencia de C-30 **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 10 Mecanismo de resistencia descrito a la furanona C-30 14

Figura 11 Marcador de peso molecular: BLUEstain Protein Ladder **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 12 Gel SDS PAGE de la primera purificación de la enzima AiiM. Carril 1: Marcador de PM, carril 2: Concentrado de primera purificación, carril 3: después de columna, carril 4: lavado con 10 mM imidazol, carril 5: lavado con 20 mM imidazol, carril 6: lavado con 50 mM imidazol, carril 7: primera fracción de elución con 200 mM imidazol, carril 8: segunda fracción de elución con 200 mM, carril 9: tercera fracción de elución con 200mM, carril 10: lavado con 400 mM imidazol. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13 Determinación de la actividad de la enzima AiiM sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 WT	26
Figura 14 Crecimiento de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en medio mínimo M9 con 1% Adenosina MOPS pH 7.0	27
Figura 15 Curva de crecimiento para la obtención de mutantes resistentes a la enzima AiiM, en medio M9 Adenosina 1% MOPS pH 7.0	28
Figura 16 Curva de actividad caseinolítica con la enzima AiiM a tres diferentes concentraciones N=3	30
Figura 17 Actividad casenolítica de las cepas resistentes a la enzima AiiM N=3	31
Figura 18 Curva de producción de piocianina con la enzima AiiM a tres diferentes concentraciones N=3	32
Figura 19 Producción de piocianina de las cepas resistentes a la enzima AiiM N=3	33
Figura 20 Prueba de T para percibir la producción de violaceína en <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	34
Figura 21 Prueba con sensidisco para la detección de HSL de cadena corta en <i>C. violaceum</i> CV026	¡Error! Marcador no definido.
Figura 22 Curva tipo para la detección de 3O12HSL por el biosensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4 P2LR4-traG: lacZ	37
Figura 23 Curva de volumen del extracto de la cepa PAO1 WT para determinar la actividad galactosidasa en <i>A. tumefaciens</i> NTL4 P2LR4-traG: lacZ	38
Figura 24 Detección de 3O12HSL en extractos obtenidos de cultivos de las cepas mutantes con y sin enzima AiiM	39

Tablas

Tabla 1 Ejemplos de sistemas de QS en bacterias Gram negativas a base de HSL	3
Tabla 2 Factores de virulencia presentes en <i>P. aeruginosa</i>	9
Tabla 3 Factores de virulencia asociados a <i>quorum sensing</i>	12
Tabla 4 Cepas utilizadas durante el proyecto	18
Tabla 5 Cultivos seleccionados para su análisis de resistencia a la enzima AiiM	29

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria de importancia clínica, se encuentra asociada a infecciones sanitarias en unidades de cuidados intensivos (UCI), y pertenece al grupo *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp.) que se ha definido por su importancia clínica y alta resistencia a antibióticos. Se encuentra coligada a neumonía asociada al ventilador, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones de heridas y quemaduras, otitis media, queratitis e infecciones del tracto urinario. El “Centro de Prevención y Control de Enfermedades” de los Estados Unidos de América en el 2013 estimó que existen alrededor de 51,000 infecciones anuales asociadas a *P. aeruginosa*, de las cuales 6,700 son cepas multirresistentes a fármacos que causan 440 muertes cada año. *P. aeruginosa* cuenta con diversos factores de virulencia que le permite colonizar y causar infecciones en su hospedero. De los principales están las metaloproteasas, como la elastasa que destruye diferentes proteínas como el colágeno, la elastina, las inmunoglobulinas, los componentes del complemento, así como el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral alfa. Mientras que la proteasa alcalina inhibe la fagocitosis, la muerte mediada por neutrófilos, la opsonización, la degradación de C3b de la cascada del complemento entre otras. Otro factor de virulencia es la piocianina, promueve el estrés oxidativo inhibiendo el movimiento ciliar y retrasa la respuesta inflamatoria por el daño a neutrófilos y la inducción de apoptosis. En bacterias patógenas los factores de virulencia son regulados por un sistema de comunicación entre células, llamado percepción de quorum o “*quorum sensing*” (QS), que permite a las bacterias estimar su densidad poblacional y activar la virulencia cuando se ha alcanzado una densidad alta. *P. aeruginosa* cuenta con tres mecanismos sistemas de QS, dos de ellos mediados por señales tipo N-acil homoserina lactonas (AHL), denominados Las y Rhl, y un sistema a base de señal de quinolonas, llamado PQS. Estos sistemas se encuentran jerárquicamente organizados, se ha propuesto su interrupción como una estrategia antibacteriana, denominado “*quorum quenching*” (QQ). De los principales mecanismos de QQ se encuentra la inhibición de las sintasas de autoinductores (AI), la interferencia con la unión del AI con los receptores de señal, así como por enzimas que degradan los AI como lactonasas que rompen el anillo lactónico.

Unas de las moléculas que se han descrito que tienen una actividad QQ es la furanona C-30 que bloquea al receptor LasR evitando la unión del AI, la pirimidina 5-FU cuyo mecanismo de acción como inhibidor de QS no se encuentra definido y la enzima lactonasa AiiM, de las dos primeras se han descrito sistemas de resistencia de *P. aeruginosa*, pero aún no se describe ninguna resistencia a enzimas inhibitoras de QS. Por lo que en el presente trabajo se evaluó si *P. aeruginosa* puede desarrollar resistencia a una de estas enzimas degradadoras de auto-inductores.

En este proyecto, se encontró que el crecimiento de la cepa PAO1 WT en medio mínimo con sales M9 adicionado con 1% de adenosina, es adecuado para inhibir el crecimiento y

el QS, con esta condición se puede lograr obtener la resistencia contra inhibidores de QS. En el caso específico de *P. aeruginosa* PAO1, se realizaron curvas de crecimiento en medio M9 con adenosina con 2 concentraciones de la enzima AiiM (5 µg/mL y 10 µg/mL), se aislaron colonias (que se espera sean resistentes a la actividad QQ de la enzima) y solamente dos presentaron una resistencia persistente, al medir los fenotipos de actividad caseinolítica y producción de piocianina en presencia de la lactonasa AiiM, presentan una actividad similar a la cepa PAO1 sin enzima, y su producción de AHL de cadena larga no se ve afectada en la presencia de AiiM en sus cultivos.

Estos hallazgos aportan evidencia de la generación de resistencia, por parte de *P. aeruginosa*, a los tratamientos farmacológicos basados en QQ, en este caso a la enzima lactonasa.

1. Introducción

1.1. Comunicación bacteriana

La comunicación bacteriana también conocida como percepción de quorum o “*quorum sensing*” (QS) se basa en la producción, liberación y detección de moléculas difusibles de señalización extracelular, llamadas autoinductores (AI), los cuales se encuentran asociados a la densidad poblacional y tiene un papel muy importante en la regulación de expresión de genes, muchos de ellos se encuentran relacionados a factores de virulencia (Dong & Lian-Hui, 2005).

Este mecanismo de comunicación bacteriana fue descubierto en *Aliivibrio fischeri* y *Vibrio Harveyi* por Nealson KH y Hastings JW en 1979, en ambas especies se describió un proceso de bioluminiscencia realizado por la enzima luciferasa que es codificada por el operón *luxCDABE* (**Figura 1**), que sólo ocurre cuando existe una alta densidad poblacional de los microorganismos, y por ende una alta concentración de los AI.

Con esto, describieron el mecanismo por el cual se regulaba la producción de la bioluminiscencia, en el cual participan las proteínas LuxI y LuxR. LuxI es la enzima que sintetiza intracelularmente el AI que es una acil-homoserina lactona (AHL), llamada *N*-3 oxo-hexanoil-HSL (**Figura 1, b**) la cual difunde a través de la membrana celular, de modo que se equilibra la concentración intra y extracelular. LuxR tiene dos funciones, es la proteína que se une a el AI, lo que activa la transcripción del operón *luxICDABE*. Cabe destacar que aun cuando hay una baja densidad poblacional, el operón *luxICDABE* se transcribe a una velocidad basal, esto sucede porque se produce constitutivamente un nivel basal del AI por la enzima codificada por el gene *luxI* (primer gene que se codifica en el operón que contiene los genes que codifican para la enzima luciferasa) (Miller & Bassler, 2001). Conforme va aumentando la densidad poblacional se llega a una concentración mayor del AI, lo que permite que se una a la proteína LuxR, una vez unidos el AI y la proteína, se estructura el dominio de unión de LuxR en el DNA, para activar el promotor de la transcripción del operón *luxICDABE*, lo que provoca que aumente la producción del AI y de la emisión de luz (Abisado, Benomar, Klaus, Dandekar, & Chandler, 2018).

La presencia de estos mecanismos se ha descrito en varios microorganismos los cuales llegan a presentar más de un sistema de comunicación (**Tabla 1**). Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, que cuenta con dos sistemas tipo LuxR-I (LasR-I y RhlR-I) que controlan la producción de bienes públicos y de factores de virulencia. Por otra parte *Burkholderia thailandensis* cuenta con tres sistemas completos de circuitos LuxR-I, de igual forma se han descrito sistemas de QS en *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, entre otras bacterias Gram negativas (Kievet & Iglewski, 2000) (Azimi, Klementiev, Whiteley, & Diggle, 2020).

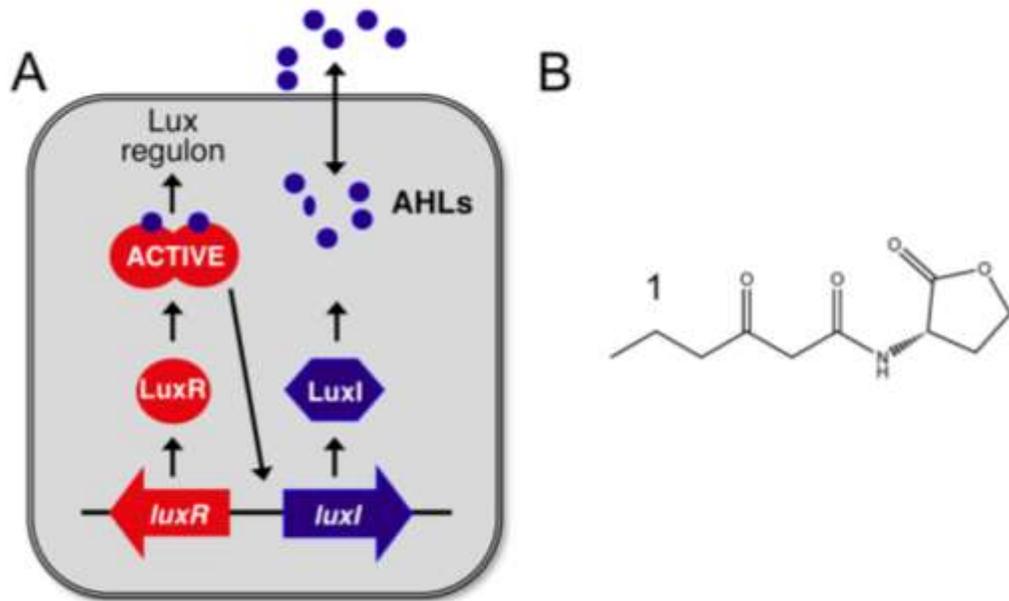


Figura 1 Sistemas de quorum sensing en *Aliivibrio fischeri*. A) Sistema de QS presente en *Aliivibrio fischeri*, se muestra en circunferencias azul a los AI que son a base de HSL, el hexágono azul es la proteína codificada por el gen *luxI* para sintetizar el AI, en la flecha roja se muestra el gen *luxR* que codifica para los receptores del AI mostrados en circunferencias rojas, cuando se unen dos de ellos son activos y pueden activar el gen *luxI*. B) Estructura del AI de *A. fischeri* a base de HSL conocido como 3 oxo-hexanoil-HSL.

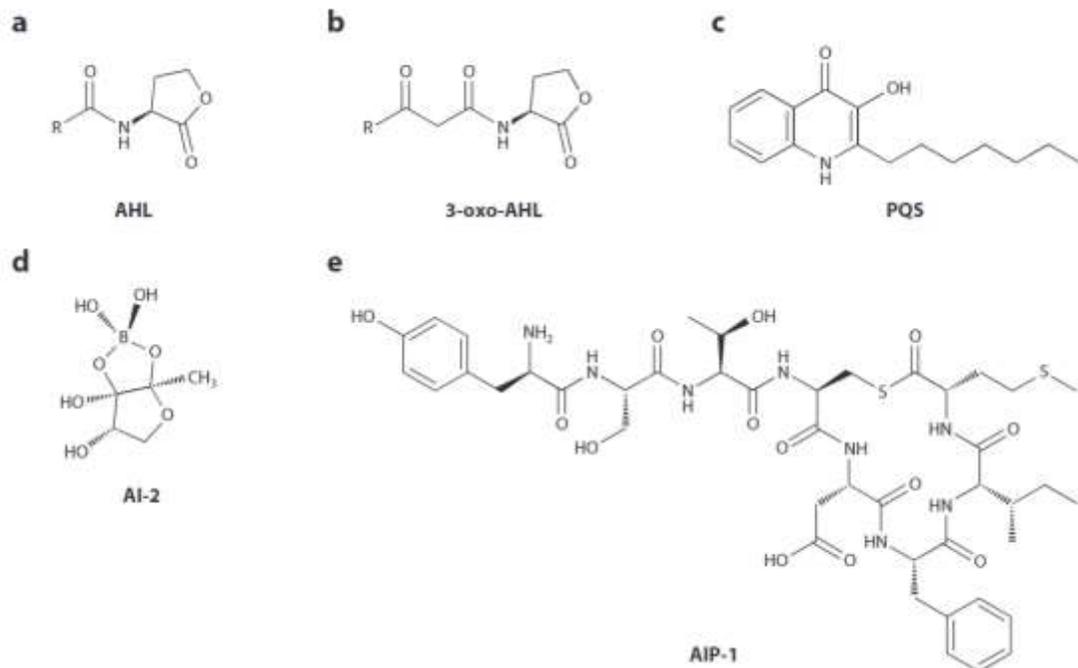


Figura 2 Estructura química de algunas moléculas autoinducidas. a) Homoserin lactonas, donde el grupo R, puede ser de C1 a C15, b) 3-oxoacil-HSL, c) 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona [señal de quinolonas de *Pseudomonas* (PQS)], d) furanosil borato, e) Péptido 1 de autoinducidos (AIP-1) de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 1 Ejemplos de sistemas de QS en bacterias Gram negativas a base de HSL

Organismo	Molécula señal	Proteínas reguladoras	Fenotipo
<i>Alivibrio fischeri</i>	3-oxo-C ₆ -HSL	LuxI/LuxR	Bioluminiscencia
<i>Vibrio harveyi</i>	3-Hidroxi-C ₄ -HSL	LuxLM/LuxN	Bioluminiscencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-oxo-C ₁₂ -HSL	LasI/LasR	Múltiples enzimas extracelulares, RhIR, formación de biopelícula
	C ₄ -HSL	RhII/RhIR	Múltiples enzimas extracelulares, ramnolípidos, metabolitos secundarios
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-Oxo-C ₈ -HSL	TraI/TraR	Conjugación del plásmido Ti
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	3-Oxo-C ₆ -HSL	ExpI/ExpR	Exoenzimas
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C ₆ -HSL	CviiI/CviiR	Exoenzimas, antibióticos, violaceína
<i>Burkholderia cepacia</i>	C ₈ -HSL	CepI/R	Proteasa, sideróforos
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C ₄ -HSL	Ahyl/AhyR	Producción de exoproteasas
<i>Serratia liquefaciens</i>	C ₄ -HSL	SwrI/SwrR	Swarming, producción de exoproteasas

Como se muestra en la Tabla 1, las moléculas AI en Gram negativas son principalmente AHL cuya longitud varía dependiendo del microorganismo (**Figura 2**), aunque en el caso de *P. aeruginosa* también presenta otro sistema de QS cuyas moléculas señal son 4-hidroxi-2-aquil quinolona (HAQ) como la llamada las Pqs (Pseudomonas quinolone signal) que se describirán posteriormente. Por otra parte, en bacterias Gram positivas se han descrito mecanismos de QS, pero están regulados por pequeños péptidos y por sistemas de transducción de señales de doble componente (Azimi, Klementiev, Whiteley, & Diggle, 2020).

1.1.1 Quorum sensing y virulencia en patógenos

Desde que se describieron los mecanismos de QS en microorganismos patógenos se ha visto que juegan un papel muy importante en la regulación de la transcripción de los genes que codifican factores de virulencia. Los primeros estudios usaban mutantes en los genes que codifican las enzimas que sintetizan los AI (homólogos de LuxI) o en los reguladores transcripcionales que responden a la señal (homólogos de LuxR), estos estudios evaluaron la transcripción/actividad de los factores de virulencia conocidos en comparación de cepas silvestres (WT), así como la virulencia que tenían estas cepas en modelos biológicos. Esto demostró la importancia del QS en una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Unos ejemplos de las bacterias Gram negativas que cuentan con sistemas de QS implicados en la regulación de factores de virulencia, son *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* serotipo O157:H7 (EHEC), *Erwinia carotovora* (patógeno de plantas). Mientras que, algunos ejemplos de Gram positivas son: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* y miembros del género *Streptococcus*, (Azimi, Klementiev, Whiteley, & Diggle, 2020) (Rutherford & Bassler, 2012)

1.2. Mecanismos de inhibición de quorum sensing

El proceso mediante el cual se inhibe el QS es conocido como “quorum quenching” (QQ), el cual se puede realizar mediante la degradación de los AI por medio de enzimas. Además, se puede inhibir la señal por bloqueo del receptor por moléculas inhibitoras e inclusive por bloqueo de las enzimas implicadas en la síntesis de los AI.

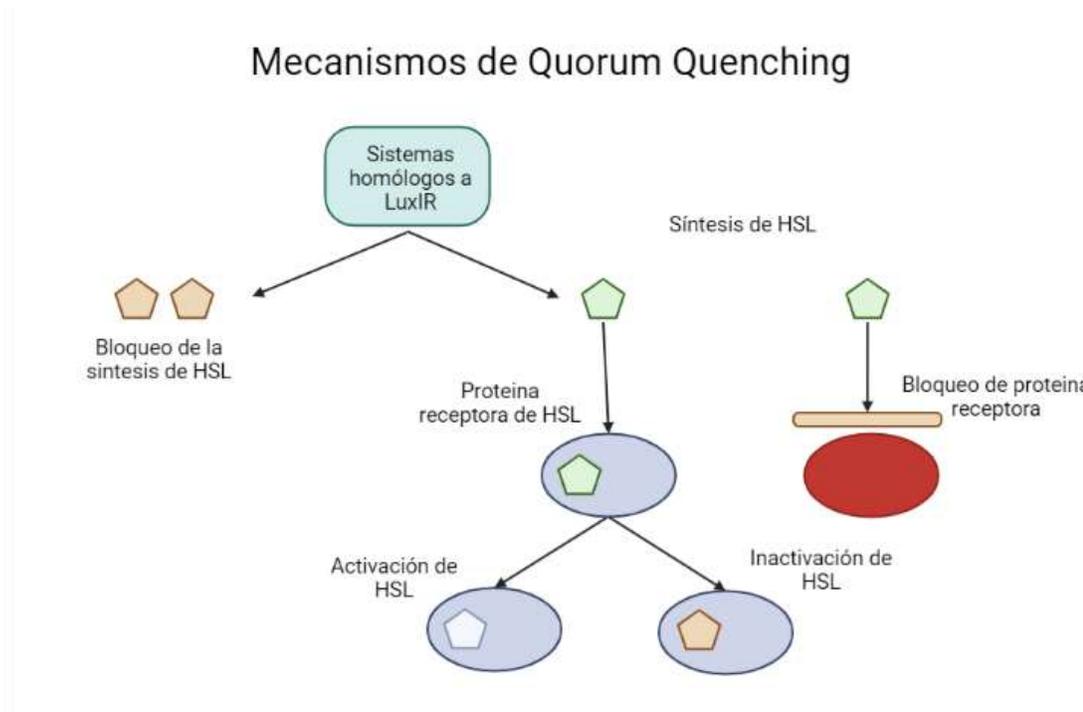


Figura 3 Mecanismos descritos para la inhibición de “quorum sensing”

Estos mecanismos de inhibición de quorum se han propuesto para reducir los factores de virulencia que son regulados por QS, sin inhibir el crecimiento del microorganismo, lo que es importante para que la generación de resistencia a estos compuestos utilizados no se favorezca (Bové, Bao, Sass, Crabbé, & Coenye, 2021).

1.2.1 Bloqueo de los receptores de QS

En la naturaleza se ha observado que se modula el QS con diferentes organismos, un ejemplo es la macroalga *Delisea pulchra*, que produce furanonas bromadas que tienen una estructura similar a las AHL, consecuentemente estas pueden actuar como inhibidores de la detección de señal ya que bloquea a receptores como LuxR, también se han utilizado sus derivados sintéticos como la furanona C30, que bloquea a LasR. Asimismo, se ha comprobado esta actividad en modelos de infección pulmonar en ratón reduciendo la producción de factores de virulencia, pero su uso tiene efectos negativos en toxicidad afectando la ruta metabólica central de aminoácidos y ácidos grasos (Turan & Engin, 2018).

Además del uso de furanonas como inhibidoras de los receptores de QS existen otras moléculas capaces de unirse a las proteínas receptoras de QS. Dos ejemplos de antagonistas son la estreptomina y azitromicina, dos antibióticos que se unen a los receptores de QS de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, respectivamente, inhibiendo la expresión de los genes asociados a QS (Turan & Engin, 2018).

1.2.2 Bloqueo de la síntesis de AI

El QQ también se puede llevar a cabo mediante el bloqueo de la síntesis de las señales autoinductoras, interfiriendo directamente con las sintetas de estos. Un ejemplo es en el sistema Pqs (de *P. aeruginosa*), que requiere la producción del ácido antranílico (AA) y ácidos grasos (**Figura 4**) que funcionan como precursores de las HAQ como la 4-hidroxi-2-heptil quinolona (HHQ) precursora de 3,4-dihidroxi-2-heptil quinolona conocida como PQS, estas reacciones son catalizadas por las proteínas sintetizadas por los operones *phnAB*, *pqsA-D* y *pqsH*, respectivamente (Lesic, y otros, 2007).

En la figura 4B se muestran tres análogos del ácido antranílico que bloquean la producción de HHQ y PQS y consecuentemente la activación del regulador transcripcional MvfR (también llamado PqsR), interrumpiendo la expresión de genes de factores de virulencia dependientes de MvfR, no inhibe la viabilidad de las células, pero se restringe la diseminación bacteriana sistémica (Lesic, y otros, 2007).

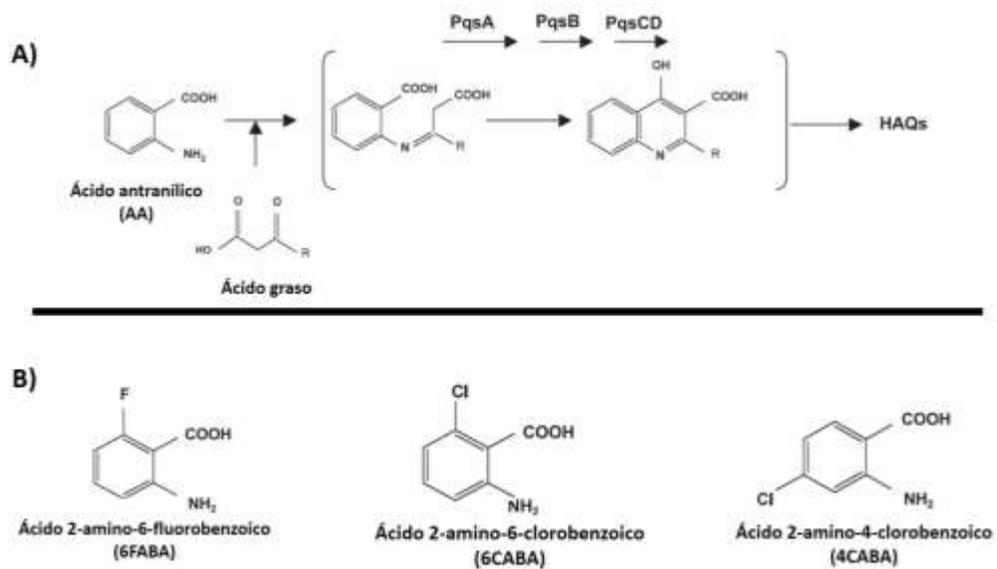


Figura 4 Ruta de síntesis de HAQs y análogos del ácido antranílico.

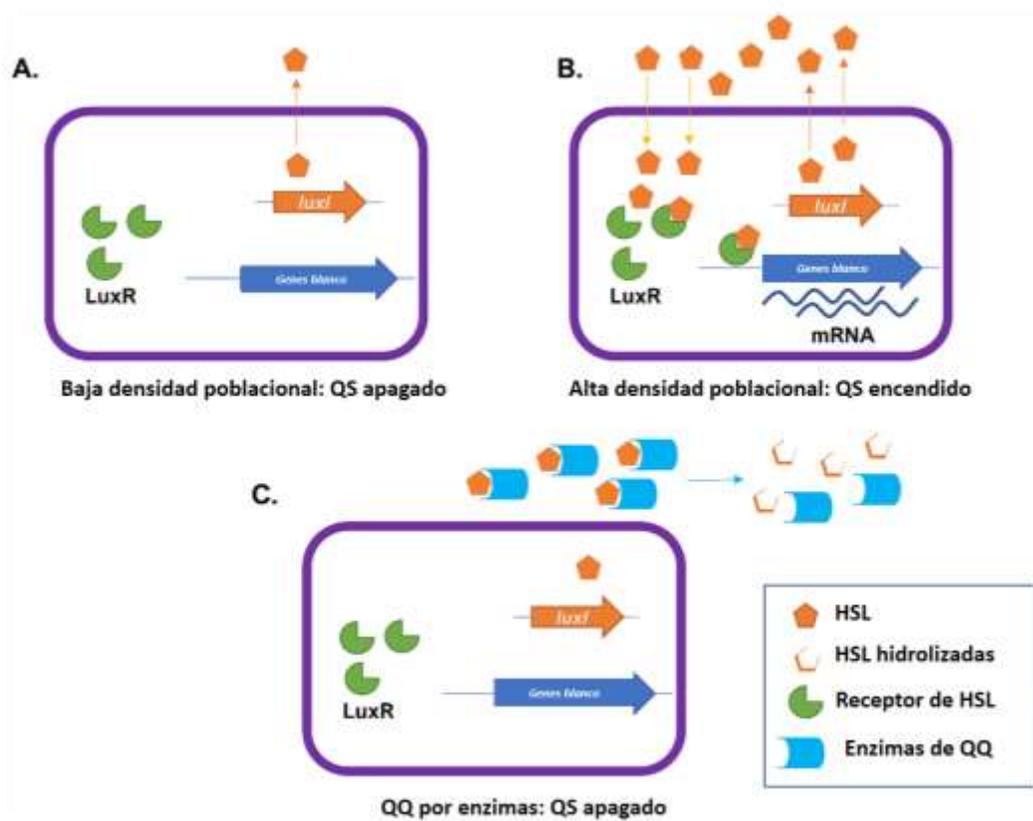


Figura 5 Representación de inactivación de QS por enzimas utilizadas en QQ. A) inicio de la síntesis de HSL. B) Detección de la señal dada por HSL, activación de QS. C) hidrólisis de HSL por enzimas de QQ.

1.2.3 Inactivación de las moléculas señal

El tercer método que se ha utilizado como QQ es la degradación de las moléculas señal AHL para inactivar la señal que estas generan, existen dos métodos para poder realizar esta degradación: degradación química y la más usada degradación enzimática (**Figura 5**), utilizando lactonasas y acilasas para la degradación por hidrólisis específica de las HSL.

1.2.3.1 Lactonasas

Estas enzimas realizan un proceso llamado lactonólisis en el cual se hidroliza el anillo de la lactona (**Figura 6A**) (Sikdar & Elias, 2021), son sintetizadas por varias bacterias, como son algunos miembros del género *Bacillus*, *P. aeruginosa* PAIA, *Arthrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhodococcus* sp los cuales son capaces de producir la enzima AiiA. También se han descrito otras enzimas AiiM y AidH, sintetizadas por *Microbacterium testaceum* StLB037 y *Ochrobactrum* sp. T63, respectivamente.

La lactonasa AiiA de *Bacillus cereus* A24 se ha utilizado para la degradación de 3-oxo-dodecanoil-homoserin lactona (3OC12HSL), para la disminución de factores de virulencia en *P. aeruginosa* (Fetzner, 2015). Otra de las lactonasas que ha sido estudiada, es AiiM, que fue probada en cepas clínicas de *P. aeruginosa* y demostró que es capaz de romper a las AHL en una concentración de 5 µg/mL sin inhibir el crecimiento celular. Se observó que disminuyeron 4 factores de virulencia regulados por QS (elastasa, piocianina, proteasa alcalina y producción de HCN). Además, no se encontró ninguna cepa no susceptible a la inhibición del QS por AiiM (López-Jacome, y otros, 2019).

1.2.3.2 Acilasas

Las acilasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida de la HSL (**Figura 6B**) (Sikdar & Elias, 2021) fueron descubiertas inicialmente en *Variovorax paradoxus* y posteriormente en *P. aeruginosa* y *Ralstonia* sp.

Los productos derivados de su hidrólisis se pueden metabolizar como fuente de nitrógeno y de energía, consecuentemente ya no se puede regenerar la AHL, por esta razón tienen más ventajas que las HSL-lactonasas. Estas enzimas tienen una preferencia por AHL con cadenas de ácido graso largas, pero se han encontrado enzimas como AiiC de *Anabaena* sp. PCC7120 que es capaz de degradar a C4-HSL, el AI del sistema Rhl de *P. aeruginosa*. Otra de las enzimas descritas es PvdQ de *P. aeruginosa*, la cual se encuentra involucrada en la maduración de la pioverdina, pero cuando hay una sobreexpresión de ella se atenúa considerablemente la producción de factores de virulencia *in vitro* e *in vivo*. Estudios realizados por Utari *et al.*, 2018 demostraron en modelos murinos que se reduce la acumulación de 3OC12-HSL que se ve reflejado en la disminución de elastasa y piocianina, además de no tener efecto citotóxico en pulmón murino.

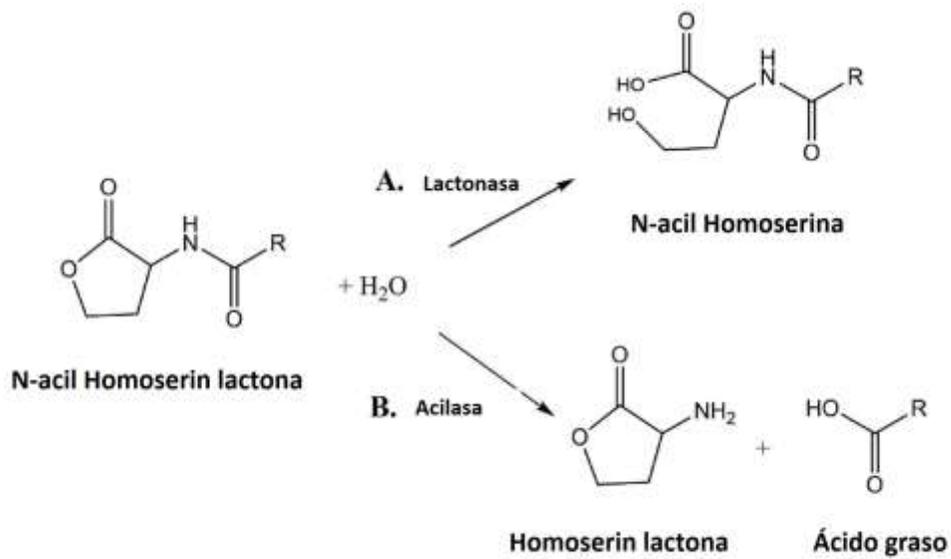


Figura 6 Degradación de AHL por lactonasas y acilasas

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

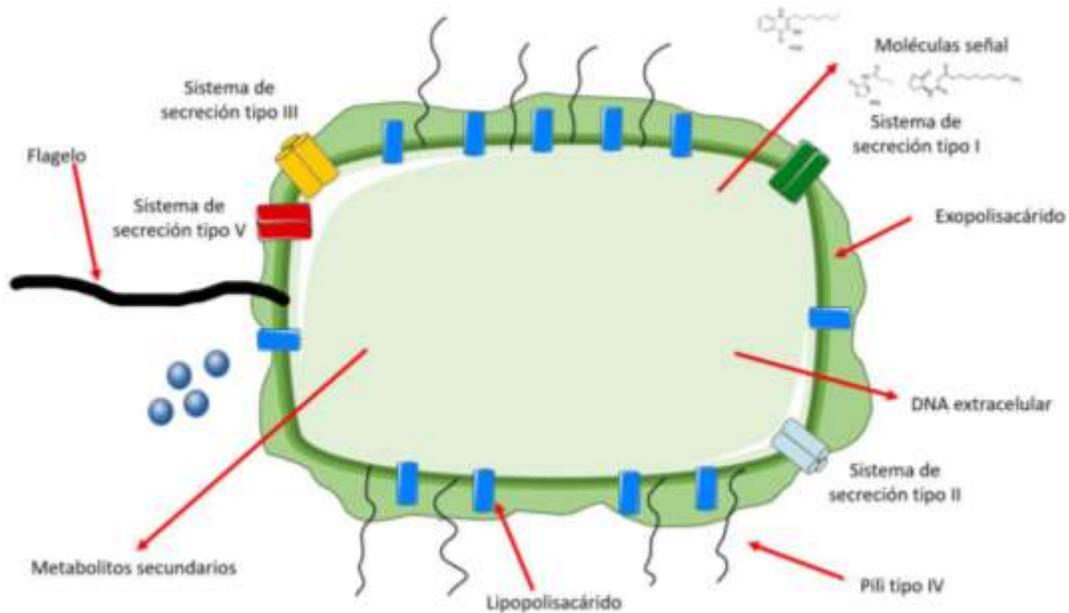


Figura 7 Factores de virulencia descritos en *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, con una longitud de 1 – 5 μm de largo y 0.5 – 1.0 μm de ancho, es aerobio facultativo, ya que puede crecer en cultivos aerobios y anaerobios con nitrato como aceptor final de electrones, también puede crecer en sistemas anaerobios con arginina. Este microorganismo es protótrofo ya que puede utilizar más de 100 moléculas orgánicas como fuente de carbono y/o de energía,

generalmente tiene la habilidad de crecer en medio mínimo de sales con una sola fuente de carbono o energía, crece bien a 37 °C (Diggle & Whiteley, 2020).

Tabla 2 Factores de virulencia presentes en *P. aeruginosa*

Factores de virulencia	Descripción	Referencias
Flagelo	Confiere motilidad a la célula, permite la adherencia a la mucosa de vías respiratorias por la proteína FliD	(Nadal-Jimenez, y otros, 2012)
Pili (tipo IV)	Da capacidad de adherencia al microorganismo y motilidad tipo "Swarming" provisto por las proteínas PilT y PilU	(Rocha, y otros, 2019)
Biopelícula	Compuesto por EPS (Exopolisacárido), su principal función es proteger al microorganismo de los peligros del exterior, su producción y maduración se encuentra regulada a los sistemas de QS y al estrés, es una de las principales causas de resistencia contra los antibióticos.	(Shao, y otros, 2020) (Lee & Yoon, 2017)
Lipopolisacárido	Se encuentra conformado por un dominio hidrófobo conocido como lípido A, un oligosacárido central no repetitivo y un polisacárido distal, participa en la activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa del huésped, también provoca respuesta inflamatoria desregulada.	(Rocha, y otros, 2019)
Sistemas de secreción	Secreción de diferentes moléculas directamente al citosol de las células del hospedero, que pueden funcionar como toxinas, también permiten la adhesión a las células. En <i>P. aeruginosa</i> se presentan los SST 1,2,3 y 6.	(Pena, y otros, 2019)
Pigmentos	Cuenta con pioverdina y fenazinas, la primeras son moléculas quelantes de hierro y se encuentran presentes cuando hay baja concentración de hierro, regula la producción de varios factores de virulencia como la toxina A, entre otros; las fenazinas son pigmentos que contienen nitrógeno en su estructura y son secretadas por el microorganismo, tienen un amplio espectro de toxicidad en organismos eucariontes y procariontes, la fenazina más estudiada es la piocianina, controla la expresión de varios genes dentro de los que destacan bombas de flujo y de actividad redox.,	(Nadal-Jimenez, y otros, 2012), (Rocha, y otros, 2019)
Adquisición de hierro	La adquisición de hierro, por diferentes mecanismos: i) producción de moléculas quelantes de Fe ³⁺ (pioverdina y pioquelina), ii) consumo de xenosiderofos que son producidos por otros microorganismos, iii) consumo de hierro de hemoproteínas del hospedero o iv) consumo de Fe ²⁺ por el sistema Feo.	(Cornelis & Dingemans, 2013)

P. aeruginosa es considerada como un patógeno oportunista, debido a que se encuentra en la lista de "Patógenos de prioridad" por la Organización mundial de la salud (OMS) (Organización Mundial de la Salud, 2017). Este microorganismo está asociado a diferentes infecciones nosocomiales del tracto respiratorio (pacientes que se encuentran intubados o con ventilación mecánica), infecciones en el tracto urinario, en sangre y en pacientes que tienen las barreras epiteliales comprometidas, como personas quemadas; de igual forma es común en pacientes con el sistema inmunológico comprometido o en individuos con fibrosis quística. En todos estos casos, las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son mediadas por la producción de estos factores de virulencia (Tabla 2) (Hauser, 2012).

Con frecuencia los aislados clínicos de *P. aeruginosa* son multidrogo resistentes (MDR) ya que poseen muchos mecanismos de resistencia como: degradación de antibióticos

por medio de la producción de enzimas, modificación de los sitios de unión de los antibióticos, disminución de la permeabilidad de los antibióticos y su expulsión mediante bombas de eflujo.

1.3.1 Sistemas de QS en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, cuenta con tres sistemas de QS (**Figura 8**), dos de ellos son homólogos a los sistemas LuxI/LuxR y el tercero es un sistema llamado señal de quinolonas de *Pseudomonas* (Pqs, por sus siglas en inglés), estos sistemas se encuentran relacionados jerárquicamente entre sí. El primer circuito es el sistema Las, que cuenta con una proteína homóloga a LuxI, llamada LasI, es la encargada de sintetizar al primer AI a base de AHL (3OC12HSL), quién se une a la proteína homóloga a LuxR mejor conocida como LasR. El complejo LasR-3OC12HSL activa la transcripción de genes blanco como algunos factores de virulencia, unos ejemplos son, la elastasa, la proteasa y la exotoxina A, además contribuye a la formación de la biopelícula. También se ve favorecida la expresión del gen *lasI* (que se encuentra río abajo del gen de *lasR*), el cual ayuda a que exista una retroalimentación del AI 3OC12HSL (Rutherford & Bassler, 2012). Otro de los genes que se regula de forma positiva por este sistema es el segundo homólogo a *luxI* que en este caso es *rhII* quien expresa la proteína RhII, ella es la encargada de sintetizar al segundo AI que también es una AHL, conocido como butanoil homoserin lactona (C4HSL), que al igual que el primer AI, se une a una proteína homóloga de LuxR, en este caso se une a la proteína RhIR. Una vez formado el complejo RhIR-C4HSL se induce el operón que codifica para las proteínas requeridas para la producción de los ramnolípidos, también induce la expresión de la elastasa, la proteasa LasA, la piocianina, la proteasa alcalina y las lectinas LecA y LecB (Diggle, y otros, 2008).

C4HSL es permeable a la membrana por lo que difunde libremente, en contraste 3OC12HSL requiere de transportadores para poder ser secretado, por lo cual utiliza a las proteínas transportadoras que conforman el complejo MexABOprM, por lo cual se ha visto que su concentración intracelular es tres veces mayor contra la concentración extracelular (Diggle, y otros, 2008).

En cambio, en los dos primeros sistemas descritos, el tercer sistema de QS en *P. aeruginosa* no es homólogo a los sistemas LuxRI, sino que está formado por el regulador transcripcional tipo LysR (LTTR). MvfR es activado por el ligando HHQ o por PQS. Ambos se unen y activan a MvfR, pero PQS es más potente para activar que HHQ, una vez activado el sistema es capaz de activar factores de virulencia que son regulados por el sistema RhIR, como piocianina, cianuro de hidrógeno, la elastasa y lectinas (Lesic, y otros, 2007). La acción del sistema Pqs sobre la proteína está mediada por la proteína PqsE (García-Reyes y otros, 2020)

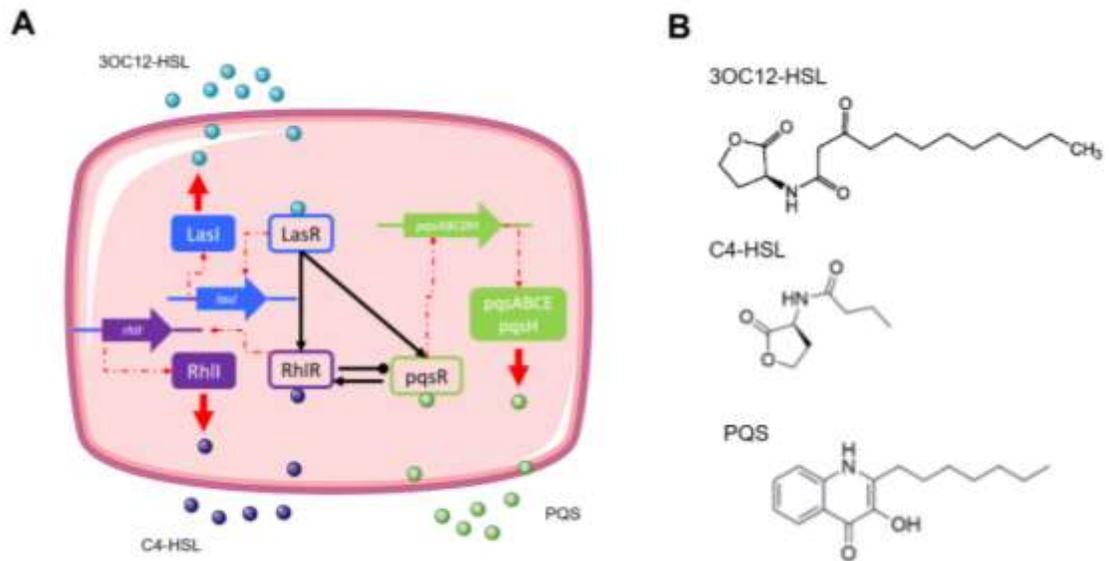


Figura 8 Sistemas de QS en *Pseudomonas aeruginosa*, *Las*, *Rhl* y *Pqs* se observa sus interacciones con sus moléculas señal (A) 3OC12-HSL; C4-HSL y PQS (B) Estructuras químicas de las moléculas señal.

1.3.2 Factores de virulencia asociados al QS en *P. aeruginosa*

Como otros patógenos, *P. aeruginosa* cuenta con un gran número de factores de virulencia que le proporcionan una mayor capacidad de infección, le ayudan a colonizar y establecer las infecciones en su hospedero, pero su producción tiene un alto costo metabólico, lo que requiere que la producción de estos esté regulada por medio de los sistemas de QS (**Tabla 3**) (Hauser, 2012), favoreciendo la colonización y habilidades de invasión. Estudios realizados por Pearson y colaboradores en el 2000, observaron que cepas deficientes en sistemas de QS, tuvieron una menor virulencia y mortalidad en modelos murinos, que aquellos modelos infectados con cepas competentes en los sistemas de QS.

Por ejemplo, el sistema LasIR activa la transcripción de los genes para la síntesis de la elastasa, proteasa alcalina, exotoxina A, proteasa y el sistema de secreción tipo (SST) II. En el caso de la elastasa es una metaloproteasa que interrumpe varias proteínas, como el colágeno, elastina, algunas inmunoglobulinas (IgG e IgA), componentes del complemento y citocinas (interferón gamma). La proteasa alcalina es una metaloproteasa dependiente de zinc que inhibe la fagocitosis, matando a los neutrófilos, por medio de la inhibición de la cascada del complemento ya que degrada a C3b (López-Jacome, y otros, 2019).

Por otra parte, el sistema RhlIR regula la producción de los ramnolípidos, cianuro de hidrógeno, elastasa y piocianina. La piocianina, es una fenazina azul que promueve el estrés oxidativo, de esta forma inhibe el movimiento ciliar. En quemaduras, la piocianina juega un rol muy importante ya que estimula la colonización, daño y promueve la

diseminación de la infección causada por este microorganismo (López-Jacome, y otros, 2019).

Tabla 3 Factores de virulencia asociados a *quorum sensing*

Genes regulado por QS	Proteína o factor de virulencia	Efecto en el hospedero durante la infección	Beneficio para <i>P. aeruginosa</i>	Referencia
<i>lasB</i>	Elastasa	Degradación de la elastina, colágeno y otras proteínas de matriz	Adquisición extracelular de hierro de proteínas del hospedero	(Wolz, y otros, 1994)
<i>lasA</i>	Proteasa	Rompimiento de la barrera epitelial	Actividad estafilocócica, evasión del sistema inmune y ayuda a la colonización.	(Kessler, Safrin, Olson, & Ohman, 1993)
<i>toxA</i>	Exotoxina A	Muerte celular	Establecimiento de la infección, mejora la colonización.	(Daddaoua, y otros, 2012)
<i>aprA</i>	Proteasa alcalina	Degradación del sistema de complemento y citocinas	Evasión del sistema inmune y ayuda a la persistencia de la colonización.	(Laarman, y otros, 2012)
<i>rhlAB, rhlC</i>	Ramnolípidos	Necrosis de macrófagos y linfocitos polimorfonucleares	Evasión del sistema inmune, formación de biopelícula	(Jensen, y otros, 2006) (Lequette & Greenberg, 2005)
<i>lecA</i>	Lectina	Parálisis de cilios de las vías respiratorias	Establecimiento de la infección, mejora la colonización.	(Adam, Mitchelle, Schumander, Grant, & Schumander, 1997)
<i>hcnABC</i>	Cianuro de hidrógeno	Interrumpe la respiración celular, disminuye la función pulmonar	Mejora la colonización.	(Ryall, Davies, Wilson, Shoemark, & Williams, 2008)
<i>phzABCDEFG</i> <i>, phzM</i>	piocianina	Efectos oxidativos, causan estrés oxidativo; parálisis de cilios de las vías respiratorias; retarda la respuesta inflamatoria	Establece infección; ayuda a la colonización; evade respuesta inmune	(Denning, y otros, 1998)
<i>plcB, plcH, plcN y pldA</i>	Fosfolipasas	Daño en la membrana celular hidroliza varios fosfolípidos de la membrana de la célula del hospedero	Induce la hemólisis que ayuda a la obtención de hierro.	(Ryall, Davies, Wilson, Shoemark, & Williams, 2008)

1.3.3 Moléculas utilizadas para QQ en *P. aeruginosa*

Uno de los objetivos de utilizar moléculas inhibidoras de QS ha sido disminuir la maduración de las biopelículas que contribuyen en resistencia a antibióticos protegiendo a las bacterias en contra de estos. En *P. aeruginosa* se han propuesto el uso de varias moléculas las cuales pueden llegar a inhibir la síntesis de los AI, reduciendo la capacidad de secretar los AI o bloqueando el sitio de unión en las proteínas receptoras. Uno de los métodos que se ha utilizado es el uso de moléculas que inactiven a las HSL ya que son las encargadas de encender los sistemas de QS en *P. aeruginosa* (Taylor, Yeung, & Hancock, 2014)

Se han utilizado varias enzimas para el QQ para disminuir los factores de virulencia, motilidad y formación de biopelículas en *P. aeruginosa*, algunas de ellas son las enzimas, AiiA, YtnP y Y2-aiiA de *Burkholderia cepacia* (Malesêvic, y otros, 2020) SsoPox de *Sulfolobus solfataricus* (Hiblot, y otros, 2012) y AiiM de *Mycobacterium testaceum* StLB 037 (López-Jacome, y otros, 2019).

1.3.4 Resistencia a los sistemas de QQ

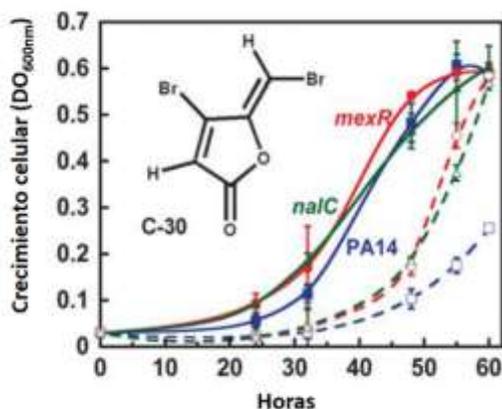


Figura 9 Crecimiento de *P. aeruginosa* PA14, mutante por transposon en *mexR*, y mutante por transposon *nalC*, línea continua es sin presencia de C-30, con línea punteada es con presencia de C-30

En contraste con los antibióticos que generan una presión de selección por la inhibición de crecimiento favoreciendo la generación de resistencia a estos, la inhibición de los sistemas de QS busca evitarla, disminuyendo la síntesis de los factores de virulencia, sin inhibir el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, solo se han realizado estudios *in vitro*, generalmente en medios de cultivos ricos en nutrientes, donde la inhibición de QS no se ve reflejada en una inhibición del crecimiento bacteriano (Dong & Lian-Hui, 2005).

Se ha visto que, en medios de cultivo mínimos con fuentes de carbono como adenosina o caseína, se requieren de la síntesis de enzimas reguladas por QS, para lograr un crecimiento óptimo. En estos medios de cultivo se puede inhibir el QS y por ende el crecimiento, de esta forma se establece la presión de selección necesaria para la selección de resistencia. (Turan & Engin, 2018).

En el 2011 Maeda y colaboradores estudiaron a *P. aeruginosa* cultivada en un medio mínimo con una fuente de carbono (adenosina) que requiere del sistema de QS (sistema Las) para sintetizar las enzimas necesarias para su degradación (nucleósido hidrolasa). De esta forma al inhibir los genes regulados por QS por la furanona C-30, disminuye la expresión de la nucleósido hidrolasa y por tanto el catabolismo de la fuente de carbono, inhibiendo el crecimiento. En esta condición se generó una resistencia a la furanona, mediante mutaciones que inactivan el gen *mexR*, que es un represor de la bomba de expulsión de antibióticos MexAB-OprM y al gen *nalC* que también codifica un regulador negativo de la misma bomba (**Figura 9**) (Maeda, y otros, 2011)

Al estar las bombas MexAB-OprM expresadas, pueden expulsar a la furanona C-30 (**Figura 10**), esto observaron que sucedía en aquellas cepas clínicas de *P. aeruginosa* que no habían sido expuestas a la furanona C-30, pero eran MDR. (García-Contreras y otros, 2013).

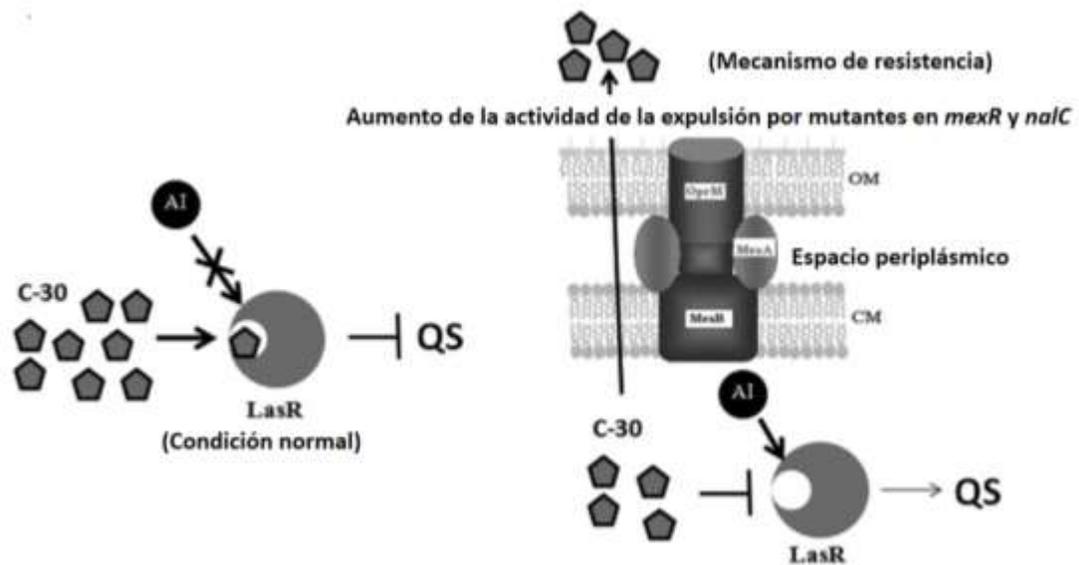


Figura 10 Mecanismo de resistencia descrito a la furanona C-30

En el caso de las enzimas inhibitoras de QS se piensa que es menos probable que se genere resistencia, porque ellas actúan en la zona extracelular, pero se han propuesto hipótesis en las cuales se pueden llegar a la producción en exceso de AI o inclusive, que exista la producción en enzimas capaces de hidrolizar las enzimas utilizadas en QQ (Turan & Engin, 2018).

2. Justificación

P. aeruginosa es un microorganismo patógeno oportunista, causante de varias enfermedades en pacientes que se encuentran inmunosuprimidos; además es resistente a una gran variedad de antibióticos y presenta un gran número de factores de virulencia, regulados por QS. Por otra parte se ha descrito resistencia a la furanona C-30, la cual es mediada por la bomba MexAB-OprM que la expulsa al exterior de la bacteria. Este efecto se ha observado en medios mínimos, como el M9 adicionado con adenosina como única fuente de carbono. El catabolismo de la adenosina depende del sistema Las, probablemente debido a que el metabolismo de la adenosina ayuda al aumento de la patogenicidad, además que la transcripción del gen *nuh* que codifica la enzima que degrada la adenosina (nucleósido hidrolasa), que de igual forma es regulado positivamente por LasR. Un estudio realizado por López Jácome, demostró que en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con quemaduras, en presencia de la enzima lactasa AiiM, se reduce los factores de virulencia dependientes de QS como elastasa, HCN, piocianina y la actividad de proteasa alcalina (López-Jacome, y otros, 2019). Asimismo, se ha observado que AiiM no inactiva antibióticos como los β -lactámicos, por lo que se podría utilizar de forma adecuada contra infecciones causadas por *P. aeruginosa*; además ninguna cepa presentó mecanismos de resistencia al efecto de esta molécula. De tal manera que se quiere corroborar si *P. aeruginosa* en presencia de la enzima AiiM en las condiciones de medio mínimo con adenosina como fuente de carbono puede presentar resistencia.

3. Hipótesis

Se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de generar resistencia a diferentes compuestos antimicrobianos que inhiben su desarrollo e inhibidores de “*quorum sensing*”, por lo tanto, sugerimos que la bacteria puede generar resistencia a enzimas que degradan acil-homoserin lactonas, en condiciones de presión de selección.

4. Objetivos

4.1. General

Determinar si *Pseudomonas aeruginosa* desarrolla mecanismos que le confieran resistencia contra la lactonasa AiiM inhibidora de sistemas de “*quorum sensing*”.

4.2. Específicos

1. Realizar la purificación de la enzima AiiM y determinar su actividad.
2. Establecer las condiciones ideales de crecimiento de la bacteria en el cual la inhibición del QS inhiba también su crecimiento.
3. Obtener y aislar células resistentes a la inhibición de QS mediado por la enzima AiiM.
4. Caracterizar a las células resistentes a la enzima AiiM.

5. Metodología

5.1. Cepas bacterianas

Para este estudio se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* descritas en la **Tabla 4**.

Tabla 4 Cepas utilizadas durante el proyecto

Cepa	Descripción
PA14 WT	Cepa de referencia de alta virulencia.
PAO1 WT	Cepa de referencia de media virulencia.
PA14 $\Delta lasR \Delta rhIR$	Deficiencia de los receptores de AHL.
PAO1 $\Delta lasI \Delta rhII$	Deficiencia de las sintasa de los dos AI de AHL.
PAO1 $\Delta lasR \Delta rhIR$	Deficiencia de los dos receptores de AHL.
PAO1 $\Delta rhII$	Deficiencia en la sintasa del AI C4-HSL.
PAO1 $\Delta rhIR$	Deficiente en el receptor del AI C4-HSL.
PAO1 $\Delta lasR$	Ausencia del receptor del AI 3OC12-HSL.
PA14 Δnuh	Ausencia de la actividad hidrolasa de adenosina.
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Deficiente en la síntesis del AI, se utiliza como biosensor para AHL de cadena corta (C4HSL).
<i>C. violaceum</i> WT	Productor de AHL de cadena corta.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 PZLR4-<i>traG::LacZ</i>	Biosensor para la detección de AHL de cadena larga.
<i>Escherichia coli</i> M15/pQE30 AiiM	Transformante con plásmido para la producción de la enzima AiiM, donada por el Dr. Toshinari Maeda.

5.2. Crecimiento bacteriano

Los crio-cultivos de *P. aeruginosa* se resembraron en placas de agar LB a $36.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h, para obtener colonias aisladas. Posteriormente se incubaron en caldo LB a $36.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 200 rpm por 20 h, de estos cultivos obtenidos se realizaron pases al siguiente medio, inoculando una densidad óptica (DO) final de 0.05 a 600 nm.

Se utilizó el medio M9 adicionado con 1% de adenosina como única fuente de carbono con el amortiguador de pH MOPS (ácido 4-Morfolinepropanesulfónico, ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico) a pH 7.0 y para curvas de crecimiento con las enzimas inhibitoras de *quorum sensing*. Mientras que como medio enriquecido se utilizó LB para el crecimiento de todas las células y para la obtención de sobrenadantes de las cepas mutantes que fueron tratadas con la enzima AiiM.

5.3. Determinación del medio en el cual se inhibió el QS

Con las cepas mutantes de *P. aeruginosa* descritas en el punto 5.1, se obtuvieron colonias aisladas, las cuales fueron sometidas al proceso de crecimiento bacteriano

(punto 5.2), y se inoculó medio M9 con 1% de adenosina, MOPS pH 7.0 con una DO_{600nm} inicial de 0.05, se incubó por 72 h a $36.5^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ a 200 rpm.

Se realizó la lectura de la DO_{600nm} cada 24 h por las 72 h, para obtener la curva de crecimiento y determinar si esta condición era la adecuada para utilizarlo como un medio en el que se requiere del QS para poder crecer.

5.4. Obtención y purificación de la enzima inhibidora de QS AiiM

5.4.1 Expresión de la enzima AiiM

La enzima que se probó en el desarrollo de este proyecto fue la lactonasa AiiM, la cual es sintetizada por la transformante *E. coli* M15/pQE30 AiiM, donada por el Dr. Toshinari Maeda, por lo cual se procedió a obtener la enzima y purificada con la siguiente metodología.

Del crio-cultivo de *E. coli* M15/pQE30 AiiM, se obtuvieron colonias aisladas, en cajas de LB adicionadas con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina (Cayman chemical Item 14417) y 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina (Sigma Aldrich K1876), de las cuales se seleccionó una colonia y se realizó un “*over night*” (ON) a $36.5^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ a 200 rpm en medio LB con 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilina y 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamicina. Con el crecimiento obtenido, se tomó una alícuota y se ajustó 1L del medio LB con 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilina y 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamicina una DO_{600nm} inicial de 0.05 y se incubó en las mismas condiciones de temperatura y RPM hasta obtener un DO_{600nm} de 0.5. Posteriormente se adicionó 1mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) para realizar la inducción de la proteína AiiM. El cultivo se dejó incubando por 5 horas y se determinó el crecimiento. Después de la inducción, se centrifugó a 9820 G por 10 min a $4^{\circ}C$, se conservó el *pellet* bacteriano a $-20^{\circ}C$ hasta su uso.

Los *pellets* fueron resuspendidos en buffer de sonicación (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 15 mM imidazol, pH 8.0 ajustado) en una relación de 200 μL por 0.8 DO_{600nm} , más 50 μM de PMFS (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) como inhibidor de proteasas. El proceso de sonicación se realizó a 30% de amplitud por 1.5 minutos en frío, con pulsos de 15 segundos y reposo de 30 segundos, se tomaron 15 μL de extracto total y se conservaron en un tubo, se recuperó el sobrenadante centrifugando el extracto total a 27,216 G por 30 minutos a $4^{\circ}C$, conservó en refrigeración hasta el proceso de purificación de la enzima.

5.4.2 Purificación de la lactonasa AiiM

El sobrenadante filtrado se pasó por una columna de resina (Qiagen® Ni-NTA Agarosa) de 300 μL , previamente reconstituida con sulfato de níquel, se dejó reposar por 30 minutos en frío para asegurar que la proteína se uniera con su etiqueta de histidinas a la resina de níquel.

Para eliminar proteínas contaminantes, se realizó un primer lavado con una solución de 1 M de NaCl, seguido de lavados con buffer de lavado (50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM

NaCl, pH 8.0 ajustado) con dos concentraciones de imidazol (20 mM y 50mM), para recuperar la proteína, se pasó por la columna 3 volúmenes de buffer de elución (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0 ajustado), se recolectaron las eluciones y se guardaron hasta su uso en refrigeración, finalmente se adicionó 2 volúmenes de buffer de limpieza (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol, pH 8.0 ajustado), para limpiar por completo la columna.

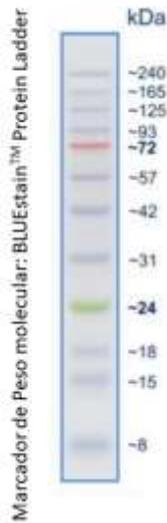


Figura 11 Marcador de peso molecular: BLUEstain™ Protein Ladder

Todas las muestras recolectadas durante el proceso se prepararon para realizar un SDS page (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), para esto se tomaron 50 µL de muestra que se les adiciono 12 µL de buffer de laemmli 4X (azul de bromofenol 4X con 10 µL de β-mercaptoetanol), se homogeneizó y se colocó en baño maría a 100°C por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se colocaron en un gel de poliacrilamida, se utilizó el marcador de peso molecular BLUEstain™ Protein Ladder (**Figura 11**) en un gel de poliacrilamida con un gel concentrador al 5% y de resolución al 12%, el corrimiento de la electroforesis se ejecutó en las siguientes condiciones: Buffer de corrimiento (Bis-Tris 10%, SDS al 2%, glicina) y se corrió a 80V, hasta que las muestras pasarán el límite del gel concentrador, el corrimiento del gel de resolución se realizó a 120V por una hora y media aproximadamente.

Para teñir el gel, se utilizó el reactivo de tinción (azul de brillante de coomassie, disuelto en etanol, aforado con ácido acético y agua desionizada), se colocó en agitación hasta que el gel estuviera completamente teñido, se realizaron procesos de calentamiento en microondas, para ayudar a teñir el gel. Para desteñir el gel, se enjuagó con agua corriente y se colocó solución desteñidora (etanol, ácido acético, agua desionizada), se puso en agitación y de igual forma se realizaron calentamientos de 30 segundos en microondas para ayudar a eliminar el colorante del gel. Se realiza la visualización del gel, analizando el marcador de PM, identificando la banda de 25 kDa, y en las eluciones se buscó una banda cercana a 27 kDa.

De las fracciones en las que se detectó la banda de la proteína (aproximadamente 27 kDa), se realizó una diálisis, colocando la solución en una membrana de celulosa (Sigma aldrich, Dialysis tubing avg. Flat width 25 mm) con un tamaño de poro de 12 kDa, para eliminar en buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol pH de 8.0). La diálisis se dejó por 48 h, a temperatura ambiente, en constante agitación. Se recuperó la solución del interior de la membrana.

La concentración de la enzima se midió con Nanodrop a 280 nm, en el programa de medición de concentración de proteínas o por el método de Bradford.

5.4.3 Determinación de la función de la enzima AiiM

Para determinar la función de la enzima se realizaron los ensayos de disminución de factores de virulencia como actividad caseinolítica y piocianina descritos en el punto 5.7, los ensayos se realizaron en la cepa PA14 WT y PA01 WT, colocando la enzima en una concentración final de 5 y 10 µg/mL, con un control negativo al cual no se le adicionó enzima.

5.5. Obtención de células resistentes a la enzima AiiM

Para obtener células resistente a la lactonasa AiiM, se decidió utilizar a la cepa PA01 WT, el motivo de selección, se describe en la sección correspondiente de resultados, para esto se procedió a realizar los pasos del crecimiento bacteriano (punto 5.2) y después de haber obtenido el ON se realizó un pase en 5 mL de medio mínimo M9 con adenosina 1%, MOPS pH 7.0, con una DO_{600nm} inicial de 0.05, esto se realizó por triplicado y en tres condiciones distintas: SE (Sin enzima), 5 (5 µg/mL de AiiM) y 10 (10 µg/mL de AiiM), se incubaron a $36.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm por 72 h. Se realizaron lecturas de la DO_{600nm} cada 24 h para ir monitoreando el crecimiento obtenido de cada uno de los cultivos realizados. Pasadas las 72 h de cultivo se procedió a realizar otro pase en otros tubos con las mismas condiciones antes mencionadas, esto se realizó por 11 pases, lo que fue igual a 744 h de cultivo.

Después del pase tres, se guardaron crio-cultivos de las muestras obtenidas, para analizar la presencia de mutantes. Para los crio-cultivos se añadieron 400 µL de glicerol 50% y 800 µL del cultivo, estos se almacenaron a -70°C .

5.5.1 Búsqueda de colonias resistentes a la enzima AiiM

De aquellos puntos donde el crecimiento de los cultivos con enzima fue similar al crecimiento de los cultivos obtenido sin enzima, se procedió a realizar siembras en cajas LB de los crio-cultivos guardados. Se seleccionaron 10 colonias aisladas de cada crio-cultivo, a las cuales se les realizó la medición de factores de virulencia en presencia de 5 µg/mL de AiiM en medio LB, para ver cuáles de ellos presentaban fenotipos similares a los factores de virulencia (actividad caseinolítica y piocianina) de las células WT sin enzima. Aquellas colonias que presentaron fenotipos similares, se guardaron en glicerol (como se describió anteriormente) y se volvió a repetir la medición de los factores de virulencia por triplicado.

5.6. Obtención de sobrenadantes

De los cultivos obtenidos en LB se midió la DO_{600nm} y se utilizó como blanco medio LB o medio M9 con 1% de adenosina, según el medio en el cual se había obtenido el crecimiento bacteriano. Cada cultivo se centrifugó a 9200 G por 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0.22 µm, para evitar el paso de células bacterianas. Se conservan en refrigeración a 4°C en caso de no utilizarlos inmediatamente para la determinación de factores de virulencia.

5.7. Determinación de factores de virulencia

Para la determinación de los factores de virulencia, los cultivos que se utilizaron para obtener sobrenadantes fueron obtenidos de cultivos en LB con un tiempo de incubación de 20 h, con estos se realizó la medición de actividad caseinolítica y producción de piocianina como factores de virulencia de importancia regulados por QS.

Esto se realizó con las cepas mutantes que se obtuvieron en el punto 5.5 y cultivos de la cepa PAO1 WT.

5.7.1 Determinación de actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica se realizó con modificaciones a lo descrito por López-Jácome y colaboradores 2019. En una placa de 96 pozos se adicionó 100 μ L de la solución sustrato (azocaseína 1.25% disuelta en buffer de proteasa (Tris base 20 mM, CaCl_2 1 mM, pH 8.0 ajustado con HCl concentrado)), posteriormente se adicionó 5 μ L del sobrenadante (esto se realiza por duplicado y por cada una de las muestras), se agitó levemente con la punta de la pipeta y se incubó a 36.5 ± 0.5 °C por 40 minutos. Pasado el tiempo, se procedió a tomar 50 μ L de los pozos y se vertieron en tubos de 1.5 mL con 200 μ L de ácido nítrico 1%. Se agitó levemente y se centrifugó por 5 minutos a 9200 G; del sobrenadante obtenido, se adicionaron 50 μ L en una placa de 96 pozos más 150 μ L de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5%, se mezcló con la punta de la pipeta y se realizó la lectura a 405 nm en el equipo VÍCTOR® Nivo™.

Los resultados se reportaron como una absorbancia a 405 nm sobre $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

5.7.2 Determinación de la producción de piocianina

Se realizó conforme a lo descrito por López-Jácome y colaboradores, 2019, con algunas modificaciones. De los cultivos obtenidos en LB con y sin la lactonasa AiiM, se obtuvieron los sobrenadantes como se mencionó en el punto 5.6, posteriormente se tomaron 400 μ L del sobrenadante y se adicionaron en tubos cónicos de 1.5mL con 210 μ L de cloroformo; cada tubo se mezcló en vortex por 2 minutos. Los tubos se centrifugaron 2 minutos a 9200 G y se recolectó 150 μ L de la fase orgánica, la cual se depositó en tubos nuevos cónicos de 1.5 mL con 400 μ L de 0.1 N HCl. Se mezcló en vortex por 2 minutos y se volvieron a centrifugar los tubos a 9200 G por 1 minuto, las muestras se leyeron a 520 nm en el equipo VÍCTOR® Nivo™.

Los resultados se reportaron como una absorbancia a 520 nm sobre $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

5.8. Detección de los AI de *P. aeruginosa*

5.8.1 Extracción de AHL

Para la extracción de AHL, se utilizó una colonia fresca de cada una de las cepas a analizar, de la colonia se colocó un ON en medio LB a 36.5 ± 0.5 °C a 200 rpm. Posteriormente se midió la $\text{DO}_{600\text{nm}}$, y del crecimiento obtenido, se inocularon matraces

Erlenmeyer de 250 mL, con 20 mL de medio LB con un cultivo inicial de 0.05 de DO_{600nm} , en dos condiciones, con 5 $\mu\text{g/mL}$ de AiiM y sin enzima. Los cultivos se incubaron en las siguientes condiciones: 20 h a $36.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron los cultivos a 9200 G por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.22 μm . El sobrenadante filtrado se colocó en tubos falcón de 50mL y se le adicionó un volumen de acetato de etilo acidificado con ácido acético glacial 0.5% (v/v), se vortexeo a máxima potencia por un total de 3 minutos (se debe de observar una mezcla homogénea), se procedió a centrifugar a 9200 G por 5 minutos. La fase superior se colocó en tubos de 1.5 mL y se dejó evaporar en la campana de extracción por un total de 48 h. Los tubos ya secos, se disolvieron con un total de 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), se guardaron a -20°C hasta su uso.

5.8.2 Detección de C4HSL

Para la detección de C4HSL se utilizó el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026, el cual se recuperó de un crio-cultivo, se procedió a sembrarlo en cajas de LB e incubarlas a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h. Del crecimiento obtenido, se recuperó una colonia a la que se le realizó un pre cultivo en caldo LB a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, a 200rpm por 48h.

5.8.2.1 Prueba T

Del precultivo se realizó la prueba T, que consiste en colocar en la parte central de una caja de LB, una estría continua de la cepa productora de AHL y de forma perpendicular se coloca una estría continua del cultivo del biosensor *C. violaceum* CV026, sin tocar la estría del cultivo del productor de AHL. Como control positivo se utiliza la cepa de *C. violaceum* WT. Todas las cajas se proceden a incubar a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h.

5.8.2.2 Detección en sensidisco

Se realizó en cajas de LB una siembra masiva del precultivo de *C. violaceum* CV026, paso seguido, se colocaron sensidiscos estériles a los que se les adicionaron los extractos obtenidos de las AHL de las cepas de interés. Como control positivo se utilizó a C4HSL 2 μM disuelto en DMSO, y de control negativo se utilizó agua estéril. Las cajas se incubaron a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h.

5.8.3 Detección de 3O12HSL

Para la detección de HSL de cadena larga, se utilizó al biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG::lacZ*. Del criovial de la cepa de *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG::lacZ* se creció en caja de LB con gentamicina 30 $\mu\text{g/mL}$, se incubó a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h, se seleccionó una colonia y se inoculó un matraz de 50 mL con 5 mL de medio LB con gentamicina 30 $\mu\text{g/mL}$, se incubó a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h a 200 rpm. Se midió la DO_{600nm} del cultivo, para inocular tubos de 16 mm por 150 mm con 2 mL del mismo medio, con una DO_{600nm} inicial de 0.05, en cada tubo se adicionó 2 μL de los extractos previamente obtenidos con y sin la presencia de la lactonasa AiiM. Se colocaron otro juego de tubos con extracto obtenido sin enzima, pero se les adicionó 5

µg/mL de AiiM. Como control positivo se utilizó una solución preparada de 3O12HSL a una concentración de 1 µM y como control negativo se utilizó agua desionizada estéril. Todos los tubos se incubaron a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h a 200 rpm, pasado el tiempo de incubación se midió la $DO_{600\text{nm}}$ de todos los cultivos. Se recolectó 1.5 mL de los cultivos en tubos de 2.0 mL y se centrifugaron a 9600 G por 5 minutos. Los *pellets* obtenidos se conservaron y se descartó el sobrenadante. A los *pellets* se les realizaron 3 lavados con 500 µL de solución salina 0.9%, se vortexeo por 2 minutos (se debe resuspender el *pellet*) y centrifugó a 9600 G por 5 minutos.

Realizados los 3 lavados, se resuspende el pellet en vortex en solución salina 0.9% por 2 minutos. Del cultivo resuspendido en solución salina 0.9%, se tomaron 20 µL y se adicionaron en tubos de 1.5 mL junto con 80 µL de solución de permeabilización (100 mM Na_2HPO_4 , 20 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.8 mg/mL CTAB, 0.4 mg/mL desoxicolato de sodio y 5.4 µL/mL β-mercaptoetanol), se homogeneizó y se incubó por 30 minutos a $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ a 200rpm. Transcurrido el tiempo se le adicionó 600 µL de solución sustrato (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 1 mg/mL ONPG y 2.7 µL/mL β-mercaptoetanol), se homogeneizó la mezcla y se incubó por 45 minutos en las mismas condiciones. Finalmente se agregaron 700 µL de solución STOP (1 M Na_2CO_3) y se determinó la absorbancia a 420 nm y 550 nm. Cuando la $Abs_{420\text{nm}}$, fue mayor a 0.5, se realizó una dilución 1:10 o 1:2, según fuera el caso.

La actividad se reporta en unidades de Miller, para lo cual se utiliza la siguiente fórmula:

$$1000 \times \frac{Abs_{420\text{ nm}} - (1.75 \times Abs_{550\text{nm}})}{t \times v \times DO_{600\text{nm}}}$$

Donde:

- $Abs_{420\text{nm}}$ = Absorbancia del amarillo de o-nitrofenol
- $Abs_{550\text{nm}}$ = Absorbancia de amarillo de o-nitrofenol, se descarta la densidad celular presente
- $DO_{600\text{nm}}$ = Crecimiento del cultivo
- t = tiempo de la reacción en minutos
- v = volumen del cultivo de crecimiento en mL

6. Resultados

6.1. Purificación de la enzima AiiM

La expresión y purificación de la enzima se realizó conforme a lo descrito por López-Jácome y colaboradores, 2019, con algunas modificaciones. El sistema de expresión de la enzima fue *E. coli* M15/pQE30 AiiM y la inducción se realizó con una DO_{600nm} de 0.5 con 1mM de IPTG por 5 h. Con estas condiciones se mejoró la expresión. Se observa en la **Figura 12**, a la altura de 27 kDa en los carriles 7,8 y 9 que existe una alta concentración la enzima, durante el proceso de purificación se observa que varias de las proteínas contaminantes no se lograron eliminar, pero la pureza es de 85%, determinada por ImageJ, a una concentración de 250 mM de Imidazol.

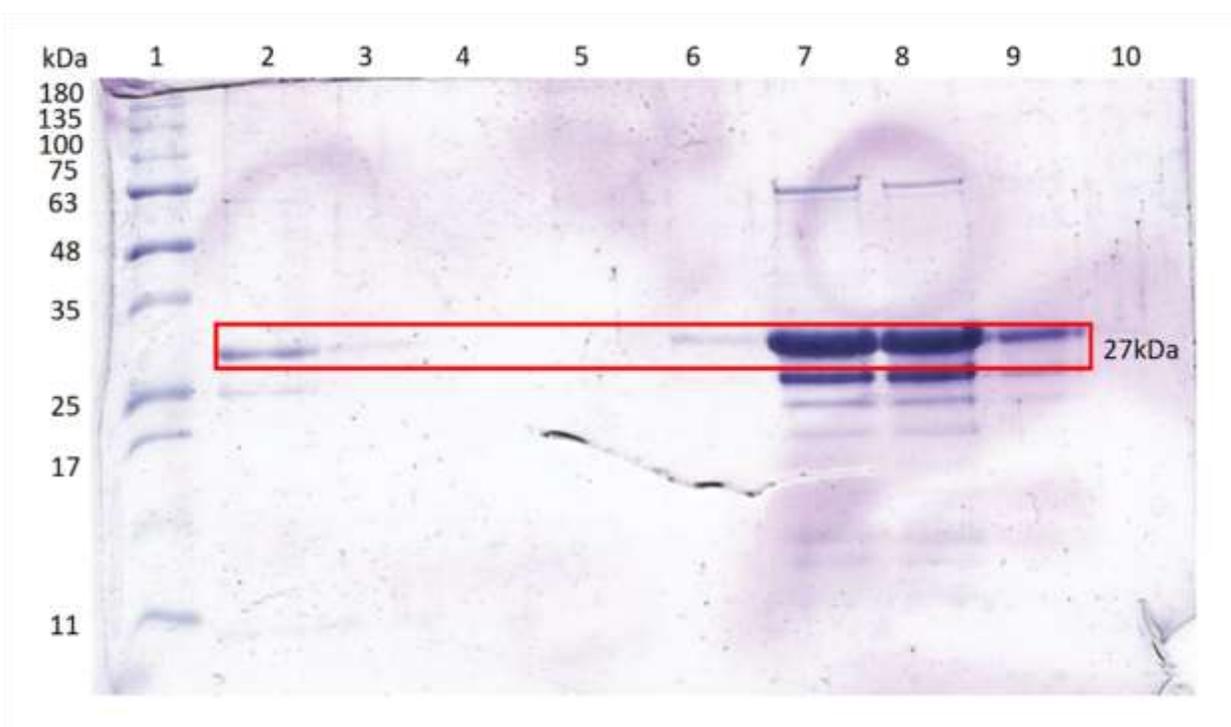


Figura 12 Gel SDS PAGE de la primera purificación de la enzima AiiM. Carril 1: Marcador de PM, carril 2: Concentrado de primera purificación, carril 3: después de columna, carril 4: lavado con 10 mM imidazol, carril 5: lavado con 20 mM imidazol, carril 6: lavado con 50 mM imidazol, carril 7: primera fracción de elución con 200mM imidazol, carril 8: segunda fracción de elución con 200mM, carril 9: tercera fracción de elución con 200mM, carril 10: lavado con 400 mM imidazol.

Posteriormente se realizó la diálisis para la eliminación del glicerol e imidazol de las fracciones en las cuales se encontró la fracción de la enzima, realizada en las condiciones previamente descritas, la proteína ya dializada, se almacenó a $-20^{\circ}C$, hasta su uso.

La concentración de la proteína se calculó por medio del Nanodrop, y se confirmó con el método de Bradford, obteniendo una concentración total de 290 $\mu g/mL$, ya con la corrección de la pureza previamente obtenida.

6.2. Determinación de actividad anti virulencia de la enzima AiiM

Para determinar si la enzima AiiM obtenida era activa, se procedió a determinar la inhibición de factores de virulencia en la cepa PAO1 WT, para esto se utilizó la proteína en tres concentraciones 2 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL. En la **Figura 13** se muestra como se inhibe la producción de dos factores de virulencia asociados a QS, se observa en la figura que desde los 2 µg/mL de AiiM existe una disminución de ellos, se ve claramente que con una concentración de 5 µg/mL y 10 µg/mL de la enzima, la actividad caseinolítica se abate en su totalidad; por otro lado, se observa una disminución de la producción de piocianina en presencia de la lactonasa AiiM, aunque en menor medida que en el caso de la actividad caseinolítica. Esto se puede deber a que la producción de piocianina, está regulada por los sistemas Rhl y Pqs. Con estos datos, se concluyó que la enzima se encontraba activa y se pudo utilizar para los propósitos deseados en este estudio.

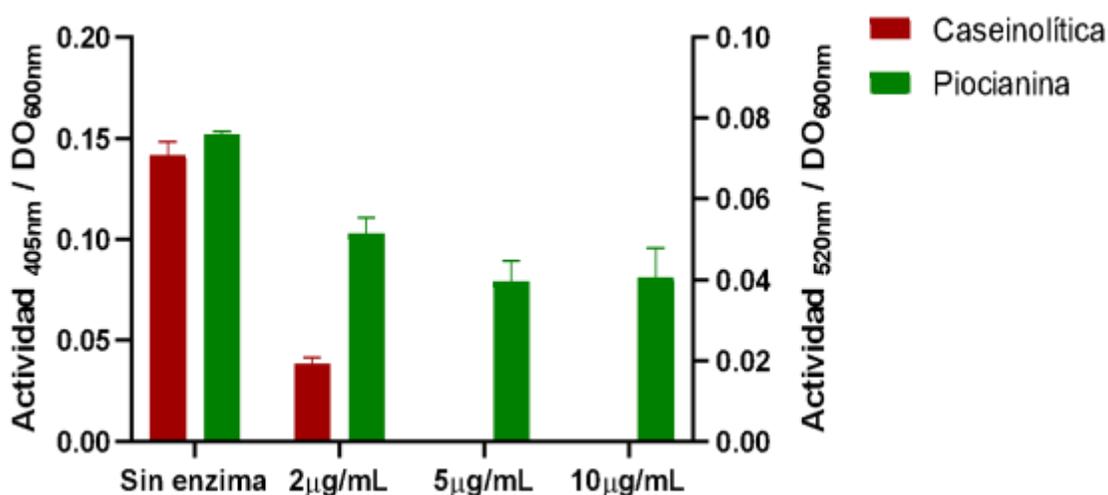


Figura 13 Determinación de la actividad anti-virulencia de la enzima AiiM sobre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 WT

6.3. Condiciones ideales de crecimiento

En el crecimiento que se obtuvo en el medio mínimo M9 con adenosina 1%, MOPS pH 7.0 (**Figura 14**), se observó que la mutante PA14 Δnuh no tuvo un crecimiento favorable, lo que era de esperarse, ya que es una mutante del gen que codifica para la hidrolasa de la adenosina, por esta razón se utilizó como control negativo de crecimiento. Por el contrario, las cepas PAO1 WT y PA14 WT, su crecimiento a las 72 h fue favorable en ambos casos, lo que nos indica que tienen los sistemas de QS activos. Cuando a las cepas PAO1 WT y PA14 WT se les adicionó 5 µg/mL de la enzima AiiM, el crecimiento disminuyó considerablemente, en el caso de la cepa PA14 WT el crecimiento se abatió en estas condiciones. Con estos resultados, observamos que la enzima si inhibió el sistema LasRI, necesario para activar la hidrolasa de adenosina, además se observó que la cepa a utilizar sería PAO1 WT, porque fue la cepa que presentó un crecimiento

considerable en presencia de la enzima AiiM, lo que se requiere para poder generar mutantes.

Las mutantes de las cepas PAO1 y PA14 en el sistema Las, se comportan muy similar a lo ocurrido en PA14 Δnuh , este mismo fenómeno ocurre en las cepas mutantes PAO1 y PA14 en el sistema Rhl y las dobles mutantes en sistemas Las y Rhl, por lo que se puede concluir que este es el medio adecuado para realizar la presión de selección en presencia de la enzima AiiM.

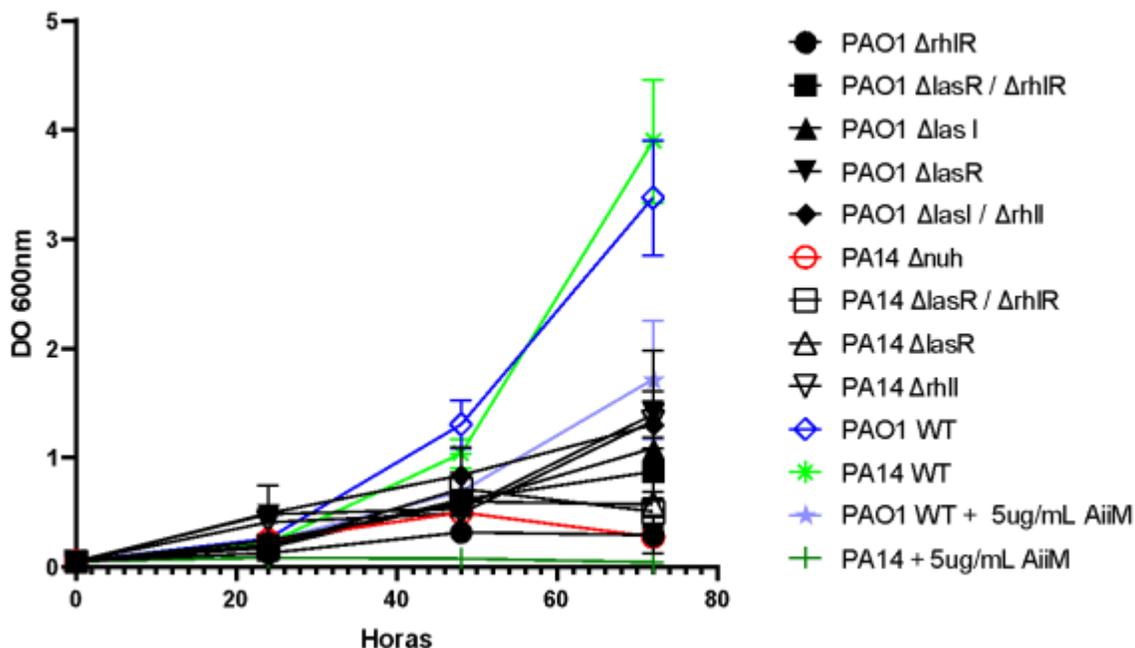


Figura 14 Crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en medio mínimo M9 con 1% Adenosina MOPS pH 7.0

6.4. Obtención de bacterias resistentes a la enzima AiiM

Una vez que ya se conocía cuál era la cepa que se utilizará, y el medio adecuado para generar mutantes resistentes a la enzima AiiM, se procedió a realizar el proceso de crecimiento de los cultivos de la cepa PAO1, todos los cultivos se iniciaron a partir de una sola colonia. Los cultivos se realizaron en tres condiciones: sin enzima (SE), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la enzima AiiM.

En la **Figura 15** se puede observar que en los primeros 6 pases, el crecimiento obtenido en los cultivos de la cepa PAO1 SE, eran los que presentaban un mayor crecimiento, en comparación a los cultivos de la cepa PAO1 con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AiiM, esto se debe a que el metabolismo de la adenosina está regulado por QS, y al existir una enzima que degrada a los AI, la señal de QS es casi nula, lo que provoca que no se tenga un crecimiento favorable. En la **figura 15**, se observa que desde el pase 5, las cepas PAO1 10 AiiM 1 y PAO1 10 AiiM 3, empezaron a contar un crecimiento mayor,

en comparación a los tres cultivos de las cepas PAO1 5 AiiM y de la cepa PAO1 10 AiiM 2, pero no era similar a los tres cultivos de la cepa PAO1 SE. A partir del pase 7, el cultivo de la cepa PAO1 10 AiiM 1, presentó un crecimiento similar a los cultivos de las cepas PAO1 SE 2 y PAO1 SE 3, el comportamiento continuo en los pases 8 y 9, pero se vio un desplome del crecimiento en el pase 10. Otro cultivo que se vio con un crecimiento favorable, fue el de la cepa PAO1 5 AiiM 3, ya que en el pase 8 su crecimiento fue mayor que los cultivos de las cepas PAO1 SE 1, 2 y 3. De los tres cultivos en los cuales se observó que existía un crecimiento favorable, se procedió a obtener colonias puras, de las que se seleccionaron 10 de ellas para analizar dos factores de virulencia e identificar cuáles podrían ser resistentes a la enzima AiiM.

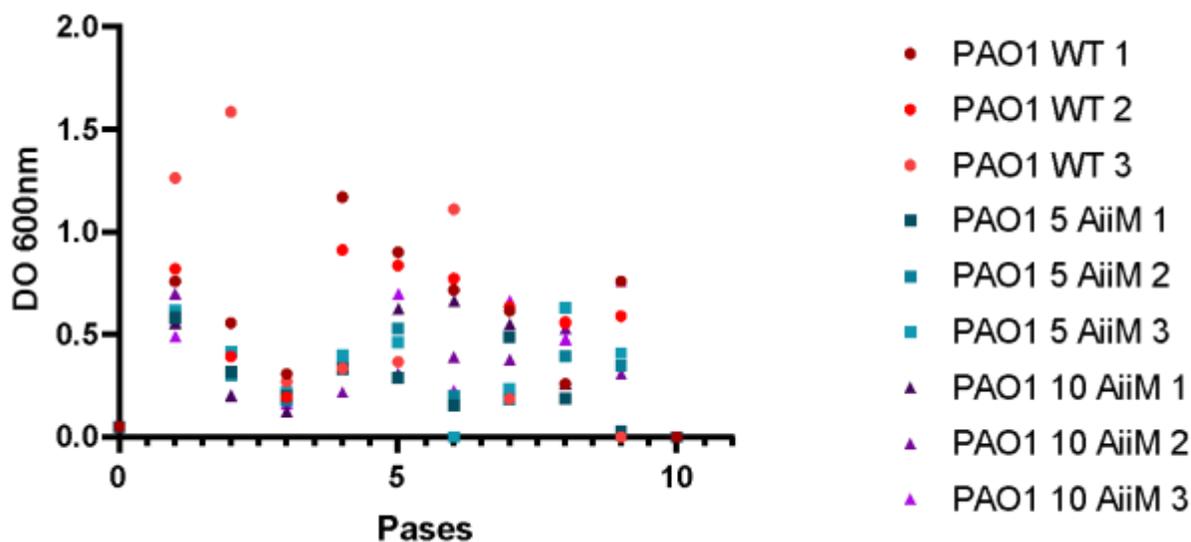


Figura 15 Curva de crecimiento para la obtención de mutantes resistentes a la enzima AiiM, en medio M9 Adenosina 1% MOPS pH 7.0

Las cepas que se seleccionaron para este proyecto, se encuentran mencionadas en la **Tabla 5**, de las cuales se obtuvieron las 10 colonias para analizar su comportamiento en los factores de virulencia.

Tabla 5 Cultivos seleccionados para su análisis de resistencia a la enzima AiiM

Nombre de la cepa	Número de pase del cual se obtuvo	Características
PAO1 SE	Pase número 7	Cultivo 1 de PAO1 WT que creció por 504h en medio mínimo M9 adenosina 1% MOPS pH 7.0.
PAO1 10 AiiM 7-1	Pase número 7	Cultivo 1 de PAO1 WT que creció por 504h en medio mínimo M9 adenosina 1% MOPS pH 7.0 en presencia de 10 µg/mL de la enzima AiiM.
PAO1 10 AiiM 7-3	Pase número 7	Cultivo 3 de PAO1 WT que creció por 504h en medio mínimo M9 adenosina 1% MOPS pH 7.0 en presencia de 10 µg/mL de la enzima AiiM.
PAO1 5 AiiM 8-3	Pase número 8	Cultivo 3 de PAO1 WT que creció por 600 h en medio mínimo M9 adenosina 1% MOPS pH 7.0 en presencia de 5 µg/mL de la enzima AiiM.

6.5. Caracterización de las clonas resistentes a la enzima AiiM

Una vez que se obtuvieron las 4 clonas con crecimiento en adenosina en presencia de la enzima AiiM, se procedió a obtener 10 colonias de cada clona, con la finalidad de buscar aquellas que sean resistentes a la lactonasa. Cada colonia se incubó un ON en medio LB a 36.5 ± 0.5 °C a 200 rpm, pasado el tiempo de incubación, se inoculó por triplicado tubos de 15 mL con 2 mL de medio LB más 5 µg/mL AiiM y tubos sin la presencia de la enzima, se incubaron por 20 h a 36.5 ± 0.5 °C a 200 rpm, obteniendo en todos los cultivos, se midió el crecimiento a una DO_{600nm} . Se obtuvieron los sobrenadantes de cada cultivo para realizar las mediciones de los factores de virulencia (actividad caseinolítica y piocianina).

Esta metodología se realizó para las cepas PAO1 WT y PAO1 SE, con la finalidad de observar el efecto que tiene la enzima con los factores de virulencia de estas dos cepas.

6.5.1 Factores de virulencia

6.5.1.1 Actividad caseinolítica

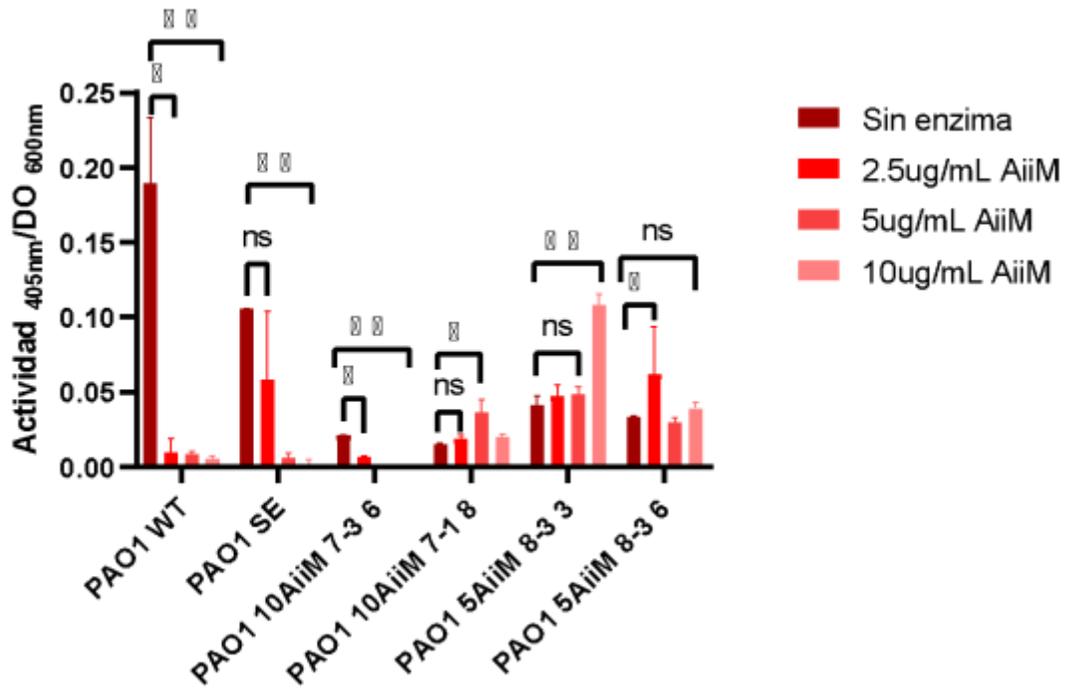


Figura 16 Curva de actividad caseinolítica con la enzima AiiM a tres diferentes concentraciones N=3. Donde ns = sin diferencia significativa, * $p \leq 0.5$.

De las 40 colonias seleccionadas, solo se obtuvieron 2 colonias que después de varias repeticiones se mantuvieron con un comportamiento de resistencia a la enzima AiiM. En la **Figura 16**, se observa en la cepa PAO1 WT una disminución con significancia estadística en la producción de la actividad caseinolítica desde la concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ AiiM, mientras que en la cepa PAO1 SE sucede el mismo fenómeno, pero con la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ AiiM. De esta forma se descarta que la resistencia a la enzima está dada por crecer en el medio mínimo con adenosina de forma continua; por otro lado, vemos que la cepa PAO1 5 AiiM 8-3 con sus dos colonias 3 y 6, se obtiene un incremento de la actividad caseinolítica, este efecto se aprecia en la colonia 3 con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de la enzima y con la colonia 6 con una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, pero en los otros puntos, la actividad en ambas cepas son similares a la actividad que se presenta sin enzima, incluso al realizar pruebas estadísticas de Bonferroni, nos muestra que no hay diferencia estadística. En cuanto a la cepa PAO1 10 AiiM 7-1 con su colonia 8, el análisis estadístico nos muestra que a la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ hubo un incremento en la actividad, pero en las otras dos concentraciones la actividad fue muy similar a la observada a la que no estuvo en contacto con la enzima AiiM. Finalmente, la cepa PAO1 10 AiiM 7-3, la actividad caseinolítica en presencia de la enzima, no presentó un aumento de ella, si no, que hubo una disminución de su actividad, cabe destacar que esta cepa en la curva de crecimiento se observó su

crecimiento fue menor a PAO1 10 AiiM 7-1, pero muy similar a los 3 cultivos de PAO1 WT.

Consecutivamente se volvió a realizar la medición de la actividad caseinolítica, pero en esta ocasión solo se probó con la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AiiM y se observó que las cepas PAO1 WT y PAO1 SE mantenían su sensibilidad a la enzima, así como la cepa PAO1 10 AiiM 7-3, mientras que las dos colonias de PAO1 5 AiiM 8-3, mantenían su resistencia a la enzima. En el caso de PAO1 10 AiiM 7-1 la colonia 8, presentó una disminución de la actividad, tal como se observó con la cepa PAO1 10 AiiM 7-3, con lo que se concluyó que esta cepa no presenta una resistencia consistente a la enzima (**Figura 17**).

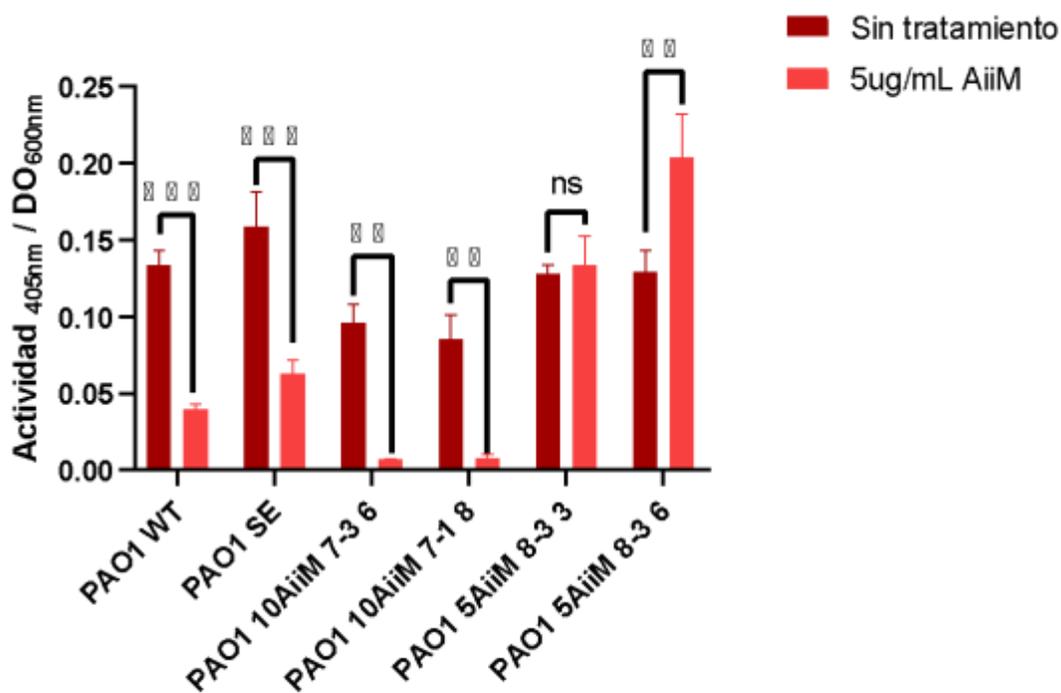


Figura 17 Actividad caseinolítica de las cepas resistentes a la enzima AiiM N=3. Donde ns = sin diferencia significativa, * $p \leq 0.5$.

6.5.1.2 Pilocianina

La producción de pilocianina se determinó con los sobrenadantes obtenidos para realizar la curva de actividad caseinolítica. En la **Figura 18**, se observa que tanto en la cepa PAO1 WT y PAO1 SE, tienen una disminución en la producción de pilocianina desde la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AiiM, así como sucedió con la actividad caseinolítica, por esta razón podemos decir que ambas cepas son sensibles a la enzima lactonasa, mientras que la cepa PAO1 5 AiiM 8-3 con su colonia 3, la producción de pilocianina se ve un incremento significativo a partir de la concentración 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AiiM, este

resultado tiene una correlación con la actividad caseinolítica, mientras que con las colonia 6, la producción se mantiene con todas las concentraciones de la enzima.

En el caso de PAO1 10 AiiM 7-1 8, la producción de pirocianina se mantiene similar en todas las concentraciones que se probaron y como se observaba en la actividad caseinolítica, tampoco existió un aumento significativo. Algo interesante es el caso de PAO1 10 AiiM 7-3 1, en donde se logra observar que hay un aumento significativo en la producción de pirocianina e inclusive existe una producción mayor conforme se va adicionando mayor concentración de la enzima AiiM, pero cuando se volvió a realizar la medición de pirocianina para verificar si eran cepas mutantes, las cepas PAO1 10 AiiM 7-3 6 y PAO1 10 AiiM 7-1 8, presentaron una baja en la producción de pirocianina en presencia de 5 µg/mL de AiiM, pero en la primer cepa es donde se logra observar más el efecto de inhibición, estos resultados nos indican que no en todas las colonias seleccionadas, se encuentran mutaciones que confieren resistencia a la enzima.

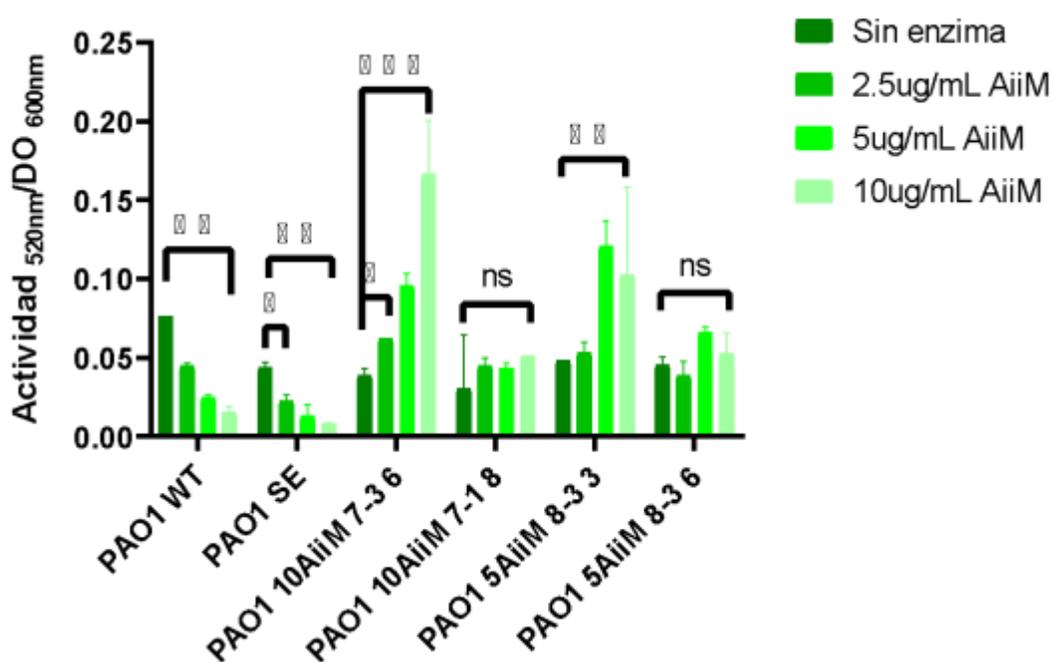


Figura 18 Curva de producción de pirocianina con la enzima AiiM a tres diferentes concentraciones N=3. Donde ns = sin diferencia significativa, * $p \leq 0.5$.

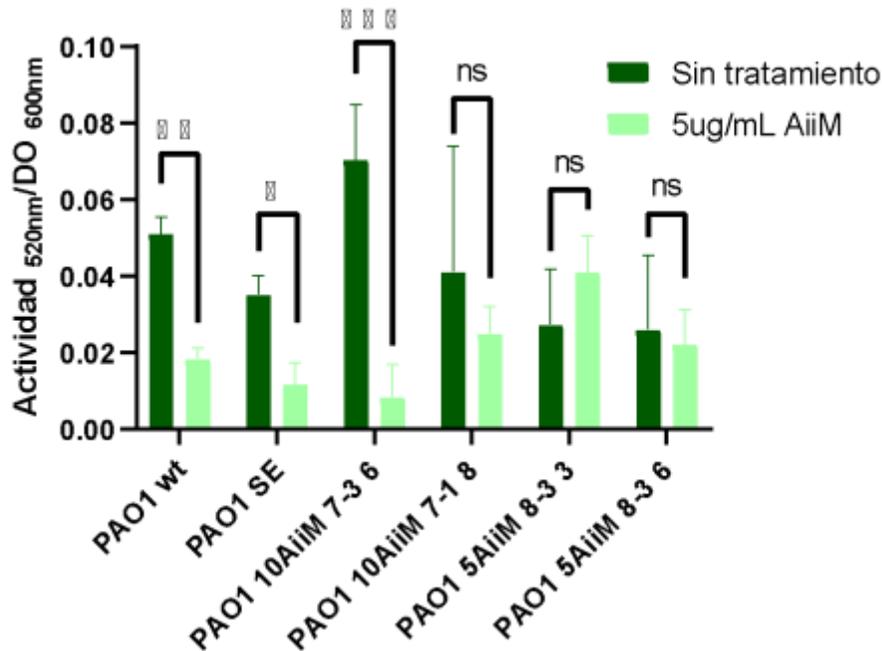


Figura 19 Producción de piocianina de las cepas resistentes a la enzima AiiM N=3. Donde ns = sin diferencia significativa, * $p \leq 0.5$.

6.5.2 Detección de C4HSL

Para descartar que la resistencia a la enzima estuviera dada a modificaciones en las AHL o que no se secretaron, se procedió a realizar la prueba T realizada con el cultivo de *C. violaceum* CV026 como biosensor de C4HSL. Se evaluaron los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 WT, PAO1 SE, PAO1 10 AiiM 7-3 6, PAO1 10 AiiM 7-1 8, PAO1 5 AiiM 8-3 3 y PAO1 5 AiiM 8-3 6, para ver su producción del AI. *C. violaceum* WT se utilizó como control positivo, ya que este microorganismo regula la producción del pigmento violaceina gracias a un sistema QS.

En la **Figura 20** se observa la sección **G** la pigmentación de *C. violaceum* WT por lo que se concluye que si produce el AI de HSL de cadena corta (C4HSL) que son difusibles en el medio y son detectadas por *C. violaceum* CV026, ya que produjo en las puntas del cultivo el color violeta característico. En el apartado **F** de la **Figura 20**, se tiene en la parte central a la cepa PAO1 WT, se observó que el AI fue detectado por difusión de C4HSL, así se concluyó que la cepa PAO1 WT es productora de esta molécula, de esta forma se puede comparar con las cepas mutantes. En la sección **E**, se observa a la cepa PAO1 SE que tiene un comportamiento similar a la cepa PAO1 WT, así se descartó que el crecimiento en adenosina genere alguna mutación de importancia; finalmente las cepas mutantes PAO1 10 AiiM 7-3 6 (D), PAO1 10 AiiM 7-1 8 (C), PAO1 5 AiiM 8-3 3 (B) y PAO1 5 AiiM 8-3 6 (A) se observa que todas las cepas tuvieron la producción del AI de cadena corta C4HSL, ya que en todos los casos son detectados por *C. violaceum* CV026, un comportamiento muy similar a PAO1 WT y PAO1 SE.

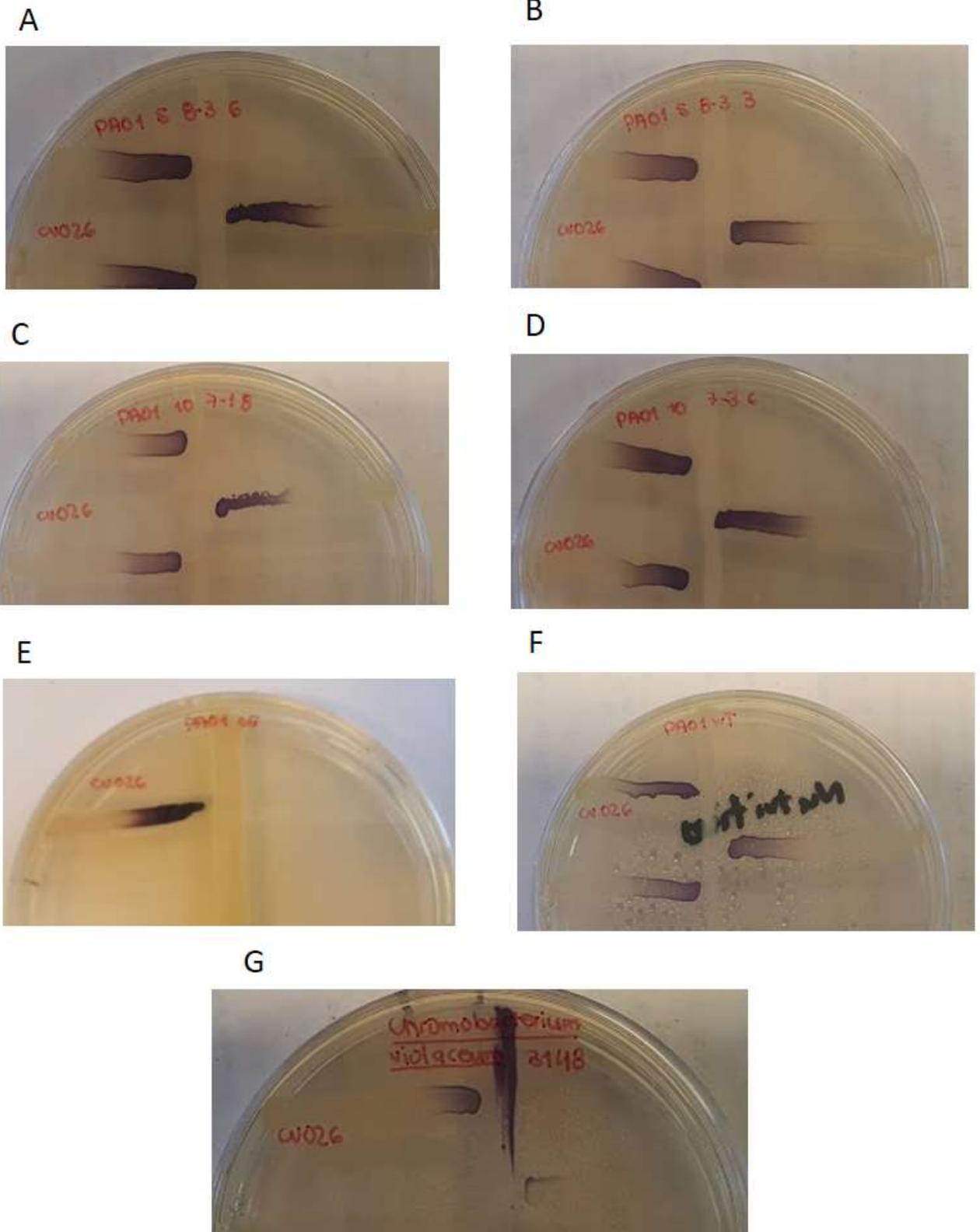


Figura 20 Prueba T para censar la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* CV026

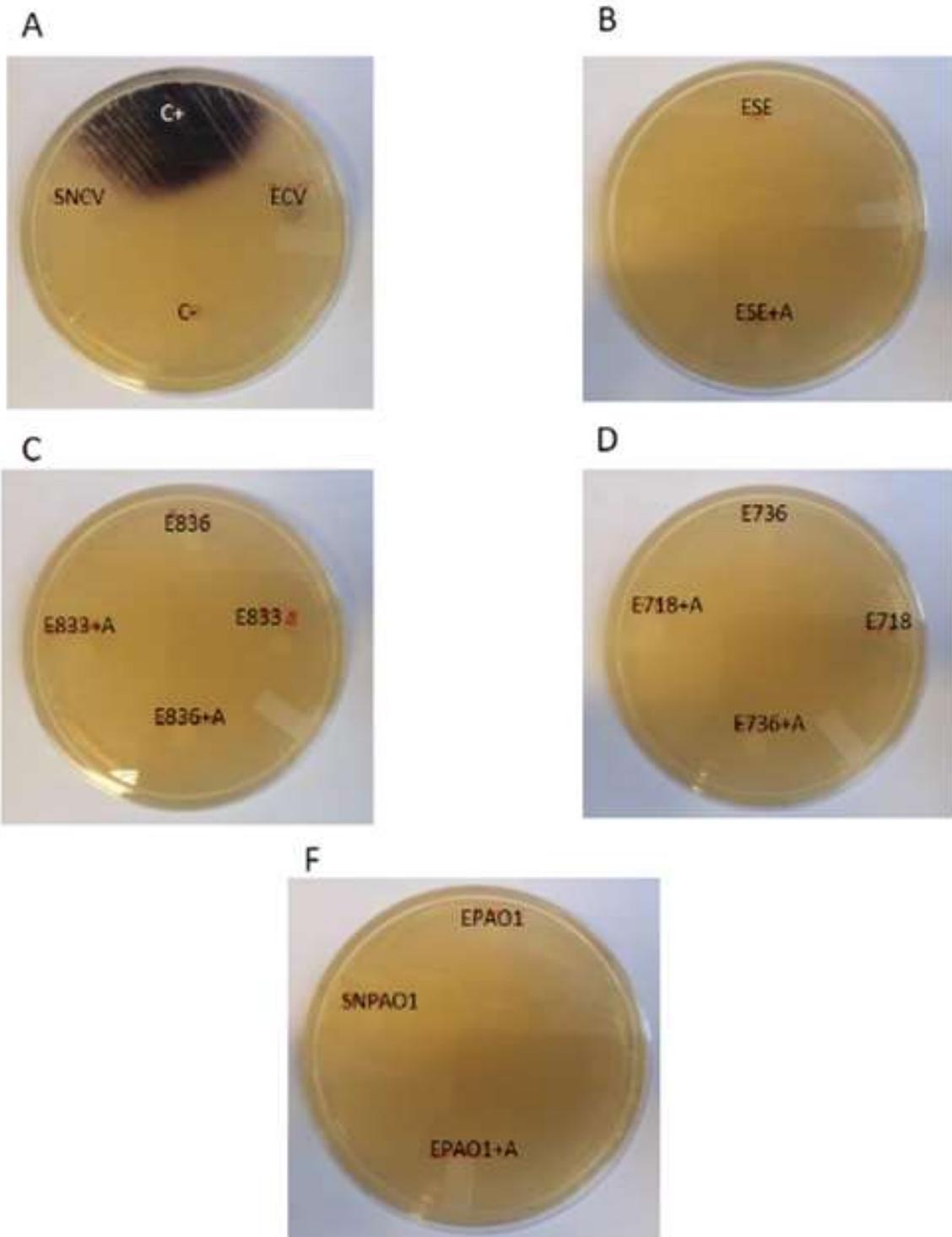


Figura 21 Prueba con sensidisco para la detección de HSL de cadena corta en *C. violaceum* CV026

Al observar que si se detectó la señal del AI por el biosensor, se procedió a realizar la extracción de las HSL tal como se describió en el punto 5.8, con acetato de etilo acidificado con 0.5% de ácido acético, una vez que se evaporó el acetato de etilo, en los tubos se colocó DMSO para recuperar y disolver las AHL que precipitaron, este proceso se realizó con todos los cultivos de las cepas mutantes con 5 µg/mL AiiM y de cultivos sin la presencia de la enzima, de igual forma se realizó con la cepa de *C. violaceum* WT para utilizar el sobrenadante de este cultivo, como un control positivo se utilizó una solución de C4HSL a una concentración de 2 µM y como control negativo se usó agua destilada estéril, de ambos se colocaron 2 µL en los sensidiscos, mientras que de los extractos obtenidos se colocó el volumen de 5 µL, ya que fue el volumen máximo que aceptó cada disco, fueron incubados por 48 h a 27.5 °C ± 0.5 °C.

En la **Figura 21**, se puede observar los resultados obtenidos, en el apartado A se observa que el control positivo que fue la solución preparada con C4HSL a una concentración de 2 µM si difunde en el agar, y que es detectado por *C. violaceum* CV026 ya que se produce el pigmento característico de la violaceina; en la parte inferior de la misma caja, se encuentra el control negativo, se esperaba que no tuviera ningún efecto de detección, esto se observó en el cultivo, ya que no hay ninguna pigmentación alrededor de la zona, finalmente, en esa misma caja, se colocó el sobrenadante del extracto de *C. violaceum* WT, esperando que en estos existiera la presencia del AI C4HSL, pero no se observó efecto alguno alrededor del sensidisco, por lo que los 5 µL de sobrenadante que se añadieron, puede que contengan una concentración por debajo de la mínima para ser detectado por el biosensor; mientras que en el extracto de *C. violaceum* WT se logra observar una pequeña mancha de color morado debajo del disco, pero este solo es por el color que se obtuvo del precipitado disuelto en DMSO, por lo que de igual forma que en el sobrenadante, no se detectó el AI por el biosensor, esto se puede deber a que la técnica de extracción no fue la correcta o la concentración del AI es muy baja y por ende no es detectada. El mismo fenómeno que se observó con el extracto de *C. violaceum* se presencié en todos los extractos obtenidos, tal como se muestra en la **Figura 21**, donde ESE se refiere al extracto de la cepa PAO1 SE; E833 es extracto de la cepa PAO1 5 AiiM 8-3 3; E836 es extracto de PAO1 5 AiiM 8-3 6; E718 es extracto de PAO1 10 AiiM 7-1 8; E736 se refiere al extracto de la cepa PAO1 10 AiiM 7-3 6 y finalmente EPAO1 es el extracto de la cepa PAO1 WT; cuando se añade +A, es el extracto de la cepa a la cual en el cultivo se le adicionó 5 µg/mL de la enzima AiiM.

Con los dos resultados, se puede concluir que las cepas mutantes si producen el AI C4HSL, ya que fue detectado por la prueba T, pero que probablemente su concentración es muy baja en el sobrenadante y que por esa razón es difícil poder realizar la extracción de este AI, y por esta razón no se puede detectar por sensidiscos, esto se puede confirmar con los resultados observados en la **Figura 21**, en los apartados A y F que en ambos casos se tienen sobrenadantes filtrados de *C. violaceum* WT y *P. aeruginosa* PAO1 WT respectivamente.

6.5.3 Detección de 3O12HSL

Antes de realizar la detección de las HSL de cadena larga, se realizó una curva tipo (**Figura 22**), para conocer las concentraciones en las cuales se detectaría sin ningún problema al AI por el biosensor, de esta forma conocer la concentración mínima que puede ser detectada, se utilizó la técnica descrita en la metodología, pero a los cultivos de *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG: lacZ* se le adicionó de una solución preparada de 3O12HSL

a 10 mM a concentraciones finales de 1 μ M, 1.5 μ M, 2 μ M, 2.5 μ M y 3 μ M, estas fueron las concentraciones mínimas detectadas por el biosensor, también al realizar la curva tipo, podemos conocer la concentración que tiene cada uno de los extractos que se evaluaron, ya que se conoce la ecuación de la curva tipo:

$$Abs_{420\text{ nm}} = 0.09020(\mu\text{M}) + 0.01324$$

La R^2 de la regresión lineal fue de 0.89, por lo que se puede utilizar dicha ecuación para conocer la concentración presente de 3O12HSL de cada uno de los extractos.

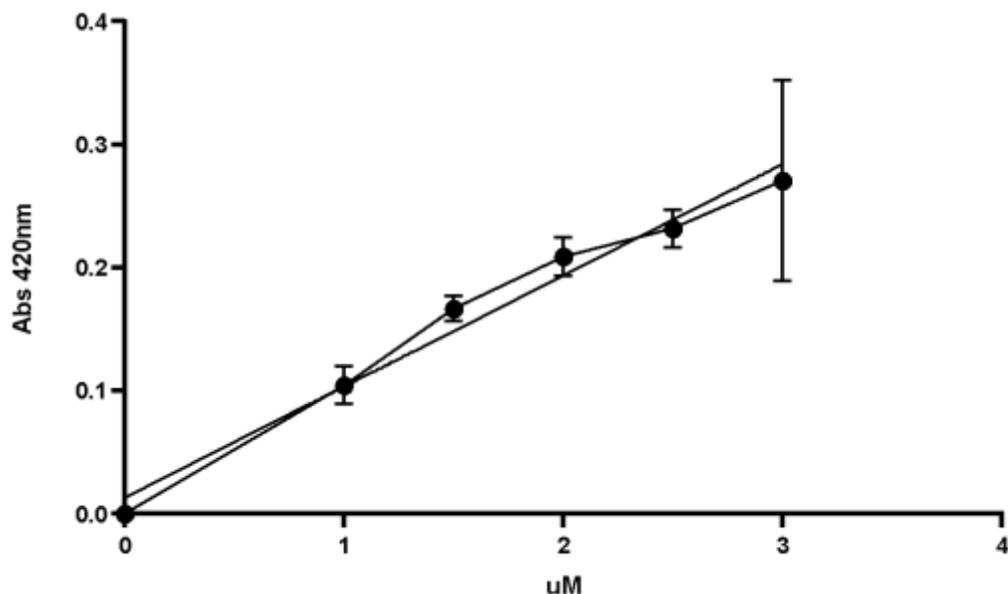


Figura 22 Curva tipo para la detección de 3O12HSL por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-traG: lacZ

Posteriormente se realizó una curva con el extracto obtenido de PAO1 WT para ver el volumen en el cual se podría detectar la presencia del AI de cadena larga, ya que con lo sucedido con *C. violaceum* CV026, se pensó que de igual forma, podría existir una baja concentración y por ende, no observarse la detección del AI.

En la **Figura 23**, se observan los volúmenes se utilizaron, que fueron desde los 0.5 μ L/mL, hasta los 15 μ L/mL. Examinando la **Figura 23**, notamos que los volúmenes de 0.5 μ L/mL, 1 μ L/mL, 1.5 μ L/mL y 2 μ L/mL, se encuentran dentro de los valores detectados en la curva tipo de la **Figura 22**, mientras que los volúmenes mayores de 5 μ L/mL la absorbancia obtenida a 420 nm es mayor a la reportada en la curva tipo, inclusive dentro del rango de 5 μ L/mL a 10 μ L/mL, los valores son muy similares, por esta razón que se decidió utilizar un volumen de 1.5 μ L/mL de los extractos y así fueran detectados por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-traG: lacZ.

volumen extracto C12

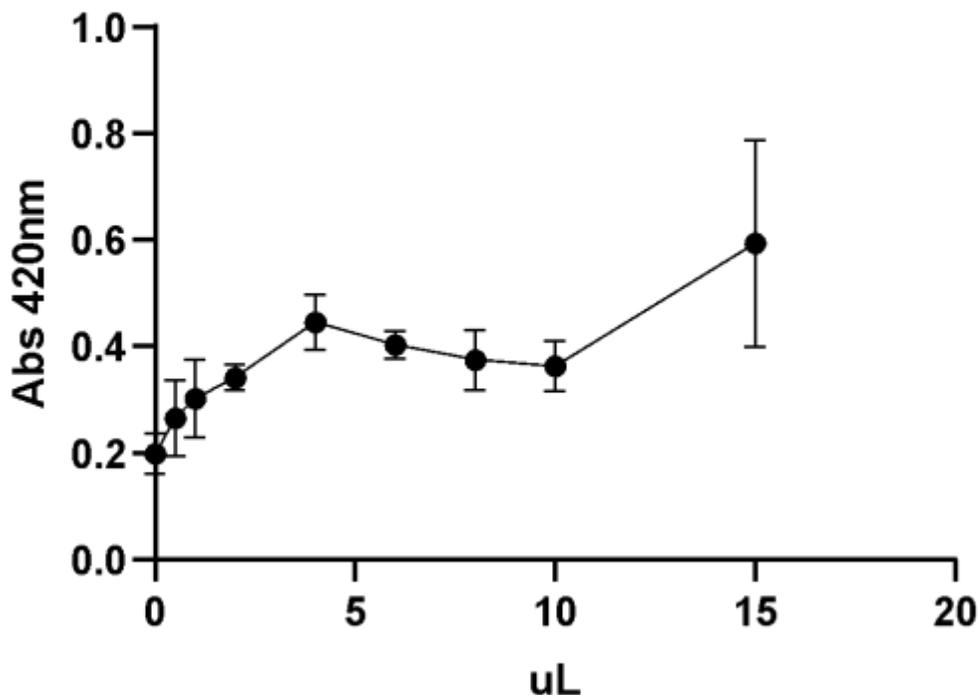


Figura 23 Curva de volumen del extracto de PAO1 WT para determinar la actividad galactosidasa en *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG: lacZ*

Una vez que ya se conocía la concentración mínima de 3O12HSL que es detectada por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG: lacZ* y el volumen adecuado a utilizar de los extractos para que fueran detectados. Se realizó la detección de las AHL de cadena larga en todos los extractos que fueron obtenidos de cultivos con y sin tratamiento de la enzima AiiM. A los cultivos iniciales de *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG: lacZ* con una DO_{600nm} de 0.05 en el medio LB adicionado con gentamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se les adicionó 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los extractos obtenidos; en el caso de los extractos que fueron obtenidos sin la presencia de la enzima, se les adicionó la enzima AiiM en la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en cada caso la prueba se realizó por triplicado. Los cultivos fueron incubados por 20h a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm, pasado el tiempo se midió la DO_{600nm} , se obtuvieron *pellets* de cada uno de los cultivos, a los cuales se les realizaron 3 lavados con solución salina, esto con la finalidad de eliminar cualquier compuesto extracelular que pudiera interferir con la actividad. Posteriormente, se tomó una pequeña alícuota de los *pellets* ya lavados y fueron tratados con la solución de permeabilización para adaptar a las células y permitir que al momento de agregar la solución substrato puedan metabolizar el metabolito incoloro ONPG (Ortonitrofenil- β -galactósido) (análogo de lactosa), el cual puede ser metabolizado por la enzima β -galactosidasa codificada por el operón *lac*, cambiando a un color amarillo, puede ser detectado por espectrofotometría.

En la **Figura 24** se observa que todos los extractos obtenidos sin ningún tratamiento, se obtiene una actividad, por lo tanto, si hay producción y exporte de AHL de cadena larga. Como se ve en la figura, la cepa con una mayor producción de estas AHL, es la cepa PAO1 10 AiiM 7-3 6, las otras cepas incluyendo a la cepa PAO1 WT y la cepa PAO1 SE, presentan una producción similar de AHL de cadena larga, cuando a estos extractos se les adiciona 5 µg/mL de la enzima AiiM (extracto + 5 µg/mL AiiM), existe una disminución de casi el 100% de la actividad, por lo tanto, estos extractos son susceptibles a la lactonasa. Otros de los extractos que se obtuvieron, fueron de cultivos que estuvieron presentes con la enzima AiiM (extracto obtenido con 5 µg/mL AiiM), como se puede observar en la misma figura 24, en estos extractos existe presencia de AHL de cadena larga, pero solo en las cepas mutantes, mientras que las cepas PAO1 WT y PAO1 SE, la presencia de las HSL de cadena larga es casi nula, lo cual se puede deber a que la mayoría de estas fueron degradadas por la lactonasa dentro de los cultivos, y ya en el extracto no son viables, por esta razón no son detectadas por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG: lacZ*.

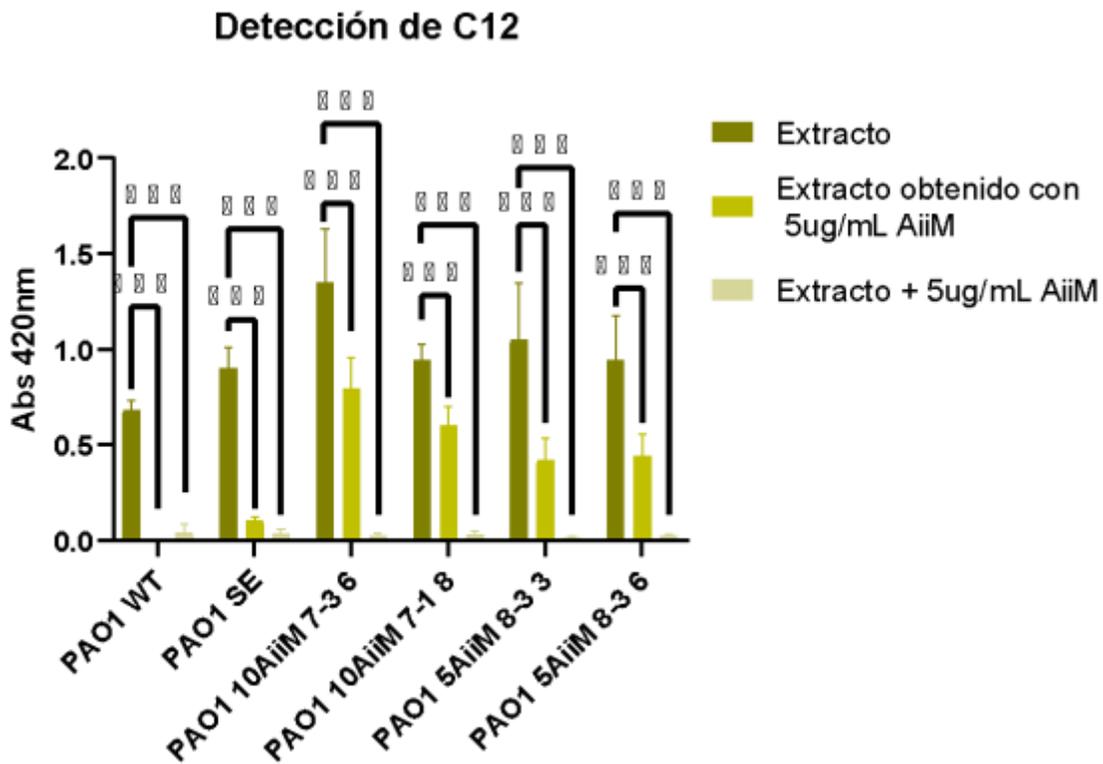


Figura 24 Detección de 3O12HSL en extractos obtenidos de cultivos de las cepas mutantes con y sin enzima AiiM. Donde ns = sin diferencia significativa, * $p \leq 0.5$.

7. Discusión

Aproximadamente el 27% de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, son resistentes a los antibióticos carbapenémicos, ya que en un estudio realizado por Garza-González y colaboradores en 2019, mostró que de 1995 cepas recolectadas en 47 centros de salud, 175 cepas eran multidrogo resistentes, 165 cepas fueron posibles drogo resistentes y 87 cepas eran posiblemente pan drogo resistentes (Garza-González, y otros, 2019). Otro estudio realizado por López-Jácome y colaboradores, mostró que el 30% de sus aislados clínicos eran resistentes a cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y piperacilina/tazobactam y una cepa fue resistente a colistina (López-Jacome, y otros, 2019), estas resistencias pueden estar dadas por la inhibición del crecimiento que generan los antibióticos.

López-Jácome y colaboradores demostraron que la enzima AiiM era capaz de reducir 4 factores de virulencia controlados por QS en cepas clínicas de *P. aeruginosa* (actividad elastasa, piocianina, proteasa alcalina y producción de HCN), ya que degrada las AHL en una concentración de 5 µg/mL, con un tiempo mínimo de exposición de 5 minutos (López-Jacome, y otros; 2019). Un punto importante en su estudio es que, a esta concentración de la enzima no inhibe el crecimiento, debido a que los estudios realizados fueron hechos en medios ricos, en los que no se depende de los sistemas de QS para poder llevar a cabo su metabolismo. Para poder seleccionar una resistencia contra algún inhibidor de QS se requiere que el microorganismo crezca en un medio donde la degradación de los metabolitos sea regulada positivamente por los sistemas de QS (García-Contreras, 2016), tal y como pasa con la degradación de la adenosina, ya que se requiere de la enzima nucleósido hidrolasa, para su expresión se requiere del sistema LasRI, ya que es regulada positivamente por QS (Patel, y otros, 2006).

Maeda y colaboradores en el 2011, observaron que se podía utilizar un medio mínimo con adenosina como única fuente de carbono, para seleccionar resistencia a compuestos asociados al QQ, por esta razón se buscó como primera opción utilizar un medio que tuviera adenosina como única fuente de carbono (Maeda, y otros, 2011). Dentro de los resultados que se obtuvieron para obtener el medio de cultivo adecuado para inhibir el crecimiento, se observó que las cepas WT de PAO1 y PA14, tuvieron un crecimiento favorable, en comparación del crecimiento observado en PA14 *nuh* y las mutantes en algún gen del sistema LasRI, así como las mutantes en genes del sistema RhlRI, es por esta razón se seleccionó el medio mínimo de sales M9 adenosina 1%, MOPS pH 7.0. Cabe destacar que la regulación del pH, se realizó para que se evitara que existieran cambios que pudieran interferir con la actividad de la enzima, o en caso de que la bacteria pudiera alcalinizar el medio y por ende el anillo de la lactona se volviera a ciclar.

Una vez que conoce el medio para inhibir el crecimiento con la enzima AiiM, se procedió a realizar curvas en las que se probaron tres condiciones distintas; dos concentraciones de la enzima y sin la enzima, con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, para la obtención de mutantes por presión de selección. Como se esperaba, en los primeros pases con presencia de la enzima, el crecimiento de la cepa PAO1 fue muy bajo, en comparación del

crecimiento de la cepa PAO1 en medio de adenosina sin la enzima. Donde se observó que los cultivos que tenían la presencia de la adenosina más la enzima empezaban tener un crecimiento similar, fueron a hasta las 360 h. De los pases que tuvieran un crecimiento favorable, se seleccionaron 10 colonias, a las que se les midió actividad caseinolítica y producción de piocianina. Se seleccionaron en total 4 colonias tentativas a ser resistentes a la enzima AiiM, las cepas PAO1 10 AiiM 7-1 6, PAO1 10 AiiM 7-3 6, PAO1 5 AiiM 8-3 3 y PAO1 5 AiiM 8-3 6, fueron las cuatro colonias que se seleccionaron para ser analizadas, en el caso de PAO1 5 AiiM 8-3 3 y PAO1 5 AiiM 8-3 6 fueron las dos cepas que constantemente mostraron ser resistentes, ya que en la presencia de la enzima, la producción de piocianina y la actividad caseinolítica fueron muy similares e inclusive en algunas ocasiones su producción y actividad aumentaban con respecto a los cultivos en los cuales no se les agregaba la enzima.

Para verificar que su fenotipo de producción de HSL no hubiera cambiado, se procedió a realizar la prueba T, para confirmar la secreción de HSL de cadena corta empleando *C. violaceum* CV026. En todos los casos se detectaron HSL de cadena corta por el biosensor, pero no ocurrió el fenómeno de detección de AHL cuando se realizó la extracción orgánica empleando el protocolo descrito por Wang y colaboradores en el 2011 (Wang, y otros, 2011). Es probable que no se detectara ya que posiblemente se encuentran en una baja concentración en los extractos.

En el caso de AHL de cadena larga, se detectaron en *A. tumefaciens* NTL4 P2LR4-*traG:lacZ* (Luo, Su, & Farrand, 2003). Se observó que, en todos los casos de las mutantes, cuando se crecieron en medio LB en presencia de la enzima AiiM, se detectó por el biosensor, pero cuando al extracto de las AHL se les adiciona la lactonasa, ya no es detectado, por lo tanto, se observa que existe producción de AHL de cadena larga y que estas son sensibles a la enzima, sugiriendo que no hay modificaciones en las moléculas de AHL.

Las clonas resistentes a la enzima AiiM, podrían estar secretando proteasas en mayor cantidad que la cepa silvestre o a tiempos más tempranos, lo que podría llegar a degradar a la lactonasa, lo cual podría explicar por qué en algunas ocasiones se presenta una mayor actividad proteolítica. Para ver fenotípicamente si es esto lo que está ocurriendo, se puede realizar una curva en la cual se mida la actividad caseinolítica como función del tiempo de cultivos con presencia de la enzima AiiM y determinar si hay aumento en la actividad. También se pretende secuenciar los genomas completos de las clonas resistentes para verificar si existen mutaciones que puedan explicar el mecanismo de resistencia contra la enzima AiiM.

8. Conclusión

Se pueden obtener mutantes a las enzimas que se utilizan en QQ en medio mínimos en los que se requieran el uso de QS para poder degradar a la fuente de carbono, ya que se logra obtener las condiciones necesarias de inhibición del crecimiento bacteriano, esto se puede lograr cuando se realizan cultivos seriados, y se seleccionan aquellos que tengan un crecimiento favorable.

Las mutantes PAO1 5 AiiM 8-3 3 y PAO1 5 AiiM 8-3 6 presentaron una actividad caseinolítica similar y mayor en presencia de la enzima AiiM, con respecto a la cepa PAO1 WT sin tratamiento, mientras que la producción de piocianina, es en ambos casos similar la que producen cuando no están en presencia de la enzima AiiM. La mutante PAO1 10 AiiM 7-1 8 su actividad caseinolítica en presencia de la enzima AiiM es similar a la PAO1 WT, así como la producción de piocianina y la cepa PAO1 10 AiiM 7-3 6 en presencia de la enzima, reduce su actividad caseinolítica, pero la producción de piocianina se incrementa. Estas dos últimas cepas, su resultado varió, respecto a la colonia que se seleccione.

Probablemente no hay una modificación química en las HSL de las mutantes, ya que son sensibles a la enzima AiiM.

El mecanismo de resistencia a AiiM está relacionado con la actividad insuficiente de la misma en los cultivos de las clonas resistentes, lo que podría deberse a degradación o inactivación de la enzima por metabolitos o enzimas presentes en los sobrenadantes (como exoproteasa) o a la protección de las HSL, disminuyendo la accesibilidad de estas a la enzima. O a una combinación de ambos factores.

9. Perspectivas

Elucidar el mecanismo mediante el cual se volvieron resistentes las dos colonias de PAO1 a AiiM 8-3, realizando el análisis comparativo de los genomas de estas cepas y las cepas WT, y SE, para identificar las mutaciones que presentan estas dos colonias resistentes y posteriormente reproducir estas mutaciones de manera dirigida en PAO1 para determinar si la resistencia se adquiere mediante estos cambios.

Así mismo se analizarán los sobrenadantes de las clonas resistentes para identificar si existe algún metabolito o enzima que inactiva a AiiM.

10. Referencias

- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*.
- Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumander, D. U., Grant, G., & Schumander, U. (1997). Pseudomonas aeruginosa lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med*.
- Azimi, S., Klementiev, A. D., Whiteley, M., & Diggle, S. P. (2020). Bacterial Quorum Sensing During Infection. *Annual review of Microbiology*, 201-19.
- Bové, M., Bao, X., Sass, A., Crabbé, A., & Coenye, T. (2021). The quorum sensing inhibitor furanone C-30 rapidly loses its tobramycin potentiating activity against Pseudomonas aeruginosa biofilms during experimental evolution. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.
- Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). Pseudomonas aeruginosa adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front cell infection microbiol*.
- Daddaoua, A., Fillet, S., Fernández, M., Udaondo, Z., Krell, T., & Ramos, J. L. (2012). Genes for carbon metabolism and the ToxA virulence factor in Pseudomonas aeruginosa are regulated through molecular interactions of PtxR and PtxS. *PLoS*.
- Denning, G. M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L., & Britigan, B. E. (1998). Pseudomonas pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166:30-33.
- Diggle, S., Heeb, J., Dubern, M., Crusz, S., Williams, P., & Cámara, M. (2008). Quorum sensing in Pseudomonads. En B. H. Rehm, *Pseudomonas. Model Organism, Pathogen, Cell Factory*.
- Dong, Y.-H., & Lian-Hui, Z. (2005). Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *The Journal of Microbiology*, 101-109.
- Fetzner, S. (2015). Quorum quenching enzymes. *J. Biotechnol*.
- García-Contreras, R. (2016). Is Quorum Sensing Interference a Viable Alternative to Treat Pseudomonas aeruginosa Infections? *Front. Microbiol*.
- García-Contreras, R., Maeda, T., & Wood, T. K. (2013). Resistance to Quorum-Quenching Compounds. *Journals ASM*.

- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mandoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., . . . Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*.
- Hauser, A. R. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*: So many virulence factors, so little time. *Crit Care Med*.
- Jensen, V., Löns, D., Zaoui, C., Brendenbrunch, F., Meissner, A., Dieterich, G., . . . Häusser, S. (2006). RhIR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathway. *J Bacteriol*.
- Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C., & Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *Journal Biology Chem*.
- Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 4839-4849.
- 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*.
- Lee, K., & Yoon, S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a programmed Bacterial Life for fitness. *J. Microbiol Biotechnol*.
- Lequette, Y., & Greenberg, E. P. (2005). Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*.
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., . . . Rahme, L. G. (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signal as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog*, 1223-39.
- López-Jacome, L. E., Garza-Ramos, G., Hernández-Durán, M., Franco-Cendejas, R., Loarca, D., Romero-Martínez, D., . . . García-Contreras, R. (2019). AiiM Laconase Strongly Reduces Quorum Sensing Controlled Virulence Factors in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burned Patients. *Front. Microbial*.
- Luo, Z.-Q., Su, S., & Farrand, S. K. (2003). In Situ Activation of the Quorum-Sensing Transcription Factor TraR by Cognate and Noncognate Acyl-Homoserine Lactone Ligands: Kinetics and Consequences. *J. of Bacteriology*.
- Maeda, T., García-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., García, L. R., Tomás, M., & Wood, T. K. (2011). Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME Journal*.

- Malesêvic, M., Stanisavljević, N., Novović, K., Polović, N., Vasiljević, Z., Kojć, M., & Jovčić, B. (2020). Burkholderia cepacia YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of Pseudomonas aeruginosa via quorum quenching activity. *Elsevier*.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Rev Microbiol*, 165-199.
- Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology and molecular biology review*.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. K. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiology Rev.*, 496-518.
- Organización Mundial de la Salud. (27 de Febrero de 2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Recuperado el 01 de abril de 2022, de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=El%20grupo%20de%20prioridad%20cr%C3%ADtica,como%20ven%20tiladores%20y%20cat%C3%A9teres%20intravenosos>.
- Patel, N. J., Zaborina, O., Wu, L., Wang, Y., Wolfgeher, D. J., Valuckaite, V., . . . Alverdy, J. C. (2006). Recognition of intestinal epithelial HIF-1a activation by Pseudomonas aeruginosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Pena, R. T., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernáandez-García, L., López, M., . . . Tomás, M. (2019). Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Frontiers in Microbiology*.
- Rocha, A. J., Barsottini, M. R., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., Laurindo de Moraes, F. L., & Rocha, S. L. (2019). Pseudomonas Aeruginosa: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. *Brazilian Archives of biology and technology*.
- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- 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*.
- Shao, X., Xie, Y., Zhang, Y., Liu, J., Ding, Y., Wu, M., . . . Deng, X. (2020). Novel therapeutic strategies for treating Pseudomonas aeruginosa infection. *Expert Opinion on Drug Discovery*.
- Sikdar, R., & Elias, M. (2021). Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm and microbiomes: a review of recent advantages. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1221-1233.

- Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J. Biotechnol.*
- Turan, N. B., & Engin, G. Ö. (2018). Quorum Quenching. *Comprehensive Analytical Chemistry, 81*, 117-149.
- Wang, J., Quan, C., Wang, X., Zhao, P., & Fan, S. (2011). Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *microbial biotechnology.*
- Wolz, C., Hohloch, K., Ocaktan, A., Poole, K., Evans, R. W., Rochel, N., . . . Doring, G. (1994). ron released from transferrin by pyoverdine and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*