



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio del papel del ORF PA1622 en la
virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN
CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA: Q.F.B. Roxana Yughadi Gaona García.

ASESOR: D.C. Jesús Campos García.

COASESORA: D.C. Lorena Martínez Alcantar.

Morelia, Mich. Junio 2025

El siguiente proyecto para tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana perteneciente al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Jesús Campos García y la co-dirección de la D.C. Lorena Martínez Alcantar, con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).



AGRADECIMIENTOS

La culminación de este proyecto es consecuencia del esfuerzo y la dedicación de las personas que estuvieron detrás guiando e impulsando mi camino a lo largo de la maestría.

Doy gracias a mis padres por darme su amor incondicional, su apoyo, su consejo y por brindarme educación y valores. Sin ellos habría llegado a donde estoy.

A mi esposo, Nestor, por todo el amor, comprensión y apoyo que me brindó durante este proceso, y por nunca dejar que me rindiera. Eres mi fortaleza.

Al Dr. Jesús Campos, por su tiempo y confianza. Sus enseñanzas y observaciones han sido fundamentales para la realización de este proyecto y para mi crecimiento académico.

A la Dra. Lorena, por su infinita paciencia, su tiempo y su compromiso y dedicación con la enseñanza. Su generosidad y calidez dejaron huella en mi formación. Ha sido un pilar muy importante en este trabajo.

A la Dra. Alma, por compartir todos sus conocimientos conmigo. Ha sido una gran ayuda para mi formación dentro del laboratorio y la culminación de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio, que nunca dudaron en ayudarme cuando lo necesité y que hacen más llevadera la estancia en el laboratorio.

A mi comité sinodal, el Dr. Jesús Salvador, el Dr. Javier y la Dra. Marta, por su tiempo, compromiso y valiosas aportaciones a este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, que con esfuerzo y trabajo duro nos brindaron educación a mis hermanos y a mí; que siempre soñaron con un mejor futuro para nosotros, y que me enseñaron a luchar por mis metas, a no darme por vencida y a siempre decir: “sí puedo”.

Todos mis logros se los debo a ustedes. Infinitas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1.-INTRODUCCIÓN	13
1.1.-Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.-Relevancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>	14
1.3.-Resistencia a antibióticos.....	15
1.3.1.-Permeabilidad de la membrana externa.....	16
1.3.2.-Bombas de eflujo.....	19
1.3.3.- Enzimas bacterianas.....	19
1.3.4.- Formación de la biopelícula.....	20
1.3.5.- Formación de subpoblaciones.....	23
1.3.6.- Transferencia horizontal de genes.....	24
1.4.- Virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	27
1.4.1.- Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	28
1.4.2.-Regulación de la virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	40
1.5.-Metabolismo energético de <i>P. aeruginosa</i>	43
2.-ANTECEDENTES	46
2.1.-Mecanismo de asimilación de ácidos grasos por <i>P. aeruginosa</i>	46
2.2.-Proteínas FadD en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	47
2.3.-Contexto genómico de la proteína FadD4 de <i>P. aeruginosa</i>	48
2.4.- ORF PA1622.....	48
2.5.-Enzimas hidrolíticas de <i>P. aeruginosa</i>	49
3.-JUSTIFICACIÓN	51
4.-HIPÓTESIS	51
5.-OBJETIVOS	51
5.1.-Objetivo particular:	51
5.2.-Objetivos específicos:	52
6.-MATERIALES Y MÉTODOS	53

6.1.-Medios de cultivo.....	53
6.1.1.-Medio Luria-Bertani (LB).....	53
6.1.2.-Medio Nematode Growth Medium (NGM):.....	53
6.2.-Condiciones de crecimiento de las cepas.....	54
6.3.-Material biológico.....	54
6.4.- Reactivos.....	55
6.5.-Extracción de ADN.....	56
6.5.1.-Extracción de ADN total.....	56
6.5.2.-Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina:.....	56
6.6.-Electroforesis:.....	58
6.7.-Obtención de las mutantes:.....	59
6.7.1.-Verificación de la construcción en pGem:.....	59
6.7.2.-Obtención de células competentes para transformación:.....	60
6.7.3.-Transformación:.....	61
6.7.4.-Verificación de la mutación:.....	61
6.8.-Curvas de crecimiento:.....	61
6.9.-Cuantificación de acil-homoserina lactona (OdDHL).....	62
6.10.- Determinación de los factores de virulencia.....	62
6.10.1.-Proteasas:.....	62
6.10.2.-Elastasa:.....	62
6.10.3- Movilidad:.....	63
6.10.4.-Pioverdina:.....	63
6.10.5-Piocianina:.....	63
6.10.6.-Exopolisacáridos:.....	64
6.10.7.-Alginato:.....	64
6.10.8.-Lipopolisacáridos:.....	64
6.10.9.-Ramnolípidos:.....	65
6.10.10.-Biopelícula.....	66
6.11.-Componentes del de la biopelícula.....	66

6.12.-Evaluación de la virulencia en <i>Caenorhabditis elegans</i>	66
6.12.1.-Mantenimiento de <i>C. elegans</i> :	66
La cepa OP50 de <i>E. coli</i> se cultivó en 3 mL de medio LB Sm	66
6.12.2.-Sincronización de <i>C. elegans</i> :	67
6.12.3.-Ensayos de virulencia <i>in vivo</i> :	67
6.13.- Evaluación de la resistencia a antibióticos	67
7.-RESULTADOS	68
7.1.-Análisis bioinformático del ORF PA1622	68
7.2.- Obtención de la mutante PA1622::Gm	69
7.3.- Efecto de la mutación en el ORF PA1622 sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	72
7.4.- Efecto de la mutación en el ORF PA1622 sobre la producción de AHL	73
7.5.- Impacto de la mutación en el ORF PA1622 sobre la producción factores de virulencia	73
7.6.-Determinación de la composición de la biopelícula en la mutante PA1622::Gm.....	76
7.7.-Evaluación de la virulencia de la mutante PA1622::Gm en un modelo <i>in vivo</i>	78
7.8.-Efecto de la interrupción del ORF PA1622 sobre la resistencia a antibióticos de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> PAO1	80
8.-DISCUSIÓN	81
9.-CONCLUSIONES	85
10.- ANEXO	86
11.-BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Membrana externa de las bacterias Gram negativas.	17
Figura 2. Estructura del Lipopolisacárido	18
Figura 3. Ciclo del desarrollo de la biopelícula.....	22
Figura 4. Sistemas de Quorum sensing de <i>P. aeruginosa</i>	42
Figura 5. Mecanismo de asimilación de ácidos grasos dependiente de proteínas acil coA sintetasas de <i>E. coli</i>	45
Figura 6. Mecanismo hipotético de la utilización de ácidos grasos por <i>P. aeruginosa</i>	46
Figura 7. Mecanismo de acción de la proteína FadD4.....	48
Figura 8. Estructura cristalina de la proteína codificada por el ORF PA1622.....	49
Figura 9. Estructura canónica del plegamiento α - β	50
Figura 10. Mapa esquemático del plásmido recombinante pGem que contenía al ORF PA1622 interrumpido con un casete de resistencia a gentamicina.....	59
Figura 11. Verificación de la construcción pGem-PA1622::Gm.....	69
Figura 12. Análisis de restricción de la construcción pGem-PA1622::Gm.....	70
Figura 13. Amplificación del ORF PA1622::Gm.....	71
Figura 14. Amplificación del casete Gm ^R presente en el ORF PA1622 de la mutante PA1622::Gm.....	71
Figura 15. Análisis de restricción del ORF PA1622 de la mutante.....	72
Figura 16. Curva de crecimiento de 24 h en medio LB.....	72
Figura 17. Producción de AHL a las 24 h en medio LB.....	73
Figura 18. Producción de proteasas totales y elastasas a las las 24 h en medio LB.....	74
Figura 19. Producción de los sideróforos piocianina y pioverdina a las las 24 h en medio LB.	74
Figura 20. Movilidad por swimming y swarming a las 24 h y 48 h en medio LB...	75
Figura 21. Producción de exopolisacáridos totales y alginato a las 24 h en medio LB.....	75
Figura 22. Producción de lipopolisacáridos y ramnolípidos a las 24 h en medio LB.	76
Figura 23. Producción de biopelícula a las 24 h en medio LB.....	76
Figura 24. Cuantificación de proteínas de la biopelícula a las 24 h en medio LB..	77
Figura 25. Cuantificación de exopolisacáridos totales y alginato de la biopelícula a las 24 h en medio LB.	77

Figura 26. Cuantificación de ramnolípidos a las 24 h en medio LB	78
Figura 27. Cuantificación de ADN a las 24 h en medio LB	78
Figura 28. Curva de supervivencia de nemátodos en cultivo	79
Figura 29. Curva de supervivencia de nemátodos en sobrenadante.....	79
Figura 30. Hidrólisis de sustratos lipídicos.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resistencia intrínseca a antibióticos de Pseudomonas aeruginosa..	15
Tabla 2. Microorganismos utilizados.	54
Tabla 3. Preparación del medio LB	53
Tabla 4. Preparación del medio NGM.	53
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en PCR para la verificación de las mutaciones.	55
Tabla 6. Enzimas utilizadas en la verificación de las mutaciones.	55
Tabla 7. Antibióticos de selección para las distintas cepas.	55
Tabla 8. Preparación de solución de lisis ADN total.	56
Tabla 9. Preparación de solución de lisis para extracción de ADN plasmídico.	57
Tabla 10. Soluciones para extracción de ADN plasmídico, para 100 mL:	57
Tabla 11. Preparación de TAE 10x.	59
Tabla 12. Master Mix para PCR.	60
Tabla 13. Condiciones de reacción para PCR.	60
Tabla 14. Restricción total de pGem-PA1622::Gm	60
Tabla 15. Restricción total de PAO1-PA1622::Gm	61
Tabla 16. Análisis por alineamiento de secuencias usando el programa Blast Protein del NCBI.	68
Tabla 17. Evaluación de la sensibilidad antibiótica de PAO1 y PA1622::Gm.	80

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista que causa infecciones de rápida evolución y alta mortalidad en individuos inmunocomprometidos. Es resistente a múltiples agentes antimicrobianos debido a que posee mecanismos innatos, adaptativos y adquiridos que le permiten contrarrestar la acción de estos agentes. Además, posee un vasto repertorio de factores de virulencia que emplea para colonizar, nutrirse, evadir la respuesta inmunológica y crecer dentro del huésped. Por lo que es un microorganismo de gran relevancia en salud pública mundial, ubicado dentro de la lista de patógenos bacterianos prioritarios (Bacterial Priority Pathogens List, BPPL) para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos por la Organización Mundial de la Salud. El genoma de *P. aeruginosa* PAO1 fue secuenciado completamente en el año 2000, y tiene un tamaño de 6.3 millones de pares de bases, con 5570 marcos de lectura abiertos (ORFs) predichos, revelando información sobre la relación entre la complejidad genética, la versatilidad metabólica y la diversidad ecológica de la bacteria. El ORF PA1622 codifica para una proteína homotetramérica ampliamente distribuida y conservada en el género *Pseudomonas*, cuya localización subcelular predicha es citoplasmática. Este ORF es parte un operón posiblemente implicado en el metabolismo de ácidos grasos, conteniendo el gen que codifica para la enzima FadD4, una enzima que participa en la biosíntesis y modificación del lipopolisacárido, no obstante, se desconoce la función del gen PA1622 y su relación con el operón en el cual está codificado. En este trabajo se estudió la participación del ORF PA1622 en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, utilizando una mutante obtenida por la inserción de un casete de resistencia a gentamicina. Mediante ensayos de virulencia sin *in vivo* utilizando el modelo *Caenorhabditis elegans* no se observaron diferencias significativas, indicando que el ORF PA1622 no tiene un papel esencial en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1. Sin embargo, encontramos que la mutante tiene un incremento en la producción de acil-homoserina lactonas (AHL), elastasa, ramnolípidos y exopolisacáridos. También, se encontró que en la mutante en el ORF PA1622, disminuyó la capacidad para crecer en presencia de los aminoglucósidos tobramicina, kanamicina y amikacina, la cefalosporina ceftriaxona y la fluoroquinolona ciprofloxacina. Estos hallazgos, aunados a la elevada producción de lipopolisacáridos y biopelícula, estructuras que participan en la resistencia innata a antibióticos de la bacteria, indican que el producto del ORF PA1622 participa en los mecanismos de resistencia a antibióticos en la bacteria *P. aeruginosa* PAO1.

Palabras clave: factores de virulencia, resistencia a antibióticos, virulencia.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterial pathogen that causes rapidly evolving infections with high mortality in immunocompromised individuals. It is resistant to multiple antimicrobial agents due to its innate, adaptive, and acquired mechanisms that allow it to counteract the action of these agents. Furthermore, it possesses a vast repertoire of virulence factors that uses to colonize, nourish, evade the immune response, and grow within the host. Therefore, it is a microorganism of great relevance to global public health, included on the World Health Organization's Bacterial Priority Pathogens List (BPPL) for the search of new antimicrobial agents. *P. aeruginosa* PAO1 genome was completely sequenced in 2000 and its size is 6.3 million base pairs, with 5570 predicted open reading frames (ORFs), revealing information about the relationship between genetic complexity, metabolic versatility and ecological diversity of the bacteria. The PA1622 ORF encodes a homotetrameric protein widely distributed and conserved in the genus *Pseudomonas*, with a predicted cytoplasmic subcellular localization. This ORF is part of an operon possibly involved in fatty acid metabolism, containing the gene that encodes the enzyme FadD4, an enzyme involved in the biosynthesis and modification of lipopolysaccharide, however, the function of the PA1622 gene and its relationship with the operon in which it is encoded are unknown. In this work, the participation of ORF PA1622 in the virulence of *P. aeruginosa* PAO1 was studied using a mutant obtained by the insertion of a gentamicin resistance cassette. No significant differences were observed in *in vivo* virulence assays using the *Caenorhabditis elegans* model, indicating that ORF PA1622 does not play an essential role in the virulence of *P. aeruginosa* PAO1. However, we found the mutant has an increased production of acyl-homoserine lactones (AHLs), elastase, rhamnolipids and exopolysaccharides. It was also found that the mutant in ORF PA1622 decreased the ability to grow in the presence of the aminoglycosides tobramycin, kanamycin and amikacin, the cephalosporin ceftriaxone and the fluoroquinolone ciprofloxacin. These findings, coupled with the elevated production of lipopolysaccharides and biofilm, structures that participate in the innate resistance to antibiotics of the bacteria, indicate that the product of the ORF PA1622 participates in mechanisms of antibiotic resistance in the bacterium *P. aeruginosa* PAO1.

Keywords: virulence factors, antibiotic resistance, virulence.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una *Gammaproteobacteria* aeróbica de requisitos nutricionales mínimos, capaz de crecer en temperaturas que rondan entre los 4° C y los 42° C, siendo de 25° C a 37° C su rango de temperatura de crecimiento óptimo (Wu et al., 2015). Al cultivarla en medio sólido crece formando colonias color verde de apariencia brillante debido a los pigmentos que produce, y despiden un aroma característico causado por la generación de un compuesto volátil, la 2-aminoacetofenona (Cox & Parker, 1979). Es un bacilo Gram negativo monoflagelado de un tamaño que ronda entre los 0.5 y 3.0 µm; se encuentra ampliamente distribuido debido a su versatilidad metabólica. Tiene la capacidad de crecer en hábitats tales como suelos, marismas, ríos, animales, plantas, aguas residuales y derrames de petróleo. También puede prosperar en entornos hospitalarios como cánulas, catéteres, equipos de inhaloterapia, fluidos de diálisis, alimentos parenterales e incluso algunos desinfectantes (Mielko et al., 2019; Laborda et al., 2021).

Este microorganismo posee uno de los genomas bacterianos más grandes, con 6.3 Mpb que codifican para 5567 marcos de lectura abiertos u ORFs (Open Reading Frames). Su genoma es altamente flexible y refleja el estilo de vida ubicuo de la bacteria y su capacidad para adaptarse a múltiples condiciones ambientales (de Sousa et al., 2021). El cromosoma de este patógeno contiene un alto número de genes que codifican para proteínas implicadas en la adhesión, movilidad, eflujo de antibióticos, exportación de factores de virulencia, captación de nutrientes, sistemas transportadores y metabolismo. Debido a esto, no es sorprendente que aproximadamente el 8.4% de los genes codificados corresponden a genes reguladores de la transcripción, cuyo rol es importante tanto para la resistencia a antibióticos y a factores ambientales de estrés como para la virulencia (Kung et al., 2010; Azam y Khan, 2019). Además, su cromosoma circular, aunque altamente conservado, puede sufrir mutaciones con la finalidad de sobrevivir ante las condiciones adversas a las que se exponga (Stover et al., 2000). La naturaleza altamente adaptable de *P. aeruginosa* se debe principalmente a la inserción de diversos elementos extracromosomales como son los plásmidos, islas genómicas, bacteriófagos, transposones, entre otros (Kung et al., 2010).

La cepa de referencia que se emplea con mayor frecuencia en la investigación científica es *P. aeruginosa* PAO1, una mutante de la cepa original PAO, resistente a

cloranfenicol que surgió de manera espontánea. Fue aislada por primera vez en 1954 de una herida infectada de un paciente en Melbourne, Australia. Desde entonces, se convirtió en la cepa de referencia para los análisis genómicos y funcionales del metabolismo y fisiología de *P. aeruginosa* (Klockgether et al., 2010).

1.2.-Relevancia clínica de *P. aeruginosa*

Un aspecto relevante de *P. aeruginosa* es su inclusión en la lista de patógenos bacterianos prioritarios o BPPL, por sus siglas en inglés (Bacterial Priority Pathogens List), propuesta por la organización mundial de la salud en mayo de 2024. Esta lista engloba 14 géneros bacterianos distintos, caracterizados por ser patógenos oportunistas resistentes a múltiples antibióticos. En este reporte, se cataloga a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos como un patógeno de alta prioridad en la salud pública mundial (WHO Bacterial Priority Pathogens, 2024).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista con el potencial de causar infecciones tanto en plantas como insectos y animales, incluido el ser humano (de Sousa et al., 2021). Se puede encontrar ocasionalmente colonizando ciertas partes del cuerpo humano con una baja prevalencia en individuos sanos, no obstante, causa infecciones agudas y crónicas de rápida evolución, prevalentes y de difícil tratamiento en huéspedes inmunocomprometidos (Lujan Roca, 2014). Por lo que *P. aeruginosa* puede encontrarse en pacientes con afecciones como fibrosis quística (FQ), SIDA, diabetes mellitus, quemaduras, neumonía, cáncer, neutropenias, bronquiectasia, entre otras (de Sousa et al., 2021) y puede causar una amplia gama de infecciones con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en entornos hospitalarios. En este tipo de pacientes, existe un riesgo significativo de que infecciones localizadas evolucionen hacia infecciones sistémicas que ponen en peligro la vida. Estas infecciones pueden incluir infecciones cutáneas, oculares, óticas, respiratorias, gastrointestinales, urinarias y septicemias (Streeter & Katouli, 2016).

Es importante destacar que *P. aeruginosa* es un microorganismo de gran relevancia en enfermedades pulmonares, particularmente en FQ. Es la principal causante de infecciones pulmonares en los pacientes con esta afección, afectando a más del 80% de los mismos, aumentando el deterioro de la función pulmonar y la mortalidad asociadas a la enfermedad (Vicente-Altavás, 2017). Ya que la FQ se caracteriza por la sobreproducción y acumulación de moco dentro de los pulmones, que impide el correcto aclaramiento mucociliar, se crea un ambiente rico en nutrientes que es propicio para la

infección (Streeter & Katouli, 2016). *P. aeruginosa* aprovecha los ácidos grasos que se encuentran presentes en el surfactante pulmonar (rico en fosfatidilcolina y otros lípidos), así como en las membranas de las células epiteliales del huésped para nutrirse y llevar a cabo sus procesos metabólicos. Estos procesos se han especializado cada vez más en el uso de diversos compuestos como fuente de carbono, ayudando a la bacteria a proliferar en este tipo de entornos y como resultado, ocasionando el deterioro de la salud del huésped. Por si fuera poco, *P. aeruginosa* ha adquirido una gran resistencia a antibióticos a través de los años. En conjunto, estas características la han posicionado como la principal causa de muerte en individuos afectados por FQ (Vicente Altabás, 2017).

1.3.-Resistencia a antibióticos

Una de las características que hacen de *P. aeruginosa* un tema de relevancia en salud pública, es su alta resistencia a una larga lista antibióticos, entre ellos las quinolonas, los aminoglucósidos y los β -lactámicos (Tabla 1). Este microorganismo cuenta con múltiples mecanismos de defensa innatos contra antibióticos que se presentan simultáneamente, además, puede adquirir nuevos mecanismos de resistencia por medio de la transferencia horizontal de genes o a través de mutaciones, haciendo de *P. aeruginosa* un fenómeno en cuanto a resistencia a antibióticos (Strateva & Yordanov, 2009). Por estas razones, es considerada como uno de los patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos y estrategias terapéuticas para el tratamiento de las infecciones que produce (Lujan Roca, 2014; Pang et al., 2019; de Sousa et al., 2021).

Tabla 1. Resistencia intrínseca a antibióticos de *P. aeruginosa*. Modificado de Espinoza-Pesantez y Esparza-Sanchez, 2022)

B- lactámicos	Penicilinas y combinaciones de B-lactámicos Cefalosporinas 1º generación Cefalosporinas 2º generación y cefamicinas Cefalosporinas 3º generación Carbapenémicos		Ampicilina, amoxicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico Cefazolina, cefalotina, cefadroxiolo, cefalexina Cefuroxima, cefoxitina, cefotetan Ceftriaxona, cefotaxima Ertapenem		
Tetraciclinas y glicilicelinas	Quinolonas	Anfenicoles	Nitrofuranos	Sulfonamidas asociadas a trimetoprima	
Tetraciclina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina	Ácidos nalidixico, ácido pipemídico	Cloranfenicol	Nitrofurantoína	Trimetoprima/sulfa metoxazol (cotrimoxazol)	

En general, *P. aeruginosa* presenta tres tipos de resistencia a antibióticos; intrínseca, adaptativa y adquirida, los cuales se presentan de manera simultánea y se potencian entre sí, además, un mismo mecanismo de resistencia puede formar parte de dos tipos de resistencia.

La resistencia intrínseca, engloba a todos aquellos mecanismos innatos que posee y que la hacen resistente a antibióticos por naturaleza. Estos mecanismos están presentes en todas las cepas de tipo silvestre de *P. aeruginosa* e incluyen sistemas de eflujo, permeabilidad de la membrana externa y producción de enzimas capaces de inactivar antibióticos. La resistencia adaptativa representa los mecanismos que la bacteria desarrolla de manera transitoria con la finalidad de ajustarse a las condiciones adversas, estos se inducen rápidamente y son dependientes de las condiciones del medio. Una vez que la presión selectiva ejercida cesa, la bacteria regresa a su estado de susceptibilidad basal. Entre ellos encontramos la sobreexpresión de genes relacionados a resistencia o las modificaciones estructurales. Finalmente, la resistencia adquirida se refiere a aquellos mecanismos que obtiene al exponerse a antibióticos y otros microorganismos que poseen resistencia a antibióticos, ya sea mediante mutaciones en sus propios genes o mediante la adquisición de nuevos elementos genéticos a través de plásmidos, integrones o transposones (Taylor et al., 2014; Espinoza-Pesantez y Sanchez-Esparza, 2021; Langendonk et al., 2021).

1.3.1.-Permeabilidad de la membrana externa

La membrana externa (ME) presente en las bacterias Gram negativas, es una barrera de protección intrínseca altamente efectiva contra antibióticos. Se encuentra compuesta por una bicapa asimétrica de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS), lo que la hace altamente hidrofóbica (Figura 1). Además, contiene numerosas proteínas, como lipoproteínas y porinas, que desempeñan distintas funciones, entre ellas proporcionar estabilidad estructural y permitir el paso de moléculas de tamaños específicos (Delcour, 2009; Chevalier et al., 2017). En conjunto, estas propiedades, hacen de la ME una barrera permeable y selectiva que tiene un gran impacto en la resistencia a antibióticos.

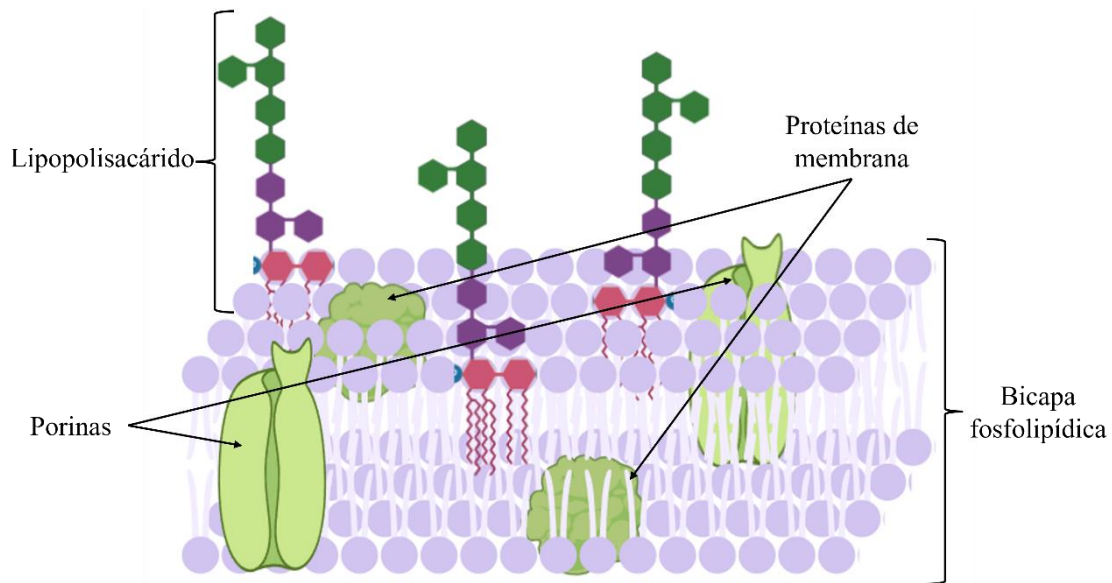


Figura 1. Membrana externa de las bacterias Gram negativas. La ME es una barrera semipermeable compuesta por una bicapa asimétrica de fosfolípidos y lipopolisacáridos, que contiene múltiples proteínas embebidas. Creada por el autor.

La mayoría de los antibióticos empleados para tratar infecciones por *P. aeruginosa* se dirigen hacia blancos intracelulares, por lo tanto, deben tener la capacidad para ingresar a la célula bacteriana, traspasando las membranas celulares (Pang et al., 2019b). Por ejemplo, algunos antibióticos β -lactámicos (penicilina, carbapenémicos y cefalosporina) y quinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina) ingresan a la célula usando los canales creados por las porinas (Pang et al., 2019b). Por otra parte, los aminoglucósidos (tobramicina, gentamicina, amikacina y kanamicina) y las polimixinas promueven su propia captación mediante interacciones directas con el LPS (Delcour, 2009).

1.3.1.1.-Proteínas de membrana externa

La permeabilidad restringida de la ME de *P. aeruginosa* limita significativamente la entrada de antibióticos a la célula, y en particular, las porinas reducen la tasa de penetración de dichos compuestos (Langendonk et al., 2021). En *P. aeruginosa* se han identificado 26 tipos de porinas, siendo OprF la más abundante. Esta proteína puede presentarse en dos formas distintas; la conformación abierta de un solo dominio, que representa menos del 5% de estas proteínas y, la conformación cerrada de dos dominios, que es la más abundante y la responsable de la baja permeabilidad de la ME (Sugawara et al., 2006; Langendonk et al., 2021).

La proteína OprF desempeña diversas funciones dentro de la célula bacteriana. Además de permitir el paso de iones y moléculas pequeñas, proporciona estabilidad

estructural a la célula, al unir la ME a la pared de peptidoglicano (Chevalier et al., 2017). También facilita la adhesión y la formación de vesículas de membrana y de la biopelícula (bajo condiciones anaeróbicas). Al estar localizada en la superficie externa de la célula bacteriana, participa en la interacción con el huésped y se cree que contribuye en la detección del sistema inmunológico (Cassin y Shan Tseng, 2019). Además, *P. aeruginosa* presenta otras porinas que aumentan su resistencia a los antibióticos, como OprD, que participa en la absorción de carbapenémicos (predominantemente imipenem y meropenem) y OprH, que través de interacciones con el LPS, reduce la concentración de Mg^{2+} , lo que modifica la afinidad de las polimixinas por la ME y, por ende, incrementa la resistencia a esta clase de antibióticos (Langendonk et al., 2021).

1.3.1.2.-Modificación del lipopolisacárido

Por otra parte, los LPS también promueven la resistencia a antibióticos. El LPS es una estructura que se encuentra anclada a la ME que está compuesto por 3 dominios (Figura 2): el lípido A que se encarga del anclaje, un centro de oligosacáridos y el antígeno O, que sobresalen de la célula (González-Alsina et al., 2023).

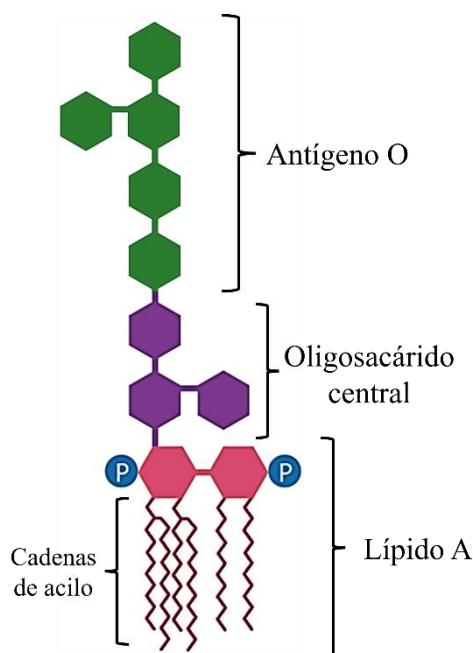


Figura 2. Estructura del Lipopolisacárido. La estructura del LPS consta de 3 partes: 1) Una parte lipídica anclada a la membrana externa; 2) Una región interna compuesta por oligosacáridos; y 3) La parte más externa, que es altamente inmunogénica y confiere especificidad serológica, llamada antígeno O. Creada por el autor.

El lípido A es un dímero de glucosamina, flanqueado por grupos fosfato y unido a cadenas de acilo embebidas en la membrana. Se encuentra unido mediante enlaces covalentes al oligosacárido central, el cual está compuesto por cadenas de azúcares. A su vez, el oligosacárido central se enlaza covalentemente al antígeno O, la región más

externa de LPS, formada por unidades repetidas de polisacáridos (González-Alsina et al., 2023).

Las modificaciones estructurales que ocurren en el LPS son las responsables de la resistencia a antibióticos y generalmente se dan en el lípido A. Dichas modificaciones protegen a la bacteria contra antibióticos, como los aminoglucósidos y péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs), como la polimixina, los cuales son antibióticos naturales producidos de manera innata por diversos organismos (incluyendo el ser humano) que, mediante interacciones con el LPS, logran ingresar a la célula (He & Deber, 2024). En general, las modificaciones del lípido A ocurren en dos regiones: 1) en los grupos fosfato, que pueden ser sustituidos por compuestos como fosfoetanolamina o 4-amino-L-arabinosa, lo que provoca la reducción de cargas negativas y disminuye la afinidad del LPS por los CAMPs (Anaya-López et al., 2013); y 2) en las cadenas de acilo, donde la acilación o adición de ácidos grasos al LPS altera la fluidez y permeabilidad de la ME, dificultando así el paso de antibióticos a la célula bacteriana (Huszczynski et al., 2020a).

1.3.2.-Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son importantes mecanismos desarrollados por las bacterias con la finalidad de eliminar compuestos tóxicos, incluyendo productos de desecho, toxinas, detergentes, especies reactivas de oxígeno y antibióticos (Aeschlimann, 2003). Estas bombas requieren de la fuerza protón motriz para exportar antibióticos tanto del citoplasma como del periplasma hacia el exterior de la célula y pueden ser específicas para cierto tipo de sustratos o pueden actuar sobre un amplio rango de moléculas (Langendonk et al., 2021).

La bomba de eflujo MexAB-OprM se expresa de manera constitutiva y fue la primera bomba de eflujo descrita en *P. aeruginosa*. Se considera como la principal bomba de eflujo encargada de la resistencia a antibióticos, ya que puede expulsar antibióticos como cloranfenicol, tetraciclinas, penicilinas, quinolonas, macrólidos, lincomicina, novobiocina y la mayoría de los β -lactámicos (Lorusso et al., 2022).

1.3.3.- Enzimas bacterianas

P. aeruginosa produce de manera constitutiva diversas enzimas capaces de inactivar, modificar o degradar antibióticos. Estas enzimas se pueden clasificar en tipos de acuerdo al antibiótico al que vayan dirigidas o a su mecanismo de acción y, pueden ser parte tanto de la resistencia intrínseca como de la adquirida.

1.3.3.1.- β -lactamasas

Ya se ha demostrado que *P. aeruginosa* puede producir una gran variedad de β -lactamasas. Estas enzimas pueden estar codificadas en el cromosoma, donde se expresan de manera basal como parte de un mecanismo intrínseco, pero también pueden sobreexpresarse en respuesta a la presencia de antibióticos como un mecanismo adaptativo. No obstante, algunas β -lactamasas pueden formar parte de la resistencia adquirida, pues se obtienen mediante transferencia horizontal de genes (Espinoza-Pesantez y Sanchez-Esparza, 2021). Su función es hidrolizar el anillo β -lactámico característico de los antibióticos β -lactámicos como penicilina, amoxicilina, ampicilina, ceftriaxona, imipenem, entre otros. Estos antibióticos interfieren con la síntesis de la pared celular y su mecanismo de acción se basa en bloquear las proteínas de unión a penicilina, lo que impide la síntesis y mantenimiento del peptidoglicano (Langendonk et al., 2021).

1.3.3.2.- Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son moléculas que se unen al ARNr 16S de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la síntesis de proteínas y, por ende, causando la muerte celular. Se componen de un anillo aminociclitol unido a uno o más aminoazúcares mediante enlaces glucosídicos (Jana & Deb, 2006).

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) catalizan la transferencia de grupos funcionales como fosfato, adenilo o acetilo, a los grupos -OH o -NH₂ de los aminoazúcares presentes en los aminoglucósidos. Como consecuencia, la afinidad de estos por el ARNr disminuye drásticamente, bloqueando su actividad (Espinoza-Pesantez & Sanchez-Esparza, 2021). Estas enzimas bloquean la actividad de casi todos los aminoglucósidos que existen mediante dichas modificaciones químicas y son parte de la resistencia intrínseca, sin embargo, también pueden ser adquiridas a través de transferencia horizontal (Ramirez & Tolmasky, 2010).

1.3.4.- Formación de la biopelícula

P. aeruginosa es una bacteria capaz de adoptar dos tipos distintos de estilo de vida, estado planctónico y estado sésil. El estilo de vida planctónico se da cuando esta se encuentra en un medio líquido, en donde las bacterias permanecen flotando libres, mientras que el estilo sésil se da en un medio sólido. Al encontrarse en estado sésil, las bacterias comienzan a formar una comunidad altamente organizada y compleja, rodeada de una matriz compuesta por ADN (<1%), ARN (<1%), exopolisacáridos (1-2%),

proteínas (<2%), lípidos (% variable) y agua (97%), la cual se conoce como biopelícula (Tuon et al., 2022).

Los lípidos son una de las biomoléculas más importantes para la formación de la biopelícula. Como componentes mayoritarios de las membranas celulares bacterianas, además de aportar características como integridad, permeabilidad, fluidez e hidrofobicidad a la membrana, también participan en la afinidad a superficie. Estas características favorecen la interacción entre la célula y la superficie, facilitando la adherencia y promoviendo la formación de la biopelícula (Dubois-Brissonnet et al., 2016). La composición lipídica de la membrana celular bacteriana, particularmente de ácidos grasos, cambia en respuesta a condiciones medioambientales tales como temperatura, moléculas tóxicas, salinidad y pH. Estos cambios alteran propiedades como la fluidez, organización y permeabilidad, volviendo a la membrana más rígida o resistente, favoreciendo la agregación celular y, por lo tanto, regulando la transición entre estado planctónico y biopelícula (Chao et al., 2010; Dubois-Brissonnet et al., 2016; Thi et al., 2020). Se ha observado que el crecimiento en biopelícula de *P. aeruginosa*, le permite incrementar su resistencia a antibióticos entre 100 y 1000 veces en comparación con el estilo de vida planctónico. Esto debido a las características físicas y de la biopelícula, a la comunicación celular y a las condiciones ambientales que se logran dentro de esta compleja matriz (Langendonk et al., 2021).

Además de actuar como una barrera física, la biopelícula también funciona como una barrera química altamente compleja que contribuye a la resistencia a antibióticos en muchas maneras (Langendonk et al., 2021). En primera instancia, la biopelícula restringe la entrada de antibióticos cargados positivamente, como la colistina o tobramicina, debido a la presencia de cargas negativas en los exopolisacáridos y en el ADNe. La captura de antibióticos por dichas moléculas impide que estos lleguen a las microcolonias situadas en capas más profundas de la biopelícula, favoreciendo la aparición de fenotipos más resistentes (Sindeldecker y Stoodley, 2021) .

La formación de la biopelícula (Figura 3) es un proceso complejo y conservado, que se divide en cinco etapas: (1) la adhesión inicial de las células bacterianas a la superficie mediante el uso de estructuras de movilidad como pilis y flagelos y la biosíntesis de exopolisacáridos; (2) la adhesión primaria, un proceso irreversible en el que comienza la división celular; (3) la propagación de las bacterias sobre la superficie que permite la comunicación celular y la formación de microcolonias que dan lugar a una

biopelícula inmadura; (4) las microcolonias se desarrollan en capas, formando una estructura en forma de hongo, lo cual es un rasgo característico de la maduración de la biopelícula, y finalmente, (5) la ruptura del centro de esta estructura en forma de hongo que permite liberación y dispersión de las células, lo que promueve la colonización de otros sitios (Thi et al., 2020).

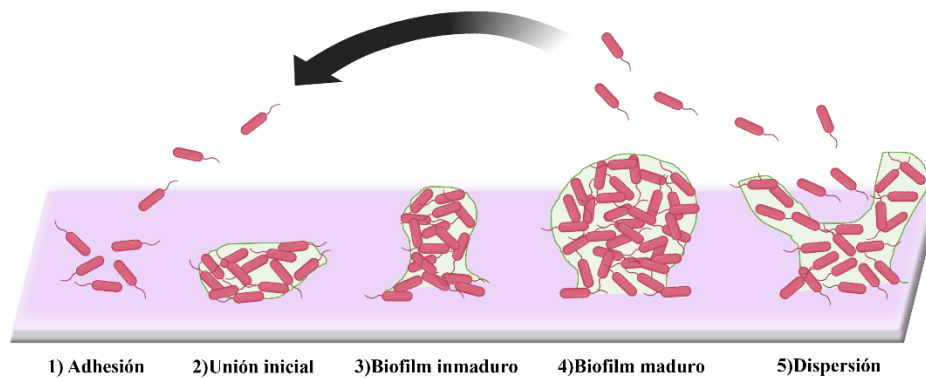


Figura 3. Ciclo del desarrollo de la biopelícula. El ciclo del desarrollo de la biopelícula está dividido en cinco etapas. Primero, las células se adhieren a la superficie. Posteriormente comienza la división celular y se establece la adhesión primaria, un proceso reversible. Luego, la adhesión se vuelve irreversible y comienza la formación de microcolonias que dan lugar a una biopelícula inmadura. A continuación, la comunicación celular y la producción de factores de virulencia conducen a la maduración de la biopelícula, una estructura característica en forma de hongo. Finalmente, esta estructura se rompe y permite la dispersión de las células, que comenzarán nuevamente con el ciclo. Creada por el autor.

Las células que crecen en biopelícula, experimentan diversos cambios metabólicos, fisiológicos y fenotípicos. La expresión génica se ve regulada diferencialmente en comparación con las células platónicas (aquellas que se encuentran libres), presentándose cambios en la expresión de proteínas involucradas en la resistencia al daño oxidativo, metabolismo, producción de exopolisacáridos, biosíntesis de fosfolípidos, secreción y transporte de membrana. Además, la expresión de proteínas involucradas en ciclo de Krebs y en el metabolismo de aminoácidos aumenta, lo que sugiere cambios en el metabolismo del carbono (Drenkard, 2003). Asimismo, en las capas formadas dentro de la biopelícula se generan distintos gradientes de oxígeno y nutrientes, por lo que las bacterias que se encuentran en capas más superficiales tienen un mayor acceso a estos recursos en comparación con aquellas situadas en capas más profundas. Como consecuencia, se crean diferencias metabólicas entre las microcolonias de la biopelícula, lo que conlleva a una población heterogénea. Esta heterogeneidad metabólica favorece la formación de microcolonias con una mayor resistencia a antibióticos (Drenkard, 2003). La baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno también puede inducir un fenotipo de crecimiento lento o el aumento en las respuestas de estrés, como la

respuesta SOS y la respuesta rigurosa (stringent response). Estas respuestas inducen cambios globales en el metabolismo bacteriano, inhibiendo la síntesis de ARN en el caso de la respuesta rigurosa o induciendo la activación de los sistemas de reparación de daño al ADN en el caso de la respuesta SOS. Ambas respuestas inducen un estado de dormancia que es más resistente a antibióticos debido a la baja actividad metabólica (Van Delden et al., 2001; Cirz et al., 2006; Podlesek y Žgur Bertok, 2020). Por otra parte, el oxígeno limitado es un factor importante en la resistencia a algunos antibióticos, como los β -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas o tetraciclinas, que requieren de condiciones aeróbicas para ejercer su efecto (Sindeldecker y Stoodley, 2021; Fernández-Billón et al., 2023).

Otra característica que favorece la resistencia es el gran tamaño de la población bacteriana presente en la biopelícula. A mayor población, aumenta la posibilidad de formar subpoblaciones como las células persistentes o colonias Phoenix, que presentan mayor tolerancia a antibióticos (Sindeldecker y Stoodley, 2021; Fernández-Billón et al., 2023). Además, la cercanía entre la comunidad bacteriana facilita la activación del *quorum sensing*, la adquisición de genes de resistencia a través de transferencia horizontal, el incremento natural de la tasa de mutaciones y la sobreexpresión de genes involucrados en la resistencia a antibióticos (Fernández-Billón et al., 2023).

1.3.5.- Formación de subpoblaciones

Durante la exposición a antibióticos, casi toda la población bacteriana es eliminada; sin embargo, una pequeña subpoblación resistente sobrevive, permitiendo la recolonización del sitio y dando lugar a una infección recalcitrante. Estas subpoblaciones que presentan un fenotipo resistente, son inestables y pueden revertir al tipo silvestre una vez que haya cesado la exposición al antibiótico (Sindeldecker y Stoodley, 2021).

1.3.5.1- Células persistentes

Las células persistentes son un fenotipo transitorio y no heredable que aparece en algunas especies bacterianas, incluyendo a *P. aeruginosa* (Hastings et al., 2023). Estas células se encuentran en un estado de dormancia metabólicamente inactivo y son tolerantes a diversas condiciones de estrés, como la deficiencia de nutrientes u oxígeno, daño al ADN, estrés oxidativo y exposición a antibióticos (Grassi et al., 2017). Aunque el mecanismo de generación de este fenotipo no se conoce con precisión, su formación se ha relacionado con diversos factores, como la exposición a antibióticos, cambios metabólicos, la expresión del sistema toxina-antitoxina, la fase de crecimiento y la

inducción del estado de dormancia mediante la activación de la respuesta rigurosa (Patel et al., 2022). Las células persistentes contribuyen en la resistencia a antibióticos durante las infecciones crónicas debido a que los antibióticos solo actúan sobre bacterias metabólicamente activas. Pero, una vez que la concentración del antibiótico se encuentra por debajo de la concentración mínima inhibitoria, estas recuperan el fenotipo silvestre y recolonizan el sitio de infección, impidiendo la eliminación total de las bacterias y causando infecciones recurrentes (Patel et al., 2022; Hastings et al., 2023).

1.3.5.2- Colonias fénix

Estas colonias fueron descritas en *P. aeruginosa* por primera vez en 2020 por Sindeldecker y colaboradores, quienes las nombraron colonias fénix debido a que surgían de un tapete de células muertas y proliferaban aún en presencia de antibióticos (Sindeldecker et al., 2020). Dichas colonias son capaces de permanecer metabólicamente activas y crecer en presencia de antibióticos, incluso en concentraciones 10 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria. Al igual que las células persistentes, su fenotipo silvestre se regenera una vez que la presión selectiva ejercida por la presencia del antibiótico se retira (Sindeldecker y Stoodley, 2021).

1.3.5.3- Variantes de colonias pequeñas (SCV, Small Colony Variants)

Las variantes de colonias pequeñas deben su nombre a su tamaño significativamente más pequeñas que las colonias de tipo silvestre. Constituyen una subpoblación bacteriana resistente a antibióticos y a la fagocitosis, que se ha relacionado con infecciones persistentes en pacientes con fibrosis quística y otras patologías pulmonares (Sindeldecker y Stoodley, 2021). Estas células se caracterizan por tasas lentas de crecimiento y una gran capacidad de adhesión a superficies, agregación, producción de exopolisacáridos y formación de biopelícula. Además, su fenotipo varía de acuerdo a las condiciones del ambiente en donde se encuentran (Malone, 2015; Pestrak et al., 2018). Su generación implica varios factores, como la respuesta adaptativa a condiciones de estrés y la presión selectiva que se ejerce sobre las bacterias cuando se encuentran colonizando al huésped, la exposición prolongada a antibióticos, la baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes, mutaciones en genes reguladores y alteraciones en el metabolismo, entre otros (Malone, 2015; Pestrak et al., 2018).

1.3.6.- Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes (THG) es una de las mayores fuentes de variabilidad genética en bacterias y desempeña un papel crucial en su adaptación y

evolución. Este mecanismo permite la transmisión de elementos genéticos como plásmidos, integrones, transposones, islas de resistencia y profagos a través de procesos como la transducción, transformación, conjugación o mediante vesículas de membrana (Johnston et al., 2023). Mediante la THG, las bacterias pueden adquirir material genético externo a su línea clonal, como genes de resistencia a antibióticos (GRA), genes que codifican factores de virulencia, genes de resistencia a metales pesados, entre otros, que les conferirán ventajas adaptativas para prosperar en condiciones adversas (Lerminiaux y Cameron, 2019).

La biopelícula desempeña un papel fundamental en este proceso debido a que la proximidad entre las células vuelve más simple encontrar donadoras y receptoras de material genético. Además, se ha observado que la biopelícula protege al ADN extracelular de la degradación por nucleasas, lo que aumenta su persistencia y disponibilidad para su incorporación por otras bacterias (Michaelis y Grohmann, 2023).

1.3.6.1.- Transducción

La transducción es un mecanismo de transferencia de material genético mediada por bacteriófagos. Estos virus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden actuar como reservorios de GRA. Sin embargo, debido a que la transducción está limitada por la especificidad del bacteriófago hacia la especie, representa una de las formas menos comunes de THG y de propagación de genes de GRA (Michaelis y Grohmann, 2023). Este proceso comienza cuando los bacteriófagos se unen a receptores específicos de la célula bacteriana e inyectan su material genético en el citoplasma. Dependiendo de su ciclo de vida (lítico o lisogénico), el bacteriófago puede replicarse y provocar la lisis de la bacteria o integrarse al cromosoma bacteriano como profago. En el ciclo lisogénico los profagos se replican y en ocasiones pueden empaquetar fragmentos del ADN bacteriano, que posteriormente serán transferidos a otra bacteria mediante la transducción (Chiang et al., 2019).

1.3.6.2.- Transformación

La transformación natural es el proceso mediante el cual las bacterias competentes captan el ADN exógeno del ambiente. Este proceso depende únicamente de la bacteria receptora y de la expresión de su maquinaria de competencia. El material genético es incorporado de manera permanente al cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga y posteriormente se hereda a las células hijas (Michaelis & Grohmann, 2023). La competencia es un estado fisiológico que desarrollan las bacterias, basado en la

expresión de diferentes proteínas de competencia conservadas, QS y sistemas de secreción y transporte (Johnston et al., 2014). Hasta hace algunos años no existía evidencia de que *P. aeruginosa* fuera naturalmente competente, puesto que este microorganismo no expresa los genes clásicos de competencia encontrados en otras bacterias (Seitz & Blokesch, 2013). No obstante, estudios recientes han demostrado que esta bacteria tiene la capacidad de captar ADN extracelular e integrarlo a su cromosoma cuando crece en biopelícula. Este fenómeno podría estar relacionado con la expresión de genes específicos en respuesta a las condiciones de la biopelícula, aunque el mecanismo exacto sigue siendo incierto (Nolan et al., 2020).

1.3.6.3.- Conjugación

La conjugación es el principal mecanismo de adquisición y transmisión de material genético empleado por *P. aeruginosa*. Este proceso puede ocurrir entre células de la misma especie o de especies diferentes y, en el caso de las bacterias Gram negativas, requiere de contacto directo célula-célula y de los sistemas de secreción tipo IV (T4SS). A través de este mecanismo se adquieren y transmiten elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y transposones que confieren resistencia a metales pesados y antibióticos (Virolle et al., 2020).

El mecanismo de conjugación consta de tres pasos: 1) procesamiento de ADN, 2) reclutamiento del ADN y 3) transferencia del ADN. El proceso comienza en el citoplasma de la célula donadora, en donde una región del ADN, denominada origen de transferencia, es procesada por un complejo multiproteico llamado relaxosoma. El procesamiento implica el corte y preparación de una de las cadenas del ADN para su transporte. Posteriormente, la proteína de acoplamiento T4CP recluta al complejo ADN-relaxosoma y lo dirige hacia el T4SS. Finalmente, el T4SS, una maquinaria celular que atraviesa las membranas interna y externa de la bacteria, transfiere el ADN a la célula receptora (Ilangovan et al., 2015; Virolle et al., 2020).

1.3.6.4.- Vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa (OMVs) son nanoestructuras esféricas secretadas por las bacterias Gram negativas mediante la formación y desprendimiento de protuberancias de la membrana externa. Su membrana está compuesta por una bicapa lipídica de fosfolípidos (en las capas interna y externa), lipopolisacáridos (en la capa externa), peptidoglicano y proteínas de membrana. Su contenido interior puede variar dependiendo de las condiciones ambientales, pero en general consta de proteínas

periplásmicas, ácidos nucleicos y otros componentes del citosol (Dell'annunziata et al., 2021). Estas estructuras desempeñan diversas funciones importantes como el transporte y adquisición de nutrientes, ácidos nucleicos, enzimas, toxinas y factores de virulencia. También participan en la respuesta al estrés, la protección contra ambientes hostiles, la comunicación celular, la modulación de la respuesta inmunológica del huésped y la formación de la biopelícula (MacDonald y Kuehna, 2013; Dell'annunziata et al., 2021). Además, se ha observado que pueden transportar material genético como ADN cromosómico, ADN de bacteriófagos y ARN, por lo que han sido reconocidas como vectores de THG importantes para la diseminación de GRA (Renelli et al., 2004; Nolan et al., 2020; Johnston et al., 2023).

Es importante destacar que la capacidad de *P. aeruginosa* para producir infecciones persistente y altamente mortales no se limita únicamente en su múltiple resistencia a antibióticos, sino que, gran parte de su potencial radica en el arsenal completo de factores de virulencia que le permiten nutrirse, evadir la respuesta inmunológica, traspasar las barreras naturales del huésped y sobrevivir ante las condiciones adversas del nicho en que se encuentre (de Sousa et al., 2021a). Estos factores no solo permiten el establecimiento de la infección, sino que también van a ayudar a que *P. aeruginosa* persista y cause daño en los tejidos del huésped, lo cual se traduce en su alta patogenicidad y prevalencia.

1.4.- Virulencia en *P. aeruginosa*

La virulencia es una propiedad asociada a los organismos patógenos que se define como la medida cuantificable que refleja el grado en que estos pueden ocasionar daño a su huésped. Este daño no es intencional y se produce como consecuencia de los mecanismos de supervivencia, por consiguiente, un factor de virulencia se puede catalogar como aquel componente inherente, ya sea molecular o estructural, que permita la evasión, modulación o supresión del sistema inmunológico del huésped, la invasión, supervivencia y/o la nutrición de dicho organismo, con el objeto de obtener una ventaja replicativa (Van Delden, 2004; Johnson, 2018).

P. aeruginosa presenta un vasto repertorio de factores de virulencia que utiliza para colonizar a su hospedero. Estos factores se encuentran estrechamente relacionados con la patogénesis de las infecciones producidas por este microorganismo, desde el momento en que entra al huésped, hasta el momento en que se ha establecido la infección. La producción de factores de virulencia es esencial para que las bacterias prosperen en nichos

intracelulares, debido a que les permitirán obtener nutrientes del medio, traspasar las barreras naturales y evadir la respuesta inmunológica del huésped. (Azam y Khan, 2019).

1.4.1.- Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

El primer paso en la infección por *P. aeruginosa* es la colonización de las células epiteliales del huésped, este paso implica a una serie de factores de virulencia que le permitirán movilizarse y adherirse.

1.4.1.1.-Biopelícula

La biopelícula permite a la comunidad bacteriana estar cerca de los sitios con mayor disponibilidad de nutrientes, facilita el intercambio de material genético como plásmidos y transposones, permite la adhesión a la superficie, favorece la comunicación célula-célula, proporciona resistencia al estrés ambiental y diversas moléculas como los antimicrobianos y resistencia mecánica hacia procesos como al engullimiento por fagocitos. Especialmente, los exopolisacáridos alginato, Pel y Psl, los compuestos mayoritarios de la biopelícula son los encargados de proporcionar protección contra el sistema inmunológico del huésped y contra antimicrobianos (Tuon et al., 2022). Los exopolisacáridos son liberados por la célula bacteriana hacia el ambiente extracelular desde la adhesión inicial y continúa durante toda la formación de la biopelícula (Ramsey y Wozniak, 2005). Estos cumplen con diversas funciones biológicas que son críticas para la formación de la biopelícula, la cuales incluyen: promover la adhesión inicial de las células a la superficie mediante interacciones en su membrana celular y la unión entre ellas para la formación de agregados, formar la estructura en que las células se unirán, fungir como barrera contra antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno (ROS), células del sistema inmunológico y biocidas y finalmente, almacenar nutrientes y fluidos para suministrarlos en condiciones de escasez y de este modo, asegurar la supervivencia bacteriana (Ma et al., 2022).

1.4.1.1.1.-Alginato

El alginato es un exopolisacárido polianiónico de alto peso molecular, constituido por unidades de β -D-manuronato y α -L-glucoronato (más comúnmente conocidos como ácido D-manurónico y ácido L-glucorónico respectivamente) unidas mediante enlaces 1,4-glicosídicos. Esta molécula desempeña un papel crucial en la estructuración de la biopelícula, contribuyendo a la retención de nutrientes y, gracias a sus propiedades hidrofílicas, es capaz de retener varias veces su volumen en agua, lo que protege a las células frente a la deshidratación. Además, aumenta la resistencia a los antibióticos

mediante diversos mecanismos, como el bloqueo de su entrada en la matriz, su captura o inactivación. También brinda protección frente a desinfectantes al formar una barrera física que resguarda las células y, finalmente, inhibe el ataque de las células del sistema inmunológico (Ma et al., 2022; Chung et al., 2023). Cuando el alginato es producido en exceso por las bacterias, estas son denominadas mucoides, este fenotipo es un factor significativo en las infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ ya que se correlaciona con la persistencia de las infecciones y con una rápida degradación de la función pulmonar (Boyd y Chakrabarty, 1995; Chung et al., 2023).

1.4.1.1.2.-Exopolisacárido Psl (Polysaccharide synthesis locus)

Psl es un pentasacárido de carga neutra, compuesto por unidades repetidas de L-ramnosa, D-glucosa y D-manosa en proporción 1:1:3, y está presente en todas las etapas de la formación de la biopelícula. Psl proporciona integridad estructural a la biopelícula ya que interconecta al ADN extracelular (ADNe) con la adhesina extracelular CdrA, ancla a la bacteria a la superficie y permite su enlazamiento con células vecinas. Además, a medida que las bacterias nadan acercándose a la superficie, van dejando un rastro de Psl sobre esta, lo cual atrae a otras células, favoreciendo así la formación de microcolonias y estimulando la producción de un mensaje intracelular secundario denominado monofosfato cíclico de di-guanosina, que impulsa la formación de la biopelícula. Por otra parte, esta molécula limita la penetración de antibióticos como las polimixinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas a la matriz e inhibe la fagocitosis, la destrucción celular por neutrófilos y la producción de ROS, ya que inhibe la eficiencia de algunos componentes del complemento, reduciendo la eficacia de la deposición del complemento, debilitando así la respuesta inmunológica del huésped (Van Tilburg-Bernardes et al., 2017; Chung et al., 2023). La producción de este exopolisacárido *in vivo* está asociada con una mayor tolerancia a la tobramicina. Aunque su síntesis ocurre principalmente en cepas no mucoides, como la cepa PAO1, también desempeña un papel clave en el desarrollo de la biopelícula en cepas mucoides, donde contribuye a la estabilidad de la estructura y facilita la evasión del sistema inmunológico durante la infección (Chung et al., 2023).

1.4.1.1.3.-Exopolisacárido Pel (Pellicle)

El exopolisacárido Pel está formado por residuos deacetilados de N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina. Su nombre está dado debido a que es un compuesto de suma importancia para la formación de películas (de ahí *pel*), un tipo de

biopelícula que se forman entre la interfaz líquido-aire en medios que se encuentran en reposo (Friedman y Koltder, 2004). Debido a que esta molécula posee una carga positiva, puede enlazarse con el ADN favoreciendo así la comunicación celular y evitando que este último sea degradado por las ADNasas. Además, debido a esta carga, puede secuestrar a antibióticos cargados positivamente como la tobramicina y otros aminoglucósidos y por ende conferir resistencia a ellos (Van Tilburg-Bernardes et al., 2017; Chung et al., 2023).

A pesar de que no todas las cepas de *P. aeruginosa* producen Pel como principal componente estructural de la biopelícula y que al igual que Psl, está asociado a cepas no mucoides, en algunas cepas como PA14, actúa como el principal andamiaje estructural, favorecedor de la comunicación celular y principal barrera física contra la actividad de diversas moléculas (Ghafoor et al., 2011; Thi et al., 2020; Ma et al., 2022). La capacidad de algunas cepas para producir de manera redundante los exopolisacáridos Psl y Pel para incorporarlos a la matriz, demuestra la gran capacidad adaptativa que tiene *P. aeruginosa* (Chung et al., 2023).

1.4.1.1.4.-ADN extracelular (ADNe)

El ADNe es el ADN genómico que ha sido liberado al espacio extracelular como resultado de lisis celular, liberación inducida por QS, muerte celular inducida por profagos o vesículas de membrana externa. Este componente desempeña un papel importante para la formación y estabilidad de la biopelícula. Se ha demostrado que el ADNe tiene un gran impacto sobre las propiedades de la superficie celular, lo cual es fundamental para la formación de la biopelícula debido a que mejora la adhesión inicial de las células bacterianas a través de la modulación de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre las bacterias y la superficie de unión (Sarkar, 2020). Además, el ADNe contribuye de manera significativa en la arquitectura y estabilidad de la biopelícula al funcionar como un polímero de interacción célula-célula permitiendo la cohesión bacteriana a través de las interacciones ácido-base y las fuerzas de Van der Waals que se crean entre las bacterias y el ADNe (Das et al., 2013). Asimismo, el ADNe mantiene la organización lineal de las células dentro de la biopelícula lo que facilita su movimiento y favorece su expansión. Esta disposición estructural es fundamental para la maduración de la biopelícula (Wilton et al., 2016).

1.4.1.2.-Estructuras de movilidad

Uno de los procesos cruciales para la colonización bacteriana es la movilidad, para lo cual, las bacterias han desarrollado maquinarias que les permiten trasladarse para explorar su medio ambiente y unirse tanto a superficies vivas como inertes. *P. aeruginosa* presenta tres tipos de movilidad, las cuales varían en función del tipo de medio en que se encuentre: la movilidad por twitching ocurre cuando la bacteria está en un medio sólido, la movilidad por swarming se da cuando el medio es semisólido y finalmente, la movilidad por swimming tiene lugar en medio líquido. Estos mecanismos se llevan a cabo mediante estructuras que se extienden desde la superficie celular llamadas pilis y flagelos. De manera específica, el twitching se lleva a cabo mediante la retracción y extensión de los pili tipo IV en la célula individual; por su parte el swimming se genera mediante la rotación del flagelo, igualmente por la célula individual; y el swarming que es un tipo de movimiento en grupo ocurre mediante la coordinación de ambas estructuras (Khan et al., 2019; de Sousa et al., 2023).

1.4.1.2.1.-Flagelo

Los flagelos son maquinarias complejas y ampliamente distribuidas entre múltiples especies bacterianas, los cuales se caracterizan por ser apéndices largos, rotatorios y helicoidales que se localizan en la superficie celular. Estas estructuras permiten a las bacterias desplazarse en superficies semisólidas y nadar en medios líquidos, propiciando la búsqueda de condiciones medioambientales favorables o la evasión de aquellas que son desfavorables. Además, funcionan de manera sincronizada con otros procesos celulares tales como el estado fisiológico de la bacteria, la virulencia y la formación de la biopelícula (Bouteiller et al., 2021).

En *P. aeruginosa*, así como en otras bacterias Gram negativas, el flagelo se extiende a través del citoplasma, la membrana interna, la capa de peptidoglicano y la membrana externa, anclado mediante el complejo de membrana, el cual está compuesto por un cuerpo basal, constituido por cuatro anillos; un sistema de secreción tipo III, que se encarga de la exportación de proteínas flagelares; un complejo estator, responsable de la rotación del flagelo y; una estructura en forma de varilla hueca. Conectados al complejo de membrana y sobresaliendo de la célula se encuentran el “hook” o “gancho” y el filamento de flagelina unidos entre sí por dos proteínas de unión (Bouteiller et al., 2021).

1.4.1.2.2.-Pilis

Los pilis son estructuras semejantes a cabellos, que se localizan en la superficie bacteriana. Estas estructuras flexibles y elásticas están compuestas en su mayoría, por un conjunto de proteínas llamadas pilinas dispuestas en una estructura helicoidal, la mayoría de las cuales son copias de una subunidad denominada pilina mayor (PilA). También existen otras pilinas de menor abundancia conocidas como pilinas menores, cuya presencia es igualmente esencial para la formación y funcionamiento de los pilis. Estas complejas maquinarias se extienden desde el citoplasma hacia el exterior de la célula atravesando las membranas interna y externa y la pared de peptidoglicano. Los pilis constan de cuatro componentes: (1) una ATPasa citoplasmática que activa el ensamblaje; (2) una proteína llamada PilC que actúa como plataforma de ensamblaje y transfiere la energía proveniente del ATP necesaria para la retracción y extensión del pili; (3) un canal de secretina y el filamento del pili, constituido por pilinas (Craig et al., 2019; de Sousa et al., 2023).

P. aeruginosa posee dos tipos pilis: pili tipo IV (T4P) y pili tipo IVa (T4aP); las cuales participan en procesos tales como la adhesión inicial a diversas superficies y el desplazamiento y dispersión de las células bacterianas sobre la superficie, lo que, a su vez, promueve la formación de la biopelícula y por ende la evasión de componentes del sistema inmunológico (Craig et al., 2019). Además, los pilis están implicados en la transformación natural, lo que contribuye a la plasticidad del genoma y a la evolución de los patógenos mediante la inserción de genes de resistencia a antibióticos y de genes asociados a la virulencia (Van Schaik et al., 2005; Filloux, 2010).

1.4.1.3.-Lipopolisacáridos

Los LPS constituyen uno de los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa* y son fundamentales para la patogénesis y la fisiología bacteriana (Martínez-Alcantar et al., 2021; Qin et al., 2022). Estas moléculas son endotoxinas altamente inmunogénicas que actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés: pathogen-associated molecular pattern) que pueden ser fácilmente reconocidas por el sistema inmunológico del huésped a través de receptores que activan diversas vías de transducción de señales, como el regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y el receptor tipo Toll 4 (TLR4) (Liao et al., 2022). A pesar de que su reconocimiento es un potente activador del sistema inmunológico del huésped, las

bacterias han desarrollado múltiples mecanismos para modificar la estructura del LPS y así pasar desapercibidas (Mamat et al., 2011).

Los LPS desempeñan un papel fundamental en las interacciones entre las células bacterianas y el medio que las rodea. Además de contribuir a la estabilidad e integridad de la membrana, su disposición les permite formar una barrera permeable que brinda protección a la célula contra diversos factores de estrés ambiental. Esta molécula posee una estructura bifásica, con una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, que restringe el paso tanto de compuestos polares como no polares, lo cual es particularmente útil cuando la bacteria se ve expuesta a antimicrobianos (Huszczynski et al., 2020a).

Como se mencionó con anterioridad, la estructura del LPS, se compone de tres dominios, el lípido A, un centro de oligosacáridos y el antígeno O (González-Alsina et al., 2023).

1.4.1.3.1.-Lípido A

El lípido A, el componente del LPS que se encuentra anclado a la membrana, es un compuesto hidrofóbico que le aporta permeabilidad a la membrana externa. Gracias a su disposición compacta y bien organizada, forma una barrera parecida a un gel, que impide el paso de pequeñas moléculas hidrofóbicas. Aunque es una estructura conservada, puede sufrir algunas modificaciones que serán importantes para la interacción entre la bacteria y el huésped o el medio ambiente. Estas modificaciones incluyen el grado de fosforilación, el número de cadenas de acilo, entre otras (Huszczynski et al., 2020a).

Las cadenas de acilo son el principal componente que interactúa con el complejo proteico humano MD-2/TLR4, el cual está especializado en reconocer los LPS para así activar la respuesta inmunológica. El lípido A proveniente de cepas de laboratorio presenta cadenas pentaaciladas en su estructura, mientras que el de aislados clínicos de pacientes con FQ, presentan cadenas hexa o heptaaciladas. Esta heptaacilación está relacionada con la incorporación del palmitato, un éster derivado del ácido palmítico, un ácido graso saturado que se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo humano. Dicha modificación estructural parecer estar relacionada con el incremento de la resistencia a antibióticos β -lactámicos y el aumento de la respuesta inflamatoria que contribuye al daño en los tejidos del huésped y, que se traduce en el agravamiento de la enfermedad (Ernst et al., 2003; Moskowitz y Ernst, 2010; Huszczynski et al., 2020a).

1.4.1.3.2.-Oligosacárido

La estructura del oligosacárido central varía entre las distintas cepas, sin embargo, algunas características permanecen conservadas. Se componen de 2 regiones; la región interna, que contiene ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo) o ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulopiranosónico (Ko) los cuales pueden estar unidos o no, mediante enlaces covalentes a residuos de heptosa; y la región externa, que a menudo contiene hexosaminas o hexosas (Huszczynski et al., 2020a). En *P. aeruginosa*, la región interna del oligosacárido central está compuesta por Kdo, heptosa, glucosa, ramnosa y galactosamina. Esta región se encuentra hiperfosforilada, pudiendo contener sustituyentes mono-, di- o trifosfato, lo cual se ha relacionado con la resistencia intrínseca a antibióticos (Mamat et al., 2011). La región externa puede estar conformada por una de dos isoformas o glicofomas distintas, las cuales contienen un residuo de N-alaniada, tres de D-glucosa y un residuo de L-ramnosa. Estas dos glicofomas, denominadas “capped” y “uncapped”, son sintetizadas simultáneamente en *P. aeruginosa*. La glicofoma capped se encuentra unida de manera covalente al antígeno O, mientras que la glicofoma uncapped carece de esta unión. Aunque la estructura interna de ambas glicofomas es conservada, la posición y enlace del residuo de L-ramnosa de la región externa difiere entre ellas (Kocincova y Lam, 2011).

Una de las funciones más relevantes del oligosacárido central es que debido a las cargas negativas presentes en él, confiere estabilidad a la membrana, creando puentes iónicos con cationes divalentes como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} que refuerzan la estructura membranal. Además, el plegamiento de algunas proteínas de la membrana externa depende de interacciones específicas con el oligosacárido central. Estas características son importantes para la resistencia a agentes antimicrobianos y otros compuestos dañinos para la célula bacteriana (Huszczynski et al., 2020a).

1.4.1.3.3.-Antígeno O

El antígeno O, también conocido como polisacárido O, constituye la región más variable del LPS (Nasrin et al., 2022). Está compuesto por unidades repetidas de azúcar que pueden variar en tipo, número (de una a cientos), en las uniones glucosídicas que las conectan y en la presencia o ausencia de ramificaciones. Esta variabilidad provee especificidad serológica a la bacteria y constituye la base del sistema de clasificación intraespecie conocido como serotipificación, que organiza a las cepas de acuerdo con el antígeno O presente en su membrana celular (Huszczynski et al., 2020a).

En *P. aeruginosa* se producen simultáneamente dos tipos de antígeno O: el antígeno O común, una estructura conservada compuesta por unidades repetidas de ramnosa unidas mediante enlaces glucosídicos específicos, y el antígeno O específico, cuya estructura es variable y determina el serotipo de la cepa (Huszczynski et al., 2020a; Jurado-Martín et al., 2021). Esta estructura es responsable de distintas interacciones huésped-patógeno como la resistencia al sistema del complemento, especialmente bloqueando la activación de C3 (González-Alsina et al., 2023), de esta manera brindando protección contra la fagocitosis y destrucción celular, protección contra el estrés oxidativo y estimulación de la NETosis (muerte celular mediada por neutrófilos) (Jurado-Martín et al., 2021). Además, se ha demostrado que las diferentes formas del antígeno O pueden alterar la hidrofobicidad de la membrana y por ende, alterar la capacidad de agregación celular y la formación de la biopelícula (Azimi et al., 2021), así como influir en la estructuración del T4P, a través de la adición de glucanos provenientes del antígeno O a la pilina, alterando la capacidad de adherencia de la bacteria (Allison y Castric, 2016). Una vez establecida la infección, se expresa otro tanto de factores de virulencia que facilitarán la nutrición, la interacción y moderación de la respuesta inmunológica del huésped, estos factores pueden ser endógenos o exógenos.

1.4.1.4.-Ramnolípidos

Los ramnolípidos (RL) son moléculas anfipáticas que pueden reducir la tensión superficial entre dos fases inmiscibles entre sí, es decir, biosurfactantes. Estas moléculas se producen como metabolitos secundarios de manera natural por algunos microorganismos, principalmente *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez et al., 2020). Su estructura está compuesta por dos partes unidas mediante enlaces O-glicosídicos: una porción lipídica de naturaleza hidrofóbica, formada por una o más cadenas de ácidos grasos (saturados o insaturados) unidas entre sí mediante enlaces éster y, una porción de naturaleza hidrofílica compuesta por mono o di-(L)-ramnosas unidas mediante enlaces α -1,2-glicosídicos, (Thakur et al., 2021). La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* producen dos tipos de RL, mono-RL y di-RL, que contienen cadenas de ácidos grasos de 10 carbonos (C₁₀) (Soberón-Chávez et al., 2020). No obstante, la longitud de las cadenas de ácidos grasos puede variar desde C₈ hasta C₂₄, con enlaces simples o dobles, dando como resultado una multitud de congéneres de RL (Wang et al., 2007; Thakur et al., 2021).

Los RL, desempeñan un papel crucial durante la infección por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ debido a que afectan el aclaramiento pulmonar al frenar y desincronizar el movimiento de los cilios, lo que impide la correcta eliminación de los microorganismos (Constantino-Teles et al., 2022). Además, pueden incorporarse a las membranas celulares de los tejidos alterando la arquitectura de las uniones celulares, lo que facilita la invasión bacteriana, y degradan el surfactante pulmonar debido a sus propiedades detergentes y solubilizantes (Muggeo et al., 2023). Asimismo, los RL protegen a *P. aeruginosa* contra el sistema inmunológico del huésped al formar micelas citotóxicas que rompen la membrana de los macrófagos inhibiendo de esta manera la fagocitosis. No obstante, estas micelas de RL no solo son tóxicas para los macrófagos, sino que también son capaces de dañar células epiteliales y glóbulos rojos, aumentando el daño tisular y la inflamación en el huésped (Xu et al., 2024).

1.4.1.5.-Metalóforos:

1.4.1.5.1.-Piocianina

El hierro es un elemento esencial para casi todos los seres vivos debido a que, participa en procesos necesarios para la vida como la respiración aeróbica, actúa como cofactor enzimático en la biosíntesis y reparación del ADN, y está involucrado en el metabolismo de xenobióticos dependiente de citocromo. Durante la infección en el humano, *P. aeruginosa* encuentra una gran cantidad de hierro, sin embargo, este no se encuentra libre, debido a su toxicidad e insolubilidad. En respuesta a esta limitación, *P. aeruginosa* produce sideróforos, los cuales son moléculas encargadas de quelar hierro y transportarlo hacia el espacio intracelular para así cumplir con sus necesidades metabólicas (Schalk y Perraud, 2023).

La piocianina (PCN) es uno de los metabolitos secundarios más importantes sintetizados por *P. aeruginosa*, cuya producción está regulada por el QS. Es un compuesto heterocíclico formado por dos subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina, de color azul, con capacidades oxidantes y reductoras. Es importante para el mantenimiento del estado redox, para la supervivencia de las bacterias en condiciones anaerobias o microaerofílicas y para la competencia con otros microorganismos por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antibiofilm (Mudaliar y Bharath-Prasad, 2024). La PCN actúa como molécula de señalización para el QS y como factor de virulencia. Se ha demostrado que la PCN inhibe la función ciliar, la respiración celular, la liberación de prostaglandinas y el crecimiento de las células epidérmicas; contribuye en la formación de la biopelícula

debido a que la lisis celular resultante del estrés oxidativo libera DNAe, que promoverá las interacciones celulares; incrementa el estrés oxidativo, mediante el incremento de ROS en el espacio intracelular y; altera la homeostasis de calcio y la respuesta inmunológica del huésped mediante la modulación de los niveles de interleucina 8 y RANTES, quimiocinas que participan en el reclutamiento de células del sistema inmunológico. Asimismo, se sabe que la PCN protege a las células bacterianas contra las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Lau et al., 2004; Seder et al., 2023).

1.4.1.5.2-Pioverdina

El sideróforo pioverdina (PVD), es un metabolito secundario con alta afinidad por el hierro. La estructura general de las pioverdinas posee tres partes; (1) una cadena peptídica formada por 6 a 12 aminoácidos; (2) el grupo cromóforo 2,3-diamino-6,7-dihidroxiquinolona, que es el responsable de la fluorescencia de la molécula y es clave para la captación del hierro; y (3) una cadena lateral que en la mayoría de los casos es un ácido málico, succínico o uno de sus derivados amínicos. Estas partes en conjunto forman tres sitios quelantes de hierro; dos hidroxamatos y un catecol. *P. aeruginosa* produce tres clases de pioverdinas PVDI, PVDII y PVDIII, las cuales se diferencian entre sí por la cadena peptídica que poseen. La cepa PAO1 produce pioverdinas de clase I, las cuales son caracterizadas por poseer una estructura cíclica formada por los últimos cuatro aminoácidos de la cadena peptídica (Ghssein y Ezzeddine, 2022).

La PVD autorregula su producción en respuesta a las concentraciones de hierro ambientales y no es el primer quelante de hierro que se produce por *P. aeruginosa* durante la infección. Dentro del huésped no solo desempeña un papel como quelante de hierro, compitiendo con otras proteínas que contienen hierro como las transferrinas, ferritina y hemoglobina, sino que también puede actuar como molécula de señalización, activando las vías de producción de factores de virulencia como la endoproteasa PrpL y la exotoxina A, además de otros factores de virulencia que se producen en condiciones de deficiencia de hierro. Asimismo, se ha encontrado que el transporte de hierro actúa como señal para la formación de la biopelícula. Sumado a esto, las PVDI pueden quelar otros metales como cadmio, cobre, níquel y zinc permitiendo su expulsión del periplasma hacia el espacio extracelular; sin embargo, esta acción no ocurre en sentido contrario. En *P. aeruginosa* la acumulación de PVDI en el periplasma ayuda a bloquear la entrada de metales indeseados al citoplasma, manteniendo el equilibrio intracelular de iones

metalicos, evitando interacciones inespecíficas entre metales y proteínas celulares (Ghssein y Ezzeddine, 2022). Se ha encontrado que, en modelos *in vivo*, la PVD es esencial para la patogénesis de *P. aeruginosa* durante la infección. Por otra parte, las cepas provenientes de aislados clínicos, principalmente aquellas aisladas de infecciones del tracto urinario, producen pioverdina en gran cantidad y son capaces de evadir la respuesta inmunológica del huésped (Chadha et al., 2022; Ghssein y Ezzeddine, 2022).

1.4.1.5.3.-Pioquelina

Otro sideróforo producido por *P. aeruginosa* es la pioquelina (PCH) que, a pesar de tener menor afinidad por el hierro a comparación de la PVD, se produce en primera instancia debido a que la biosíntesis de PVD requiere mucha energía (Jurado-Martín et al., 2021). La PCH, al igual que la PVD, es un péptido no ribosomal que contiene en su estructura una molécula de ácido salicílico enlazada a dos moléculas de cisteína. Dado que esta molécula posee una baja especificidad, puede quelar otros metales además del hierro, como zinc, níquel, molibdeno, galio, cobre y cobalto; no obstante, en *P. aeruginosa* solo se promueve la acumulación y transporte de níquel y cobalto. La PCH es liberada al espacio extracelular, en donde quela los diferentes metales para limitar su entrada al espacio intracelular y así aumentar la tolerancia de la bacteria hacia los metales y evitar su intoxicación (Ghssein y Ezzeddine, 2022). Se cree que la PCH podría ser la responsable de la respuesta inflamatoria continua que causa daños tisulares en el huésped durante la infección crónica por *P. aeruginosa*, especialmente en infecciones pulmonares (Jurado-Martín et al., 2021). Sumado a esto, contribuye a la evasión del sistema inmunológico y a la inducción de lisis de los macrófagos y neutrófilos (Chadha et al., 2022).

1.4.1.6.-Proteasas

P. aeruginosa produce una gran cantidad de enzimas proteolíticas extracelulares que desempeñan diversas funciones en su metabolismo y virulencia, como elastasas, metaloproteasas, proteasa IV, proteasas queratinolíticas, proteasa alcalina, cisteína proteasa, serina proteasas, proteasa pequeña, exoproteasa, aminopeptidasa, MucD, entre otras. Aunque todas estas enzimas son importantes para la supervivencia y/o patogénesis de la bacteria, algunas han sido más estudiadas debido a su claro rol en la virulencia. Una de las proteasas más ampliamente estudiadas es la elastasa B (LasB) o pseudolisina. Es la proteasa de mayor abundancia producida por *P. aeruginosa* y es considerada como el principal factor de virulencia extracelular (Jurado-Martín et al., 2021). Su principal

función es degradar las fibras de elastina presentes en los tejidos epiteliales, sin embargo, puede degradar otras proteínas como el colágeno y las proteínas A y D del surfactante pulmonar. Además, degrada diversas proteínas del sistema inmunológico como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ (IFN- γ), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina 2 (IL-2), inmunoglobulina G (IgG) y los componentes C3a del complemento (Everett y Davies, 2021). La actividad elastinolítica de LasB ha sido relacionada con la inflamación vascular, la desorganización de las fibras elastina de los tejidos a causa de su degradación, así como con la hemorragia y el daño tisular en infecciones pulmonares en pacientes con FQ y en infecciones oculares en modelos animales (Galdino M et al., 2017).

Por su parte, la elastasa A (LasA), también conocida como staphyloolisina (por su capacidad para degradar el peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*), es capaz de desprender el proteoglicano sindecán 1 presente en la membrana de las células del huésped, lo cual ayuda en la evasión del sistema inmunológico (Galdino M. et al., 2017). A pesar de que esta enzima tiene una actividad elastinolítica escasa, potencia la actividad de LasB y otras proteínas elastinolíticas al degradar la elastina en fragmentos más accesibles para estas (Jurado-Martín et al., 2021). Por otra parte, se ha encontrado que cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos de aislados clínicos expresan el gen que codifica para LasA (Sun et al., 2013; Krishnan et al., 2019).

La proteasa IV (PIV), también llamada lisil endopeptidasa (PrpL), degrada principalmente el fibrinógeno, pero se ha observado que también puede degradar las proteínas A, B y D del surfactante pulmonar *in vitro*, lo cual disminuye la opsonización y dificulta el reconocimiento y fagocitosis bacteriana por los macrófagos alveolares (Malloy et al., 2005; Galdino M et al., 2017). Asimismo, puede degradar componentes del sistema inmunológico como C3 y C1q del sistema del complemento, IgG, IL-22 y el péptido antimicrobiano LL-37 (González-Alsina et al., 2023). También actúa sobre la lactoferrina y la transferrina, proteínas de unión al hierro que forman parte de los sistemas de defensa del huésped al secuestrar el hierro para evitar su disponibilidad para las bacterias, facilitando de esta manera la adquisición de hierro a través de la pioverdina (Conibear et al., 2012). De igual manera, se ha encontrado que la producción de PIV durante la infección está relacionada con el agravamiento de la neumonía y daño pulmonar en humanos y en modelos animales, así como con la formación de lesiones y necrosis corneal en modelos de queratitis (O'callaghan et al., 2019), además, participa en

la invasión y destrucción de los tejidos y en eventos hemorrágicos a causa de la destrucción del fibrinógeno (Galdino M. et al., 2017). Pese a su capacidad para generar daño y degradar componentes del sistema inmunológico del huésped, se ha encontrado que la PIV presenta baja inmunogenicidad y que la producción de anticuerpos específicos contra ella es poco común, lo cual la hace un factor aún más importante en la evasión del sistema inmunológico (O'callaghan et al., 2019).

Otra proteasa ampliamente estudiada es la proteasa alcalina A (AprA) o aeruginolisina (Galdino M. et al., 2017), esta enzima tiene una amplia especificidad de sustrato y puede degradar una gran cantidad de proteínas del huésped, incluyendo proteínas de la matriz extracelular como la laminina y la fibronectina, componentes del sistema inmunológico como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 y los componentes C1s, C2 y C3 del sistema del complemento, provocando una respuesta inmune debilitada, interfiriendo en la quimiotaxis de neutrófilos y evadiendo la fagocitosis mediada por el complemento (Iiyama et al., 2017; Andrejko et al., 2019). Además, como un mecanismo de evasión del sistema inmunológico, AprA degrada la flagelina para evitar ser reconocida por los receptores tipo Toll del huésped y de esta manera evitar la activación de la respuesta proinflamatoria, promoviendo así la invasión de los tejidos (Casilag et al., 2015).

1.4.2.-Regulación de la virulencia en *P. aeruginosa*

1.4.2.1- *Quorum sensing*

El Quorum sensing (QS) es un sistema de comunicación célula-célula que permite a las bacterias percibir las condiciones medioambientales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, osmolaridad, pH y medir la densidad poblacional. De este modo, las bacterias pueden actuar de manera coordinada en respuesta a la información registrada (Brindhadevi et al., 2020). El QS es considerado como el mayor determinante de virulencia de *P. aeruginosa* ya que puede regular hasta aproximadamente el 10% de todo el genoma. Cuando las bacterias detectan cambios en el medio que las rodea, se inicia el proceso de modificación de la transcripción de genes asociados con el metabolismo y producción de factores de virulencia. Estas alteraciones están dirigidas hacia la transferencia de nutrientes, la síntesis de péptidos antimicrobianos, la conjugación de plásmidos, la formación de la biopelícula y, especialmente, la producción de factores de virulencia. Como resultado de esta comunicación celular, las bacterias son capaces de adaptarse a su entorno y prosperar en los distintos nichos a los que se enfrentan, lo cual

es crucial en su patogénesis y virulencia (Smith y Iglewski, 2003; Van Delden, 2004; Johnson, 2018).

P. aeruginosa posee tres sistemas de QS (Figura 4): Las, Rhl y PQS (Pseudomonas quinolone signal). Se cree que estos sistemas son jerárquicos ya que están interconectados y son regulados de manera secuencial, siendo el sistema Las el que se encuentra en la parte superior de la jerarquía (Lee y Zhang, 2015). En estos sistemas de comunicación participan tres principales moléculas autoinducidas; N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL), N-butil-L-homoserina lactona (C4-HSL) y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) respectivamente (Azam y Khan, 2019).

El sistema Las está conformado principalmente por dos moléculas: LasI, una sintasa clave para la producción de OdDHL y LasR, un regulador transcripcional. La OdDHL es una molécula fundamental para la inducción del QS en *P. aeruginosa* puesto que activa al regulador transcripcional LasR al unirse a él, desencadenando la transcripción de diversos factores de virulencia, incluyendo las elastasas Las A y Las B, la proteasa alcalina, la piocianina, la biopelícula y la exotoxina A (Mukherjee y Bassler, 2019).

El sistema Rhl, el segundo en la jerarquía, actúa de manera similar a Las. Este sistema emplea las moléculas RhlI, una sintasa que produce C4-HSL y RhlR, un regulador transcripcional. Al igual que el sistema Las, la molécula C4-HSL se une al regulador transcripcional RhlR, controlando la expresión de distintos genes involucrados en la producción de factores de virulencia, como ramnolípidos, cianuro de hidrógeno, piocianina, entre otros (Kariminik et al., 2017; Mukherjee y Bassler, 2019).

El sistema PQS a diferencia de los sistemas Rhl y Las, emplea moléculas de señalización derivadas de las quinolonas. Este sistema comienza con la síntesis de la molécula 4-hidroxi-2-heptilquinolona (HHQ), que es producida por las enzimas codificadas por el operón PqsABCDE. Posteriormente, la enzima PqsH convierte a HHQ en PQS. Después, PQS se une al regulador transcripcional PqsR (aunque HHQ también puede hacerlo, pero con menor afinidad) para activar la transcripción de genes asociados a factores de virulencia como piocianina, cianuro de hidrógeno, ramnolípidos, vesículas de OMVs, entre otros (Mukherjee y Bassler, 2019; Chadha et al., 2022).

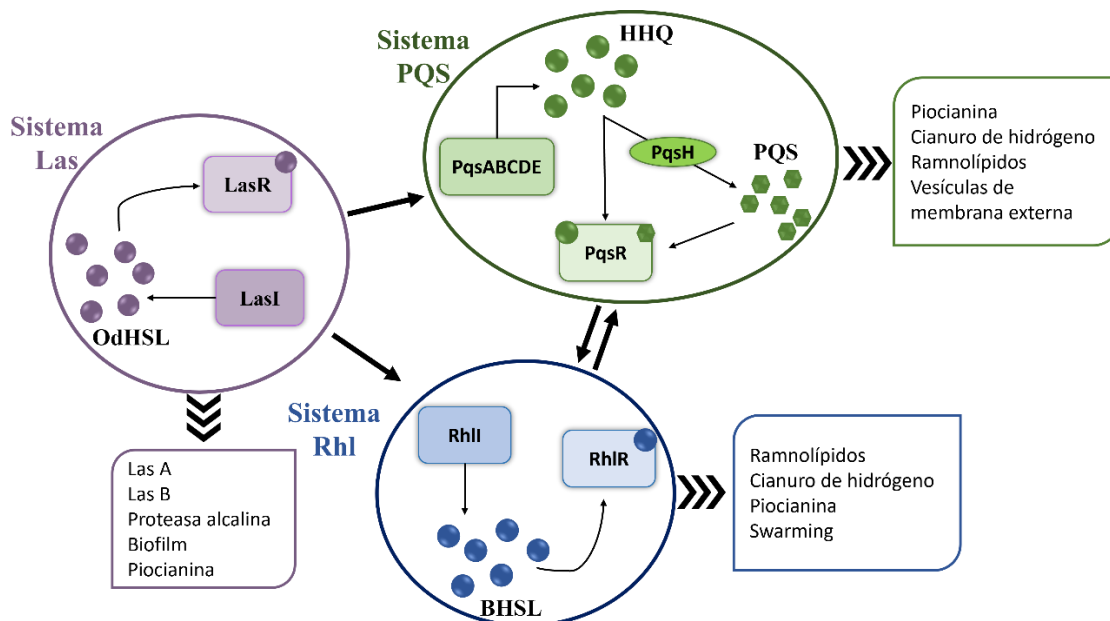


Figura 4. Sistemas de Quorum sensing de *P. aeruginosa*. El QS en *P. aeruginosa* está regulado por tres sistemas principales: Las, Rhl y PQS. 1) Sistema Las: La sintasa LasI produce a la molécula de señalización OdDHL, que se une al regulador transcripcional LasR para activar la transcripción de factores de virulencia. 2) Sistema Rhl: la sintasa RhII produce la molécula C4-HSL, que se une al regulador transcripcional RhIR para inducir la expresión de factores de virulencia. 3) Sistema PQS: El operón PqsABCDE sintetiza HHQ, que es convertida en PQS por la enzima PqsH. PQS se une al regulador transcripcional PqsR (con mayor afinidad que HHQ) para activar la transcripción de genes asociados a la virulencia. Creada por el autor.

1.4.2.2- Control metabólico

P. aeruginosa es un microorganismo capaz de sobrevivir en diferentes ambientes gracias a que posee una gran versatilidad metabólica. Esta bacteria tiene la capacidad de ajustar su metabolismo en función de las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes, factores de estrés y estilo de vida (planctónico o biopelícula). Como consecuencia de la adaptación, características como el crecimiento, el QS y la producción de factores de virulencia se ven modificadas (La Rosa et al., 2018). Es un hecho que la producción de todos los factores de virulencia depende de precursores que se obtienen a partir del metabolismo de diferentes sustratos y que, por ende, su síntesis está directamente relacionada con el metabolismo. Por esta razón, en los últimos años se han realizados diversos estudios para explorar esta conexión.

Estudios robustos de secuenciación han asociado múltiples rutas metabólicas con la virulencia, revelando que algunas proteínas involucradas en la virulencia y resistencia también contribuyen en la capacidad adaptativa y en la versatilidad nutricional de este microorganismo (de Sousa et al., 2021b). Tal es el caso de la proteína CrbA, una cinasa implicada en la degradación de carbono y nitrógeno, que también influye en la formación de la biopelícula, la citotoxicidad, la movilidad por swarming y la resistencia a

antibióticos. Otro caso es el gen *AaaA*, que codifica para una proteína implicada en el transporte de la arginina, que participa en la resistencia a antibióticos y en la adaptación en las infecciones de heridas, donde la única fuente de nitrógeno son péptidos con arginina (Panayidou et al., 2020).

Los cambios en el metabolismo central, específicamente, en los niveles de NADH y NAD⁺, así como en la unión de NADH a enzimas, son clave para la virulencia. Las cepas que se encuentran en biopelícula y presentan una mayor virulencia, se caracterizan por una disminución en la producción de NADH, así como una menor unión de este a enzimas. Esto sugiere que las bacterias más virulentas se encuentran en un estado metabólico aletargado en comparación con aquellas que se encuentran en estado planctónico y son menos virulentas (Perinbam et al., 2020). Además, algunos metabolitos secundarios también se han asociado con la virulencia. Por ejemplo, el corismato, un precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales también funciona como precursor para la síntesis de pirocianina y otras fenazinas (Panayidou et al., 2020). Asimismo, se ha observado que, algunas rutas metabólicas, como la ruta del glioxilato, son esenciales para la virulencia de *P. aeruginosa*, puesto que, al inhibirla, esta suprime su virulencia (Perinbam et al., 2020).

Durante la infección, las bacterias sufren de distintos cambios fisiológicos y metabólicos con la finalidad de adaptarse al medio ambiente. Se ha encontrado que las cepas virulentas y avirulentas expresan de manera diferencial genes involucrados en la degradación y biosíntesis de compuestos aromáticos como el succinato, xilenol y corismato; en la biosíntesis de aminoácidos como la glutamina; y en la vía de la β -oxidación (Panayidou et al., 2020). Incluso, durante infecciones pulmonares algunas mutantes en el sistema Las crecen más en presencia de aminoácidos específicos y nitrato como única fuente de nitrógeno y se vuelven más tolerantes a antibióticos. Asimismo, mutantes en los genes *lasR* y *rhlI* muestran alteraciones en el ciclo de Krebs, biosíntesis/degradación de aminoácidos y metabolismo de ácidos grasos (La Rosa et al., 2019).

1.5.-Metabolismo energético de *P. aeruginosa*

Todos los organismos vivos poseen una variedad de rutas metabólicas a través de las cuales metabolizarán los nutrientes captados del medio ambiente para así llevar a cabo sus procesos vitales. Dichas rutas metabólicas son específicas para cada tipo de sustrato y varían entre especies bacterianas. *P. aeruginosa* puede utilizar diversas fuentes de

carbono como fuente de energía para llevar a cabo sus procesos metabólicos, entre estos destacan por preferencia, las fuentes de carbono (en especial a los ácidos grasos (AG)) y las fuentes de nitrógeno (particularmente aquellas que contienen aminoácidos) (Frimmersdorf et al., 2010). La poca disponibilidad de nutrientes no representa mayor problema para este microorganismo, puesto que ha desarrollado diversos mecanismos para la utilización de distintos compuestos, uno de ellos son las enzimas que le permiten utilizar sustratos que normalmente no podrían ser degradados como única fuente de carbono, cuando los nichos que colonice lo ameriten. Las fuentes de carbono asimiladas por la bacteria impactarán directamente su fenotipo, modificando su metabolismo y con ello la expresión de algunos factores de virulencia, crecimiento, estilo de vida (libre o plañtónico), formación de la biopelícula y resistencia a antibióticos (Sauvage et al., 2022). También es importante destacar que *P. aeruginosa* posee varios genes encontrados en el genoma central que codifican para proteínas implicadas en la respiración aeróbica, la fermentación anaeróbica y la desnitrificación (Mielko et al., 2019).

Dada la importancia de las infecciones pulmonares causadas por *P. aeruginosa*, se han realizado diversos estudios sobre las fuentes de nutrientes que puede utilizar dentro del huésped con mayor facilidad y el cómo estas modifican su fenotipo. Dichos estudios revelaron que, dentro de los pulmones, un ambiente rico en sustratos lipídicos, entre los que destacan aquellos con un alto contenido en AG, la fosfatidilcolina (Chakraborty y Kotecha, 2013; Constantino-Teles et al., 2022). Esta molécula se compone de colina, fosfato, glicerina y AG; estos últimos, en conjunto con los lípidos que se encuentran presentes en todas las membranas celulares y otros componentes estructurales dentro del ser humano pueden ser asimilados por *P. aeruginosa* desempeñando papeles importantes para el metabolismo, supervivencia y virulencia de la bacteria (Hausmann y Jaeger, 2010). Los AG son componentes de las membranas celulares, que proporcionan fluidez y brindan protección contra el medio ambiente, por lo que son indispensables para la integridad celular; además son componentes de las lipoproteínas que a su vez participan en el eflujo de fármacos y el transporte de LPS. La biosíntesis de diversos factores de virulencia como la pioverdina, los ramnolípidos, la biopelícula y los LPS depende directamente de los ácidos grasos. Asimismo, cofactores como la biotina, NADH, CoA, entre otros, necesitan ácidos grasos para su síntesis. Adicionalmente estas moléculas actúan como reguladores de la expresión génica, especialmente activando genes implicados en su propia síntesis y degradación. También son esenciales para la

biosíntesis de moléculas de señalización como las acil-homoserina lactonas (AHL) cuya acilación depende de los ácidos grasos. Estas moléculas a su vez activan al *Quorum sensing*, el principal determinante de virulencia en *P. aeruginosa* (Kang et al., 2009; Yuan et al., 2012).

El mecanismo por medio del cual *P. aeruginosa* toma los AG y compuestos lipídicos presentes en su huésped para incorporarlos a sus membranas no está completamente dilucidado, sin embargo, ya se han propuesto hipótesis basadas en el mecanismo de asimilación de ácidos grasos dependiente de proteínas acil coA sintetasas de *Escherichia coli* (Figura 5). Este mecanismo comienza con los AG en su forma libre, los cuales son interceptados por la proteína de membrana externa FadL que los introduce al espacio periplásmico, en donde la proteína de membrana interna FadD a través de una reacción dependiente de ATP y coenzima A (CoA) los transforma en Acil-CoA. Este producto tiene 3 destinos conocidos: 1.- puede ser utilizado como inductor transcripcional, 2.- puede ser metabolizado por beta oxidación para obtener Acetil CoA y eventualmente participar en diferentes rutas metabólicas (ciclo de los ácidos tricarboxílicos, síntesis de aminoácidos) y 3.- puede ser empleado para sintetizar fosfolípidos que serán incorporados a las membranas bacterianas (Pavoncello et al., 2022).

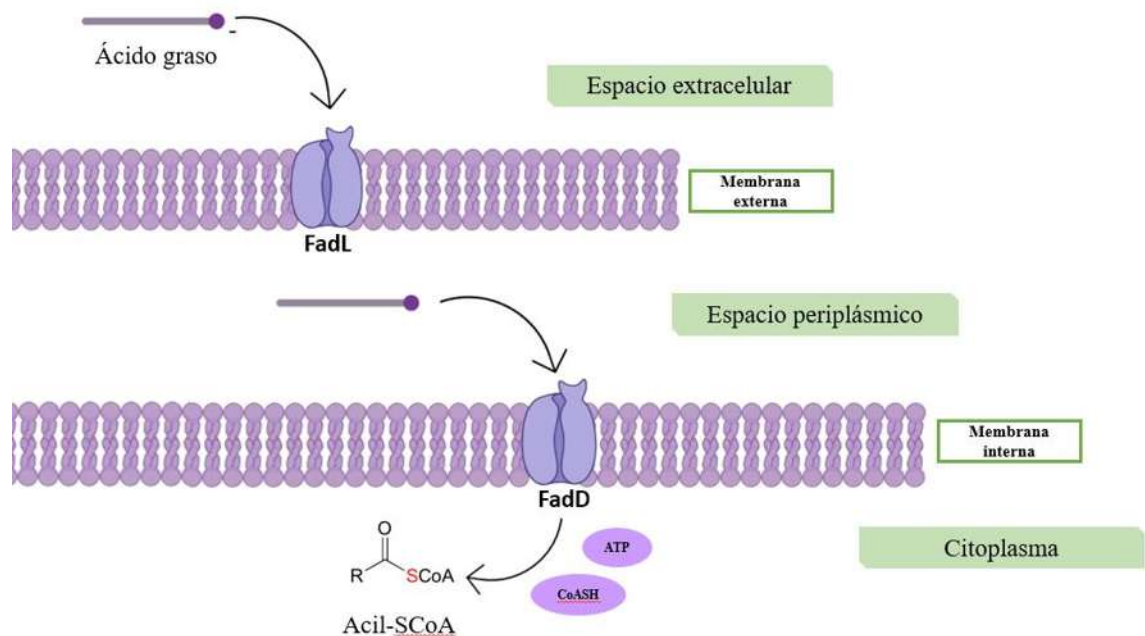


Figura 5. Mecanismo de asimilación de ácidos grasos dependiente de proteínas acil coA sintetasas de *E. coli*. El mecanismo consta de dos pasos: 1) Captura de los ácidos grasos por la enzima FadL; y 2) Captación y conversión del ácido graso en acil-CoA por la enzima FadD. Creada por el autor.

2.-ANTECEDENTES

2.1.-Mecanismo de asimilación de ácidos grasos por *P. aeruginosa*

Mediante análisis bioinformático, se han encontrado 6 genes homólogos a FadD de *E. coli*, dentro de *P. aeruginosa*, denominados FadD1, FadD2, FadD3, FadD4, FadD5 y FadD6. En la secuencia de aminoácidos de estos genes se detectó la presencia de motivos de unión a ATP/AMP y ácidos grasos, los cuales son característicos de las acil-Coenzima A sintetetas. Además, se demostró que son esenciales para el crecimiento de la bacteria en presencia de sustratos lipídicos como única fuente de carbono (Kang et al., 2010; Zarzycki-Siek et al., 2013; Martínez-Alcantar et al., 2021). A partir de este conocimiento se ha propuesto la siguiente hipótesis sobre el mecanismo de utilización de AG en *P. aeruginosa* (Figura 6). En primera instancia, el AG es captado por alguna de las 3 proteínas FadL (FadL1, FadL2, FadL3) conocidas. Posteriormente el AG es transportado a través del espacio periplásmico para luego ser interceptado por alguna de las 6 proteínas FadD conocidas. Aunque aún no se conoce bajo qué condiciones específicas actúe cada una de estas proteínas, ya se ha demostrado que tienen un papel fundamental en la degradación de AG y en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.

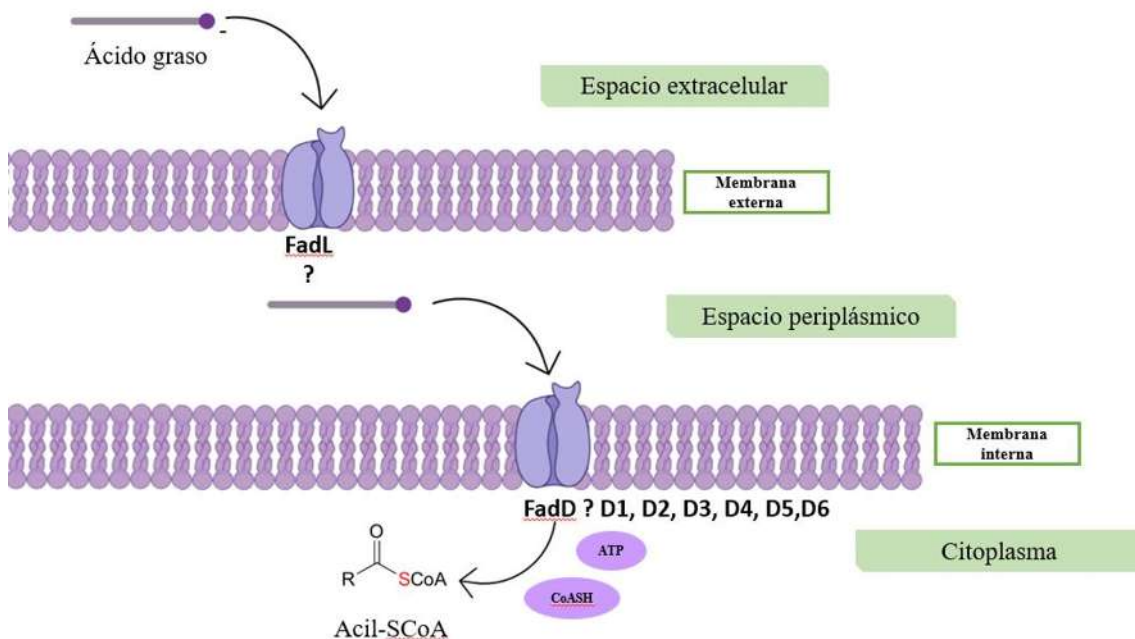


Figura 6. Mecanismo hipotético de la utilización de ácidos grasos por *P. aeruginosa*. El ácido graso es interceptado por alguna de las tres proteínas FadL conocidas, FadL1, FadL2 o FadL3. Posteriormente, alguna de las seis proteínas FadD conocidas convierten al ácido graso en acil-CoA. No se conocen bajo qué condiciones actúe cada una de ellas. Creada por el autor.

En 2013 Zarzycki-Siek y colaboradores realizaron diferentes mutaciones por delección de los genes *fadD* de *P. aeruginosa*, encontrando que las proteínas FadD juegan un papel crucial para el metabolismo de ácidos grasos, específicamente en la beta-oxidación. Las proteínas FadD presentan una amplia especificidad de sustrato, otorgando a *P. aeruginosa* la capacidad de crecer en ácidos grasos de diferentes longitudes y grados de saturación, lo cual resulta ventajoso para la bacteria, especialmente en entornos con baja disponibilidad de nutrientes. Además, se sugiere que la redundancia de estas proteínas no solo proporciona flexibilidad metabólica, sino que también la existencia de un mecanismo de adaptación evolutiva, resaltando la importancia de estas proteínas en los procesos biológicos de este microorganismo (Zarzycki-Siek et al., 2013).

2.2.-Proteínas FadD en la virulencia de *P. aeruginosa*

En 2021, Martínez-Alcantar y colaboradores investigaron el papel de las acil-CoA sintetasas en la virulencia de *P. aeruginosa* mediante mutaciones simples y dobles en las proteínas FadD, encontrando que las proteínas FadD1, FadD2 y FadD4 están involucradas en la producción de distintos factores de virulencia como pirocianina, biopelícula, ramnolípidos y LPS. Además, encontraron que la ausencia de la proteína FadD4 modifica la estructura y composición del lípido A del LPS. En este estudio, se logró proponer un mecanismo mediante el cual la proteína FadD4, a través de la degradación de AG, permitía la obtención de precursores lipídicos necesarios para la producción de ciertos factores de virulencia como biopelícula, ramnolípidos, polihidroxicanoatos y LPS, además de que, a través de acilación y desacilación podía modificar la composición del lípido A presente en el LPS (Figura 7).

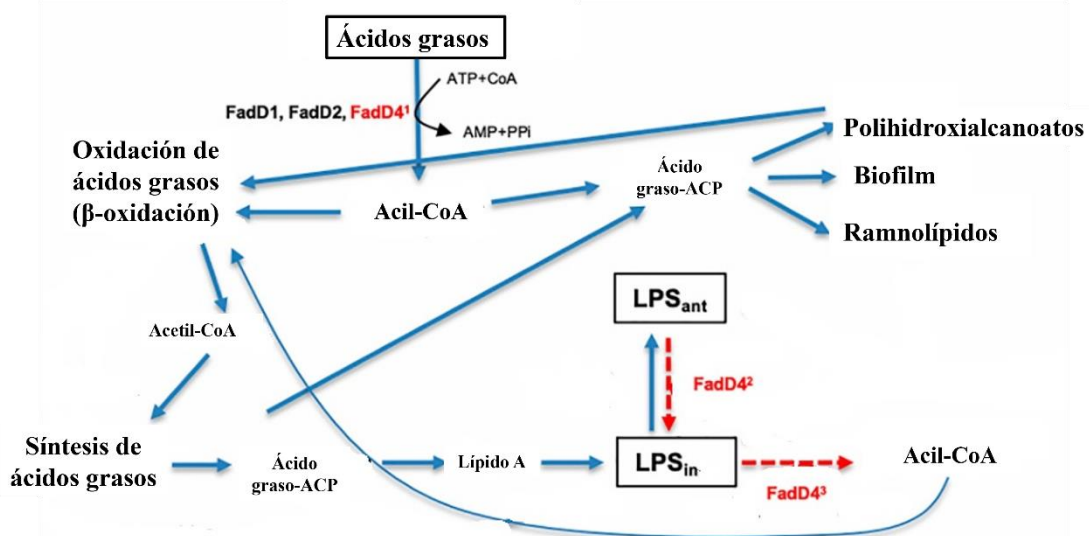


Figura 7. Mecanismo de acción de la proteína FadD4. La proteína FadD4, una acil-CoA sintetasa participa degradación de ácidos grasos, permitiendo la obtención de precursores lipídicos necesarios para la síntesis de polihidroxicanoatos, biopelícula, ramnolípidos y lipopolisacáridos. Además, modifica la composición del lipopolisacárido a través de la acilación y desacilación del lípido A. Modificado de Martínez-Alcantar et al., 2021.

2.3.-Contexto genómico de la proteína FadD4 de *P. aeruginosa*

El estudio del contexto genómico del gen *fadD4* (ORF PA1617) reveló que este se encuentra dentro de un operón putativo que podría estar implicado en el metabolismo de ácidos grasos, constituido por los ORFs PA1617 al PA1623. Las funciones putativas de estos ORFs son las siguientes:

- PA1618: una tioéster hidrolasa que podría participar en el metabolismo de AG a través de la hidrólisis de tioésteres.
- PA1619, un regulador transcripcional similar a los de la familia AraC.
- PA1620, un translocador de membrana.
- PA1621 y PA1622, hidrolasas pertenecientes a la familia de las α/β -hidrolasas, similares a Pimeloil-ACP metil éster carboxilesterasas.
- PA1623, una proteína homóloga a la tiorredoxina.

2.4.- ORF PA1622

El ORF PA1622 es un gen de 861 pb, que codifica para una proteína de 276 aminoácidos, cuya localización subcelular ha sido predicha como citoplasmática. Con base en análisis bioinformáticos, esta proteína presentaría una estructura homotetramérica (

Figura 8). Este gen se encuentra ampliamente distribuido en el género *Pseudomonas* y posee similitud con α/β -hidrolasas que participan en el metabolismo de lípidos como las lipasas y las pimeloil-ACP metil éster carboxilesterasas (NCBI, 2020; *Pseudomonas* Genome Database, 2023).

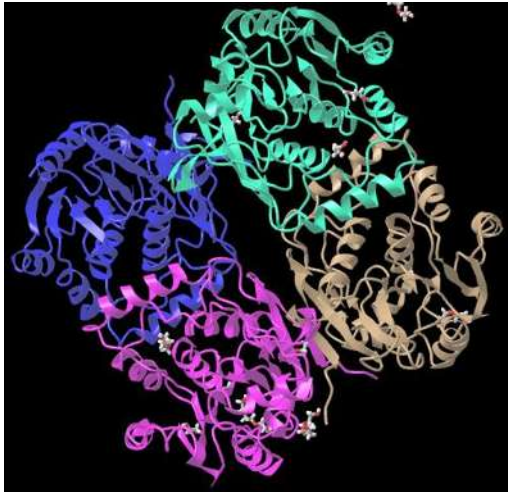


Figura 8. Estructura cristalina de la proteína codificada por el ORF PA1622. ID:7AL6. National Center for Biotechnology Information, 2020, 10 05.

Estudios genómicos sugieren que PA1622 es un gen esencial, altamente conservado en distintas cepas de *P. aeruginosa* y otras especies del género *Pseudomonas*. Además, está presente en cepas resistentes a antibióticos y es considerado como un gen candidato para la identificación o diseño de nuevos agentes antibacterianos (Bruce et al., 2009). En 2014, Cabot y colaboradores observaron que el gen PA1622 sufría mutaciones después de la exposición durante siete días a ceftolozano-tazobactam (Cabot et al., 2014). En 2022, Ranjani y colaboradores infectaron células de cardiomiocitos de rata con diversas mutantes de *P. aeruginosa*, seguido de la administración de antibióticos, con la finalidad de identificar genes esenciales para la supervivencia e infección bajo la presión antibiótica. En este estudio, PA1622 se encontró dentro de los genes condicionalmente esenciales para la protección contra dichos compuestos (Ranjani et al., 2022).

2.5.-Enzimas hidrolíticas de *P. aeruginosa*

Las enzimas hidrolíticas o bien, hidrolasas, son enzimas que actúan sobre una variedad de sustratos catalizando la ruptura de sus enlaces mediante la adición de una molécula de agua, según la ECN (Enzyme Commission Number) estas se pueden clasificar en 13 subgrupos de acuerdo al enlace químico que rompen (IUBMB, 2024). Dentro de este tipo de enzimas, encontramos a las α/β -hidrolasas, las cuales poseen una estructura canónica (Figura 9) que consta de ocho láminas β rodeadas de hélices α y una triada catalítica conservada que está conformada por un aminoácido ácido una histidina y un aminoácido nucleófilo (serina, cisteína o ácido aspártico) (Nardini & Dijkstra, 1999). Este tipo de plegamiento α/β se puede encontrar en los tres reinos de la vida, además, es el más común, más versátil y más distribuido en la naturaleza.

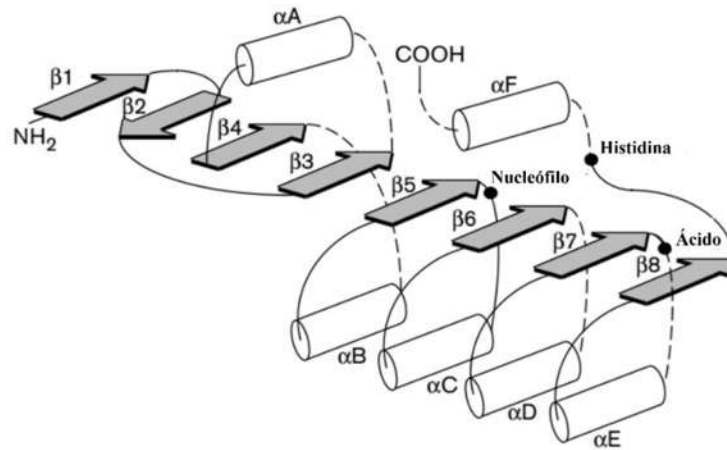


Figura 9. Estructura canónica del plegamiento α - β . Estructura secundaria del plegamiento α - β . Se muestran las ocho láminas β , representadas con flechas en color gris, rodeadas de hélices α , representadas por los cilindros blancos. La localización de la triada catalítica está representada por puntos negros. Fuente: (Nardini y Dijkstra, 1999)

Las α/β -hidrolasas son esenciales en el metabolismo de diversos organismos ya que participan dentro de una gran cantidad de rutas metabólicas, incluyendo la degradación de las pentosas fosfato y fosfogliceroles, en la biosíntesis de ácidos grasos, eicosanoides, triacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol, en el metabolismo de fosfatidilcolinas, entre otros (Rodwell et al., 2016). Además, se han asociado ampliamente con la virulencia de microorganismos patógenos.

Dentro de *P. aeruginosa* podemos encontrar múltiples enzimas hidrolíticas que poseen el plegamiento tipo α/β , entre las cuales, las más conocidas por ser factores de virulencia son las proteasas, elastasas y lipasas, sin embargo, no existe una agrupación entre ellas por su capacidad hidrolítica. Actualmente se conocen más hidrolasas que no son catalogadas como factores de virulencia, pero se sabe acerca de su contribución hacia las infecciones causadas por *P. aeruginosa*, tal es el caso de la amidasa AmpDh3, que es una enzima hidrolítica de peptidoglicano que participa en la formación de vesículas de membrana reciclando la pared celular, a su vez protegiendo al peptidoglicano y por ende manteniendo la estructura celular, esto es indispensable para que la bacteria pueda colonizar y tener influencia sobre la célula huésped (Firdich y Gaynor, 2013; Chen et al., 2022). Otro ejemplo es la epóxido hidrolasa nombrada Cif, esta enzima impide el aclaramiento pulmonar en los individuos con FQ, lo cual se traduce en la prevalencia de la infección por *P. aeruginosa* y en el mismo sentido se relaciona con la reducción de la función pulmonar (Hvorecny et al., 2018). Las glucósido hidrolasas PslG y PelA contribuyen a las propiedades biomecánicas de la biopelícula y son responsables de facilitar la dispersión y la formación de este (Razvi et al., 2023). También se ha

encontrado que la enzima PqsE posee una triada catalítica característica de las hidrolasas, esta enzima es fundamental en la regulación del quorum sensing y es necesaria para la producción de fenacinas extracelulares, incluyendo a la piocianina (Folch et al., 2013).

No todas las hidrolasas descritas anteriormente están catalogadas como factor de virulencia, pero algunas de ellas cumplen con los criterios para ser considerados como tal o poseen una acción indirecta para la producción de dichos factores, así como en la evasión del sistema inmunológico.

3.-JUSTIFICACIÓN

P. aeruginosa es una bacteria patógena que causa infecciones graves, de alta mortalidad y rápida evolución, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Esta bacteria goza de una creciente resistencia a una amplia gama de antibióticos y cuenta con un vasto arsenal de factores de virulencia. Estas características la convierten en un microorganismo de relevancia en salud pública mundial, y candidato para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. En este contexto, el ORF PA1622 ha sido identificado como codificante de una posible α/β -hidrolasa, cuya función es desconocida hasta el momento. Este ORF se encuentra en un operón junto a genes que probablemente están involucrados en la biosíntesis y modificación del lipopolisacárido, lo que sugiere una posible relación con mecanismos de virulencia. Este hecho deja abierto un gran campo de investigación para la elucidación de la participación de este ORF en la virulencia de *P. aeruginosa*.

4.-HIPÓTESIS

El ORF PA1622 participa en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

5.-OBJETIVOS

5.1.-Objetivo particular:

Determinar la participación del ORF PA1622 en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

5.2.-Objetivos específicos:

1. Evaluar la contribución del ORF PA1622 en la virulencia en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *in vitro*.
2. Determinar el papel del ORF PA1622 en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en un modelo *in vivo*.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.-Medios de cultivo

6.1.1.-Medio Luria-Bertani (LB)

Medio estándar de laboratorio. Medio rico en nutrientes utilizado para cultivo bacteriano.

Tabla 2. Preparación del medio LB

REACTIVO	CANTIDAD
Peptona de caseína	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	0.5 g
H ₂ O destilada	c.b.p. 100 mL
Para medio sólido, agar	1.5 g

6.1.2.-Medio Nematode Growth Medium (NGM):

Medio estándar empleado para el crecimiento de *C. elegans*

Tabla 3. Preparación del medio NGM.

REACTIVO	CANTIDAD
Peptona de caseína	0.4 g
NaCl	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.05 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Agar	2 g
H ₂ O destilada	c.b.p. 100 mL
Colesterol 5 mg/mL	0.1 mL
Sm 200 mg/mL	0.025 mL

NOTAS: 1.- Se preparó el medio sin colesterol ni Sm y una vez esterilizado y atemperado, se le añadieron y rápidamente se vació en cajas Petri. 2.- La estreptomycin (concentración final 50 mg/mL) es utilizada para seleccionar a la cepa OP50 de *E. coli* que se empleará como alimento para los nemátodos. 3.- El colesterol se disolvió en etanol puro y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

- Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 15 lb se presión a 125 °C por 15 min.

6.2.-Condiciones de crecimiento de las cepas

Todas las cepas se sembraron en medio LB líquido o sólido suplementado con antibióticos acorde a requerimientos específicos. Los cultivos en medios líquidos se incubaron a 37 °C por 24 h en agitación. Los cultivos en medios sólidos se incubaron a 37 °C por 24 h y posteriormente se mantuvieron a 4 °C para la preservación de los mismos.

6.3.-Material biológico

Tabla 4. Microorganismos utilizados.

ORGANISMO	CEPA	GENERALIDADES	USO	REFERENCIA
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	Cepa estándar de laboratorio, Sm ^R , Gm ^S .	Cepa control	(Stover et al., 2000)
	PA1622:: <i>Gm</i>	Cepa estándar PAO1 mutada mediante interrupción génica con un casete de resistencia a gentamicina (::Gm ^R) en el ORF PA1622	Cepa mutada para evaluar la participación de PA1622 en la virulencia	
<i>E. coli</i>	JM101	Cepa estándar de laboratorio que contiene al plásmido pGem con el ORF PA1622:: <i>Gm</i> ; Ap ^R ; Gm ^R	Cepa donadora de PA1622:: <i>Gm</i> para la transformación	(Yanisch-Perron et al., 1985)
	OP50	Sm ^R	Cepa empleada como alimento para <i>C. elegans</i>	(Brenner, 1973)
	pSBL1075	Cepa que contiene la fusión transcripcional <i>plasRlasIRhll:lucCDA</i> BE, y produce bioluminiscencia en	Cepa reportera empleada para ensayos de bioluminiscencia	(Winson et al., 1998)

		respuesta a 3-oxo-C12-HSL		
<i>C. elegans</i>	Bristol N2	Cepa estándar de laboratorio, aislada de materia en descomposición.	Cepa empleada en ensayos de virulencia <i>in vivo</i>	(Brenner, 1973)

Gm^R= resistencia a gentamicina; Sm^R= resistencia a estreptomycinina; Gm^S= sensible a gentamicina; Ap^R= resistencia a ampicilina

6.4.- Reactivos

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la PCR para la verificación de las mutaciones.

GEN	SECUENCIA	TAMAÑO (pb)	TM
PA1622	FW 5' AGGATCCCATGAGCCTGCA 3'	19	56°C
	RV 5' CAAGCTTGCGCGGAAGAA 3'	19	56°C
aacC1	FW 5'ACGCGTATCAAAGTGCATCACTTCTTC 3'	27	56°C
	RV 5'ACGCGTCAATTCTCGAATTGACATAAGC 3'	28	56°C

FW= forward; RV= reverse; TM =temperatura de melting.

Tabla 6. Enzimas utilizadas en la verificación de las mutaciones.

REACTIVO	CARACTERÍSTICAS
Enzima de restricción <i>EcoRI</i>	Enzima que cataliza la ruptura del ADN; secuencia de reconocimiento para restricción: G/AATTC
<i>Taq</i> DNA Polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis del ADN en una PCR

Tabla 7. Antibióticos de selección para las distintas cepas.

ANTIBIÓTICO	USO
Estreptomycinina (Sm)	Antibiótico utilizado para la selección de la cepa PAO1 y OP50 (200 mg/mL)
Gentamicina (Gm)	Antibiótico utilizado como marcador de selección de las mutantes PAO1 PA1622::Gm (100 mg/mL) y para la selección de la cepa JM101 pGem-PA1622::Gm (30 mg/mL)

Ampicilina (Ap)	Antibiótico utilizado para la selección de la cepa JM101 pGem-PA1622::Gm y la cepa PSBL1075 (100 mg/mL)
-----------------	---

Tabla 8: Preparación de buffer PBS.

REACTIVO	CANTIDAD
NaCl	0.8 g
KCl	0.02 g
Na ₂ HPO ₄	0.144 g
KH ₂ PO ₄	0.0145 g
H ₂ O	c.b.p. 100 mL

6.5.-Extracción de ADN

6.5.1.-Extracción de ADN total

Se cultivó la cepa pGem-PA1622::Gm en 3mL de LB con Ap [100 mg/mL] y Gm [30 mg/mL]. Se tomaron 500 µL del cultivo y se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 min. Se resuspendió la pastilla en 100 µL en buffer de lisis y se dejó incubar en baño maría a 70°C por 10 min. Se añadieron 300 µL de etanol puro y se agitó vigorosamente por 20 s para después incubar a -20 °C por 10 min. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 12,000 rpm y se lavó pastilla con 500 µL de etanol al 70% mediante agitación vigorosa. Posteriormente, se retiró todo el etanol con pipeta y se incubó a 37 °C por 7 min. Finalmente se disolvió la pastilla en 100 µL de agua, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se obtuvo el sobrenadante, el cual contiene el ADN. Se almaceno a -25 °C hasta su uso.

Tabla 9. Preparación de solución de lisis ADN total.

REACTIVO	CANTIDAD
H ₂ O destilada libre de nucleasas	0.8 mL
Acetato de sodio 2 M	0.1 mL
SDS 10%	0.1 mL

NOTA: Esta solución se preparó al momento, solo en cantidad necesaria y no fue usada para extracciones posteriores

6.5.2.-Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina:

Se cultivó la cepa pGem-PA1622::Gm en 3mL de LB con Ap [100 mg/mL] y Gm [30 mg/mL]. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1min y se resuspendió la pastilla en 150 µL de STE agitando vigorosamente. Posteriormente se añadieron 150 µL de acetato de sodio

3 M, se agitó vigorosamente por 15 s y se incubó nuevamente en hielo 10 min. Luego se centrifugó a 12,000 rpm/10 min, el sobrenadante se pasó a un nuevo microtubo cuidando de no tocar la pastilla para después añadirle 150 µL de fenol-cloroformo [1:1] y agitar vigorosamente 15 s. Enseguida se centrifugó a 12,000 por 5 min y la fase superior (orgánica) se transfirió a un nuevo tubo con ayuda de una micropipeta evitando succionar la fase blanquecina intermedia (dejar un poco de fase superior en el tubo para no tocar la fase intermedia y así evitar impurezas en el ADN), después se añadió 1 mL de etanol puro frío y se incubó a -25 °C por 20 min (la precipitación del ADN mejora aumentando el tiempo de congelación). Pasada la incubación, se centrifugó a 12,000 rpm/5 min y se decantó el sobrenadante. A continuación, se realizaron 3 lavados de la siguiente manera; se añadió 1 mL de etanol al 70 %, se agitó vigorosamente hasta desprender la pastilla del fondo del tubo, se centrifugó 12,000 rpm/5min y se decantó el sobrenadante. En el último lavado se centrifugó por 5 s, se retiró la mayor cantidad posible de etanol sin tocar la pastilla y se llevó a evaporar el etanol restante a 37 °C por 7 min. Por último, se añadieron 100 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de RNAsa, se agitó suavemente y se dejó actuar a la enzima a temperatura ambiente por al menos 7min. Mantener a -25 °C hasta su uso.

Tabla 10. Preparación de solución de lisis para extracción de ADN plasmídico.

REACTIVO	CANTIDAD
H ₂ O destilada libre de nucleasas	0.8 mL
NaOH 2M	0.1 mL
SDS 10%	0.1 mL

NOTA: Esta solución se preparó al momento, solo en cantidad necesaria y no fue usada para extracciones posteriores

Tabla 11. Soluciones para extracción de ADN plasmídico, para 100 mL:

REACTIVO	COMPOSICIÓN
SDS 10%	10 g de SDS
NaOH 2N	7.98 g NaOH
C ₂ H ₃ NaO ₂ 3M	12.3 g C ₂ H ₃ NaO ₂ Ajustar pH a 4.8 con ácido acético
STE	1.7115 g sacarosa (50 mM)

	0.3028 g trizma (25 mM) 0.2922 g EDTA (10 mM) Ajustar pH a 8 con NaOH 0.1 N
Etanol 70%	70 mL etanol
Fenol-cloroformo	50 mL fenol 50 mL cloroformo

NOTAS: 1.-Las soluciones se prepararon con agua destilada y se esterilizaron para eliminar posibles nucleasas.

6.6.-Electroforesis:

En un papel Parafilm se colocó buffer de carga 6x para alcanzar una concentración final del 20%, al cual se añadieron 300 ng un marcador de tamaño molecular (λ -PstI o 1kb DNA leader), junto con las muestras según la concentración requerida (100 ng para PCR; 500 ng para restricción). Posteriormente, las mezclas se cargaron en un gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 0.8x en una cámara de electroforesis. Las muestras se sometieron a electroforesis a 130 V por 30 min. Finalmente, el gel fue teñido por inmersión en una solución de bromuro de etidio acuoso al 0.05% y revelado en un transiluminador con emisión de luz UV.

Tabla 12. Preparación de buffer de carga 6x para ADN.

REACTIVO	CANTIDAD
Glicerol	1.5 mL
Azul de bromofenol	0.0125 g
Xilenol cianol FF	0.0125 g
H ₂ O destilada libre de nucleasas	c.b.p. 5 mL

6.6.1.-Gel de agarosa al 1% para electroforesis de ADN:

Se añadió 1g de agarosa en 100 mL de TAE 0.8x, el cual se preparó a partir de TAE 10x y agua. Después de añadir la agarosa se calentó la solución hasta disolver (aproximadamente 1 min en microondas), finalmente se vació en un molde y se dejó solidificar.

Tabla 13. Preparación de TAE 10x.

REACTIVO	CANTIDAD
Tris base	4.84 g
CH ₃ COOH	1.5 mL
EDTA acuoso 0.5 M pH= 8	2 mL
H ₂ O destilada libre de nucleasas	c.b.p. 100 mL

6.7.-Obtención de las mutantes:

Dentro del laboratorio se contaba con una construcción en el vector pGem (Figura 10), dentro de la cepa JM101 de *E. coli*, el cual contenía al ORF PA1622 interrumpido con un casete de resistencia a Gm (PA1622::Gm).

En primera instancia se verificó la construcción mediante PCR y análisis de restricción (como se describe a continuación) y posteriormente, células competentes de *P. aeruginosa* se transformaron por medio de electroporación con dicha construcción, para así obtener las mutantes.

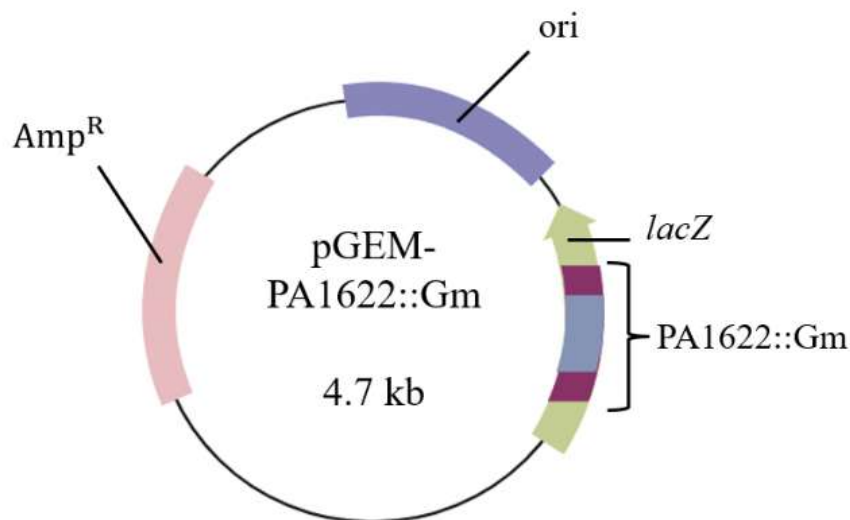


Figura 10. Mapa esquemático del plásmido recombinante pGem que contenía al ORF PA1622 interrumpido con un casete de resistencia a gentamicina. Se muestran el origen de replicación (ori), el sitio de inserción del ORF PA1622::Gm en el gen lacZ y el gen Amp^R.

6.7.1.-Verificación de la construcción en pGem:

Se realizó una PCR usando ADN total para verificar que el ORF PA1622 interrumpido con el casete de resistencia a gentamicina (PA1622::Gm) estuviera presente en pGem, empleando las siguientes condiciones:

Tabla 14. Master Mix para PCR.

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer mx 10x	1 μ L
dNTPs	0.2 μ L
MgCl ₂	0.1 μ L
Oligonucleótidos [10 pmol]	Oligonucleótido FW 0.6 μ L Oligonucleótido RV 0.6 μ L
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0.1 μ L
H ₂ O destilada libre de nucleasas	6.85 μ L
DNA molde	100 ng

Tabla 15. Condiciones de reacción para PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 °C	1 min	1
	94 °C	10 s	34
Alineación	56 °C	35 s	
Extensión	68 °C	2 min	
	72 °C	5 min	1
	4 °C	∞	

Posteriormente se realizó una restricción total del ADN plasmídico de pGem-PA1622::Gm con la enzima *Eco*RI empleando las siguientes condiciones de restricción:

Tabla 16. Restricción total de pGem-PA1622::Gm

REACTIVO	CANTIDAD
ADN plasmídico	500 ng
Buffer H	2.5 μ L
<i>Eco</i> RI	0.1 μ L
H ₂ O destilada libre de nucleasas	17.4 μ L
Incubación 37°C / 24 h	

6.7.2.-Obtención de células competentes para transformación:

Se cultivó la cepa PAO1 en 3 mL de LB con Sm [200 mg/mL]. Se distribuyó el cultivo en 2 microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 12,000 rpm 1 min. Posteriormente se realizaron 2 lavados añadiendo 1 mL de sacarosa 300 mM a la pastilla formada, la cual

se disolvió suavemente con una micropipeta de 1 mL y se centrifugó a 12,000 rpm 1 min. Una vez realizados los lavados se resuspendió la pastilla en 100 µL de sacarosa 300 mM.

NOTAS: 1.-Las células dese utilizaron inmediatamente después de su preparación y nunca se almacenaron para usos posteriores. 2.- *P. aeruginosa* PAO1 tiende a formar biopelícula al cultivarse en tubo, por lo tanto, al añadir sacarosa en el primer lavado y antes de disolver, se retiró la mayor cantidad de biopelícula posible con ayuda de una micropipeta.

6.7.3.-Transformación:

A las células competentes recién preparadas se les añadieron 500 ng de ADN plasmídico, se electroporaron a 2.5 kV, se les añadió 1 mL de LB y se incubaron en rotación a 37 °C por 2 h. Pasado este tiempo, cada vial completo se vació en una placa de LB Gm [50 mg/mL], se distribuyó uniformemente usando perlas de cristal, se dejó secar completamente y se incubó a 37 °C por 24 h. Al día siguiente, las colonias se picaron con palillos de madera estériles y se sembraron en placas de LB Sm [200 mg/mL], Gm [100 mg/mL].

6.7.4.-Verificación de la mutación:

Se realizó una extracción de ADN total de cada colonia obtenida y posteriormente una PCR empleando las condiciones antes descritas. Además, se realizaron otras PCRs para la verificación, empleando los oligonucleótidos FW aacC1 y RV aacC1. Posteriormente se realizó una restricción total de la PCR con la enzima *EcoRI*.

Tabla 17. Restricción total de PAO1-PA1622::Gm

REACTIVO	CANTIDAD
PCR	350 ng
Buffer H	2.5 µL
<i>EcoRI</i>	0.1 µL
H ₂ O destilada libre de nucleasas	15 µL
Incubación 37°C / 24 h	

6.8.-Curvas de crecimiento:

Se cultivaron las cepas en 3 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL], posteriormente, dichos cultivos se utilizaron para sembrar matraces con 20 mL de LB para una densidad óptica (D.O) igual a 0.05. Una vez inoculados, se determinó el

crecimiento mediante la medición de la D.O. por espectrofotometría cada 1 h hasta las 12 h y posteriormente, cada 2 h hasta las 24 h (Alpers et al., 2023).

6.9.-Cuantificación de acil-homoserina lactona (OdDHL)

Se cultivaron las cepas en 3 mL de medio LB y la cepa pSBL1075 en 3 mL de LB. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante. Mientras tanto el cultivo de pSBL1075 se ajustó a una D.O. de 0.1 y se colocaron 150 μ L de este cultivo en pacas de 96 pocillos estériles. Posteriormente, se añadieron 50 μ L del sobrenadante obtenido de las mutantes o 50 μ L LB (control) y se dejó en incubación a 37 °C por 4 h (González et al., 2017). Después, se leyó la placa en un transiluminador. Finalmente, la cuantificación se realizó empleando el software ImageLab de ChemiDoc.

6.10.- Determinación de los factores de virulencia

6.10.1.-Proteasas:

Se cultivaron las cepas en 20 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL]. En seguida, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante, del cual se tomaron 100 μ L. Posteriormente, se añadieron 900 μ L de solución acuosa de leche descremada al 1%. Se incubaron las muestras por 15 min a 37 °C y, finalmente, se midió su densidad óptica a 595 nm (Saleh et al., 2019).

6.10.2-Elastasa:

Se cultivaron las cepas en 20 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL]. En seguida, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante. Se colocaron 250 μ L de sobrenadante en un microtubo y se añadieron 1 mL de buffer A y 0.002 g de rojo Congo. Los tubos se incubaron en agitación a 30 °C por 12 h. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se midió el sobrenadante a 495 nm (Filloux y Ramos, 2014). Como blanco, se utilizó una muestra idéntica, pero que contenía 250 μ L de medio LB en lugar de sobrenadante. Para la medición, fue necesario diluir las muestras con agua en una proporción 1:5.

NOTA: Para reducir la variación, se preparó una mezcla de buffer A y de rojo Congo con la cantidad necesaria para toda la batería de muestras. Posteriormente, se añadió a cada tubo la cantidad indicada.

Tabla 18: Preparación del buffer A

REACTIVO	CANTIDAD
CaCl ₂	0.01109 g
Tris-HCl	1.576 g
H ₂ O destilada libre de nucleasas	cbp 100 mL
pH= 7.0	

6.10.3- Movilidad:

Para el ensayo de swimming, se preparó un medio LB con agar al 0.3 %. Para el ensayo de swarming, se preparó un medio LB modificado con las siguientes proporciones: agar al 0.5 %, peptona de caseína al 0.5 % y extracto de levadura al 2 %. Una vez esterilizados, los medios se vertieron en cajas Petri y se dejaron secar por 1 h en campana, sin mover, para su uso inmediato. Por otra parte, las cepas se cultivaron en 3 mL de medio LB durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, los cultivos se ajustaron a una D.O. de 0.1 y se tomaron 3 µL para inocular los medios. La inoculación para swimming se realizó insertando la punta de la pipeta de forma vertical hasta el fondo del medio; mientras se sacaba la punta del medio, se iba depositando el cultivo. La inoculación para swarming se realizó depositando el cultivo directamente sobre la superficie del medio. Después de la inoculación, las cajas se dejaron secar por 30 min más y luego se incubaron a 37 °C por hasta 48 h. Finalmente, se midió el crecimiento radial cada en mm cada 24 h empleando una regla.

6.10.4.-Pioverdina:

Se cultivaron las cepas en 20 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL]. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante, del cual se colocaron 150 µL en pacas de 96 pocillos estériles, usando como control 150 µL LB. Inmediatamente se leyó a una longitud de emisión de 460 nm y una longitud de excitación de 405 nm (Hofte et al., 1993).

6.10.5-Piocianina:

Las cepas se cultivaron en 20 mL de medio LB durante 24 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante. Se colocaron 3 mL de sobrenadante y 1.8 mL de cloroformo en un tubo y se agitaron durante 30 min. En seguida, las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm por 10

min y se retiró completamente la fase superior. Después, se añadieron 600 μ L de HCL 0.2 N y se agitó nuevamente por 30 min. Finalmente, se tomó la fase superior, que toma una coloración rosa, y se midió su densidad óptica a 520 nm en celdas de cuarzo (González et al., 2017).

6.10.6.-Exopolisacáridos:

Se cultivaron las cepas en 20 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL]. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 10,000 rpm por 10 min. Se colocó 1 mL sobrenadante en un tubo, se le añadieron 3 mL de etanol puro frío y se incubaron a 4 °C por 24 h. Después, se centrifugaron nuevamente a 10,000 rpm por 15 min, se retiró el sobrenadante y los exopolisacáridos precipitados se disolvieron en 500 μ L de agua destilada estéril. A continuación, se añadieron 500 μ L de fenol acuoso al 5% y 2.5 mL de H₂SO₄, y se midió su absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Mishra et al., 2020).

NOTA: Al añadir H₂SO₄ se produce una reacción exotérmica; por ello, debe ser añadido gota a gota y esperar a que se enfríe para realizar la lectura usando celdas de vidrio o de cuarzo.

6.10.7.-Alginato:

Se cultivaron las cepas en 20 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL]. Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se tomaron 70 μ L de sobrenadante y se le añadieron 600 μ L de ácido bórico-ácido sulfúrico (4:1). Después, se agitaron vigorosamente en baño de hielo por 10 s. Posteriormente, se añadieron 20 μ L de solución de carbazol y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Finalmente, se incubaron a 55 °C por 30 min y se midió su absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro (Mishra et al., 2020).

6.10.8.-Lipopolisacáridos:

Para la extracción de los lipopolisacáridos, se cultivaron en las cepas en 20 mL de medio LB durante 24 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min en tubos falcon pesados para obtener la biomasa, la cual se dejó secar por 4-5 días a 37 °C. Una vez seca, la biomasa se homogeneizó con etanol al 95 % empleando una pipeta, se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min y se retiró el alcohol por decantación. Este proceso se repitió 3 veces. Posteriormente, se dejó evaporar el etanol restante toda la noche a 37 °C. Después, se registró el peso seco de la pastilla, la cual se

disolvió en 1 mL de EDTA al 10% y se sonicó por 30 s a intensidad media. En seguida, se añadió 1 mL de metanol-cloroformo 1:2 y se agitó por 2 h. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 2,000 rpm por 10 min, se recuperaron las 2 fases orgánicas y se dejaron evaporar completamente a temperatura ambiente (Martínez-Alcantar et al., 2021). Para la cuantificación, la pastilla obtenida se hidrató en 1 mL de EDTA 50 mM por 24 h y se disolvió empleando una pipeta y sonicando por 20 s. Finalmente, se realizó una curva de calibración (490 nm) como la que se describe en la tabla 17.

Tabla 19: Curva de calibración de disacáridos para cuantificación de lipopolisacáridos

	Mezcla de disacáridos	EDTA 50 mM	Fenol 5 %	H₂SO₄
Blanco	0 µL	200 µL	100 µL	500 µL
n₁..... n_n	5 µL.....95 µL			
LPS	100 µL			

LPS = Lipopolisacáridos. Mezcla de disacáridos: solución acuosa 1:1 de fructosa y dextrosa a una concentración final de 1 mg/mL.

NOTA: Es necesario ajustar el pH del EDTA con NaOH a 7.8 para lograr la completa disolución.

6.10.9.-Ramnolípidos:

Se cultivaron las cepas en 20 mL de medio LB Sm [200 mg/mL] y Gm [100 mg/mL]. Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min; 1 mL de sobrenadante se recuperó en un microtubo y se acidificó añadiendo HCl 6 N (aproximadamente 100 - 120 µL) a un pH final de 2.3 y se dejó incubar por a 4 °C por 72 h. Después, se tomaron 500 µL de sobrenadante acidificado y se le añadieron 500 µL de acetato de etilo, se agitaron vigorosamente por 20 s y se centrifugaron a 5,000 rpm por 1 min. Posteriormente, se recuperaron 400 µL de la fase superior en un nuevo tubo. Se repitió la extracción de ramnolípidos dos veces más, recuperando 400 µL y 500 µL, respectivamente, en el mismo tubo. Finalmente, se dejó evaporar a temperatura ambiente por 24 h.

Para la cuantificación, los ramnolípidos se disolvieron en 1 mL de cloroformo y 100 µL de solución de azul de metileno, se mezclaron vigorosamente por 5 min y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Se recuperó la fase inferior en un nuevo microtubo nuevo, se añadieron 125 µL de HCl 0.2 N y se mezcló vigorosamente por 20 s, se centrifugó a 5,000 rpm 10 min y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Finalmente, se tomaron 100 μ L de la fase superior y se transfirieron una placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 638 nm usando como blanco HCl 0.2 N (Çakmak et al., 2017).

6.10.10.-Biopelícula

Las cepas se cultivaron en 3 mL de medio LB. Los cultivos se ajustaron a una D.O. de 0.1 y se incubaron en tubos de vidrio a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el cultivo se descartó rápidamente y la biopelícula se secó durante 48 h. A continuación, se tiñó con 5 mL de cristal violeta acuoso al 0.1 % y se eliminó el exceso por decantación rápida. Finalmente, la biopelícula teñida se disolvió con ácido acético acuoso al 30% y se midió su absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro (Coffey y Anderson, 2014).

6.11.-Componentes del de la biopelícula

Las cepas se cultivaron en tubos de ensayo con 3 mL de medio LB en rotación a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, el cultivo se decantó rápidamente, se añadió 1 mL de buffer PBS estéril y se agitó vigorosamente en vortex para disolver la biopelícula remanente. A continuación, la biopelícula disuelta se transfirió a tubos de 5 mL y se mantuvo en baño de hielo por 10 min. Finalmente, se sonicó durante 10 s al máximo porcentaje de amplitud, manteniéndolo en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de las muestras (W. Chen et al., 2016).

Para la cuantificación se empleó el método de Bradford. Para determinar los demás componentes de la biopelícula (ADN, exopolisacáridos, ramnolípidos y alginato) se emplearon los métodos descritos anteriormente (Ver 6.5.1, 6.10.6, 6.10.7 y 6.10.9).

6.12.-Evaluación de la virulencia en *Caenorhabditis elegans*

6.12.1.-Mantenimiento de *C. elegans*:

La cepa OP50 de *E. coli* se cultivó en 3 mL de medio LB Sm [50 mg/mL] y se incubó a 30 °C, en agitación durante 48 h. Posteriormente, se inocularon 160 μ L de OP50 en placas con medio NGM y se incubaron a 30 °C por 24 h para posteriormente hacer un “pase de nemátodos”, el cual consiste en cortar cuadros de aproximadamente 1 cm² de un cultivo de nemátodos previo y colocar boca abajo sobre el medio NGM con OP50. Los nemátodos fueron preservados a 18 °C para ralentizar su ciclo de vida y los pases de nemátodos se realizaron cada 3 semanas con la finalidad de preservar la cepa (Stiernagle, 2006).

6.12.2.-Sincronización de *C. elegans*:

Posterior al pase de nemátodos, los cultivos se monitorearon hasta observar una cantidad suficientemente grande de huevecillos (de 3 a 7 días después), a estas cajas se les añadieron 3.5 mL de agua destilada, se agitaron suavemente en círculos para resuspender a los nemátodos y sus huevecillos, posteriormente, la suspensión se transfirió a un tubo de 15 mL con tapa. Inmediatamente se añadieron 1 mL de cloro acuoso al 2% y 0.5 mL de NaOH 3 N y se dejaron reposar por 5 min, agitando suavemente por inversión cada 2 min. Posteriormente se repartió el volumen en 3 microtubos, se centrifugaron a 1,300 rpm por 30 s y se retiró el sobrenadante cuidadosamente sin tocar la pastilla de huevecillos; en los casos en que no fue visible la separación, se dejaron aproximadamente 50 µL de líquido. A continuación, se añadió 1 mL de agua destilada, se agitaron los tubos suavemente con el dedo, se centrifugó a 1,300 rpm por 15 s y se retiró nuevamente el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 150 µL de agua destilada, se agitó suavemente, se vació a una placa con NGM y OP50 y se incubaron a 18 °C monitoreando diariamente hasta que los nemátodos alcanzaran la etapa adulta (Stiernagle, 2006).

6.12.3.-Ensayos de virulencia *in vivo*:

Una vez que los nemátodos alcanzaron la etapa adulta (de 4 a 6 días después de la sincronización) se lavó nuevamente la caja con 1 mL de agua destilada, se centrifugó a 1,300 rpm por 10 s, se retiró el sobrenadante y los nemátodos se resuspendieron en 1.5 mL de agua destilada. A continuación, se colocaron 10 µL de la suspensión de nemátodos en un pocillo con 500 µL de agua destilada de una placa de 24 pozos y se contó el número de nemátodos presentes para posteriormente hacer diluciones y obtener aproximadamente 20 nemátodos por cada 10 µL. Luego se colocaron 10 µL de nemátodos en una placa de 24 pozos con 500 µL de agua destilada en cada pocillo a utilizar y se contaron. Por otra parte, las cepas a probar se cultivaron en 3 mL LB y posteriormente se ajustó la D.O. del cultivo a 0.02. Una vez colocados los 20 nemátodos en cada pocillo se añadieron 500 µL de medio ajustado para una D.O. final de 0.01 y se contaron durante 48 h cada 6 y 12 h; un nemátodo se considera muerto cuando deje de moverse y no responda al estímulo táctil (Díaz-Pérez et al., 2022).

6.13.- Evaluación de la resistencia a antibióticos

Las cepas se cultivaron tubos de ensayo con 3 mL de medio LB en rotación a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, el cultivo se ajustó a una D.O. de 0.01 y se colocó en placas de 24 pozos que contenían distintas concentraciones de los antibióticos a probar.

Luego de 24 h, se midió la D.O del cultivo utilizando un espectrofotómetro. Posteriormente, empleando los valores de crecimiento, se calculó concentración la inhibitoria media (IC50) de cada cepa para cada antibiótico.

7.-RESULTADOS

7.1.-Análisis bioinformático del ORF PA1622

Se realizó un análisis bioinformático mediante alineamiento de secuencias usando el programa Blast Protein del NCBI (National Center of Biotechnology Information) con la finalidad de conocer la posible función de la proteína codificada por el ORF PA1622. Se empleó la secuencia de aminoácidos del ORF PA1622 para encontrar proteínas con secuencias similares. En este programa, la identidad corresponde al número de aminoácidos entre las dos secuencias que son idénticos. En primera instancia, se encontraron secuencias 100 % idénticas a la del ORF PA1622 presentes en múltiples cepas de *P. aeruginosa*, así como en diversas especies del género *Pseudomonas*. Además, se encontró similitud con proteínas pimeloil-ACP metil ester carboxilesterasas, lipasas y epóxido hidrolasas. Las primeras, participan en la biosíntesis de ácidos grasos y en la biosíntesis de la biotina, un cofactor que participa en diversas rutas metabólicas como la gluconeogénesis, la biosíntesis de ácidos grasos y el metabolismo de aminoácidos. Las lipasas son enzimas que rompen los enlaces éster de diversos compuestos lipídicos como triglicéridos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, entre otros. Por otra parte, las epóxido hidrolasas participan en la degradación de xenobióticos y detoxificación de sustancias tóxicas, además algunas pueden degradar antibióticos y ácidos grasos epoxidados (Arand et al., 2005).

Tabla 20. Análisis por alineamiento de secuencias usando el programa Blast Protein del NCBI.

DESCRIPCIÓN	ESPECIE	IDENTIDAD	COBERTURA
α/β -hidrolasa multi especie	<i>Pseudomonas spp.</i>	100.0 %	100.0 %
Pimeloil-ACP metil ester carboxilesterasa	<i>Pseudomonas panipatensis</i>	82.5 %	100.0 %
Pimeloil-ACP metil ester carboxilesterasa	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	78.5 %	99.0 %

Pimeloil-ACP metil ester carboxilesterasa	<i>Pseudomonas indica</i>	74.7 %	100.0 %
Epóxido hidrolasa	<i>Pseudomonas pohangensis</i>	72.3 %	100.0 %
Lipasa	<i>Paucimonas lemoignei</i>	69.5 %	100.0 %
Lipasa	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	68.5 %	63.0 %
Lipasa	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	65.26 %	100.0 %
Epóxido hidrolasa	<i>Halopseudomonas xinjiangensis</i>	50.7 %	99.0 %

Especificaciones: El análisis por alineamiento de secuencias se realizó utilizando el programa Blast Protein del NCBI con los parámetros predeterminados para comparación de secuencias. La identidad indica el porcentaje de los aminoácidos exactamente iguales entre las secuencias comparadas. La cobertura indica el porcentaje total de la secuencia que está alineado entre las dos secuencias.

7.2.- Obtención de la mutante PA1622::Gm

Se inició con una construcción en el plásmido pGem, que contenía el ORF PA1622 (861 pb), interrumpido por un casete de resistencia a gentamicina (Gm^R) de 925 pb, lo que dio como resultado un tamaño total de 1786 pb (Figura 11A). Para confirmar la correcta construcción, se realizó la amplificación del fragmento PA1622::Gm, obteniéndose una banda de 1786 pb, como se había anticipado (Figura 11B).

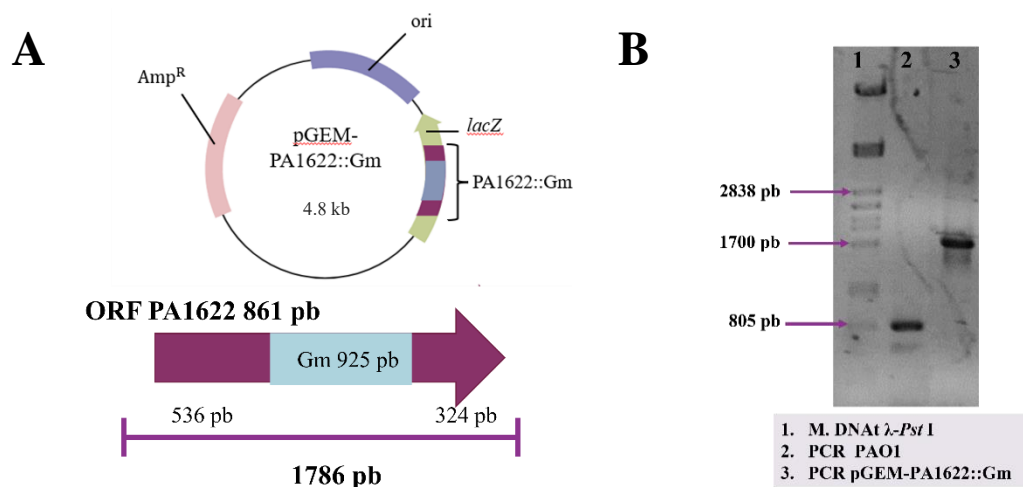


Figura 11. Verificación de la construcción pGem-PA1622::Gm. A) Esquema representativo que muestra la construcción pGEM-PA1622::Gm, en la cual se marca el origen de replicación (ori), el gen de resistencia a ampicilina (Amp^R) y el sitio el sitio de inserción en el gen *lacZ*. Debajo se muestra el tamaño del ORF PA1622 interrumpido con un casete de resistencia a gentamicina. B) Electroforesis en gel de agarosa de la

amplificación del ORF PA1622. Carril 1= marcador de tamaño molecular (M). Carril 2= amplificación del ORF PA1622 de la cepa PAO1 (861 pb). Carril 3= amplificación del ORF PA1622 de la cepa pGem-PA1622::Gm (1786 pb).

Adicionalmente, se realizó un análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, que corta en los extremos y en un sitio interno del ORF PA1622 (Figura 12A). De este análisis se obtuvieron tres bandas: la primera de 3016 pb, correspondiente al plásmido linealizado; la segunda de 1249 pb, correspondiente al Gm^R unido al segundo fragmento del gen; y la tercera de 536 pb, correspondiente al fragmento restante del gen (Figura 12B).

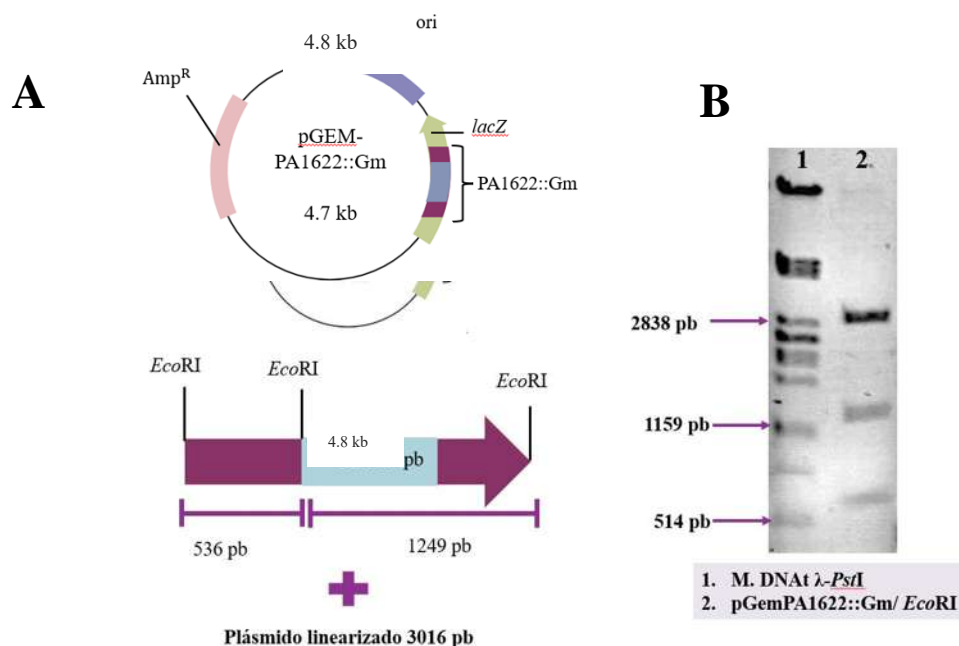


Figura 12. Análisis de restricción de la construcción pGem-PA1622::Gm. A) Esquema representativo de los sitios de corte externos e interno para la enzima *EcoRI* en la construcción pGEM-PA1622::Gm, en la cual se marca el origen de replicación (ori), el gen de resistencia a ampicilina (Amp^R) y el sitio de inserción en el gen *lacZ*. B) Electroforesis en gel de agarosa de la restricción. Carril 1= marcador de tamaño molecular (M). Carril 2 = restricción de pGem-PA1622::Gm empleando a la enzima *EcoRI*. Se muestran las tres bandas obtenidas: 1) 3016 pb correspondiente al plásmido pGem linealizado; 2) 536 pb correspondiente al primer fragmento del ORF PA1622; y 3) 1249 pb correspondiente al Gm^R y al fragmento restante del ORF PA1622.

Una vez verificada la construcción, se procedió a construir la mutante PAO1-PA1622::Gm (que en adelante se nombrará como PA1622::Gm) mediante transformación por electroporación en células competentes de *P. aeruginosa* PAO1. Posteriormente, se verificó que la inserción del casete de Gm^R estuviera en el locus correcto. Para ello, se realizaron dos amplificaciones por PCR y un análisis de restricción. Para la primer amplificación se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes al ORF PA1622, obteniendo una banda de 1786 pb, que corresponde al ORF PA1622::Gm (Figura 13).

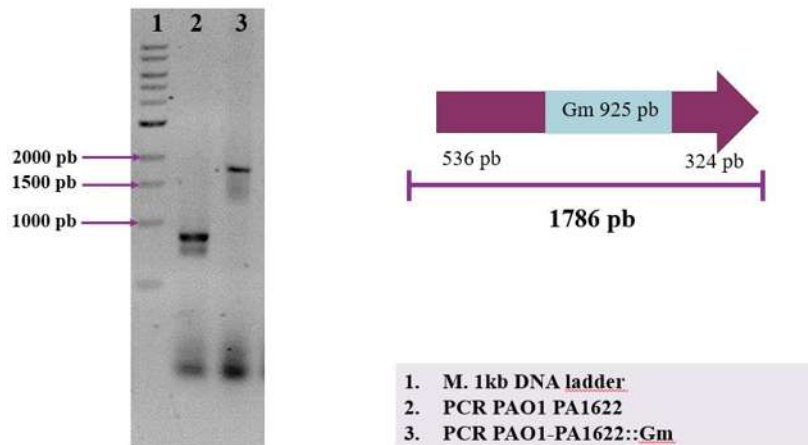


Figura 13. Amplificación del ORF PA1622::Gm. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación que emplea los oligonucleótidos del ORF PA1622. Carril 1 = marcador de tamaño molecular. Carril 2= amplificación del ORF PA1622 de la cepa PAO1 (861 pb). Carril 3= amplificación del ORF PA1622 de la cepa PAO1-PA1622::Gm (1786 pb).

Posteriormente, se purificó el ADN amplificado en esta PCR y se usó como molde para la segunda amplificación, ahora empleando los oligonucleótidos aacC1 correspondientes al Gm^R. En esta amplificación se obtuvo la banda esperada de 925 pb (Figura 14).

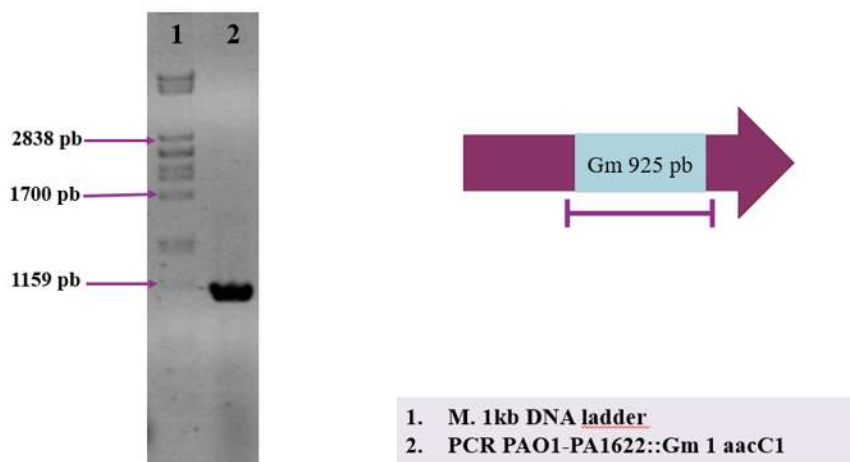


Figura 14. Amplificación del casete Gm^R presente en el ORF PA1622 de la mutante PA1622::Gm. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación que emplea oligonucleótidos aacC1 y esquema representativo del ORF PA1622::Gm, señalando al Gm^R. Carril 1 = marcador de tamaño molecular. Carril 2= amplificación del casete de Gm^R de la cepa PA1622::Gm.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de restricción con *Eco*RI del producto de la primera amplificación y se obtuvieron dos bandas: la primera de 1249 pb, correspondiente al Gm^R unido al segundo fragmento del gen y la segunda de 536 pb, correspondiente al fragmento restante del gen (Figura 15).

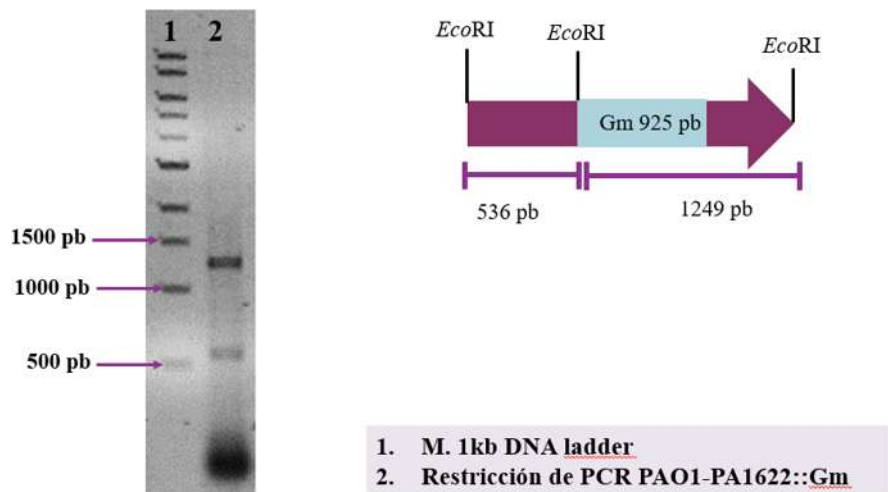


Figura 15. Análisis de restricción del ORF PA1622 de la mutante. Electroforesis en gel de agarosa de la restricción con la enzima *EcoRI* del ORF PA1622::*Gm*. Carril 1= marcador de tamaño molecular (M). Carril 2 = restricción de PAO1-PA1622::*Gm* empleando a la enzima *EcoRI*. Se muestran las dos bandas obtenidas: 1) 536 pb correspondiente al primer fragmento del ORF PA1622; y 2) 1249 pb correspondiente al *Gm*^R y al fragmento restante del ORF PA1622.

7.3.- Efecto de la mutación en el ORF PA1622 sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*

Para evaluar el impacto de la mutación del ORF PA1622 sobre la capacidad de crecimiento de la mutante se realizó una curva de crecimiento en medio LB (Figura 16). Dicha curva se monitoreo durante 24 h observándose una ligera disminución en el crecimiento en las primeras 8 h, no obstante, el crecimiento de la mutante se estabilizó a partir de la hora 9.

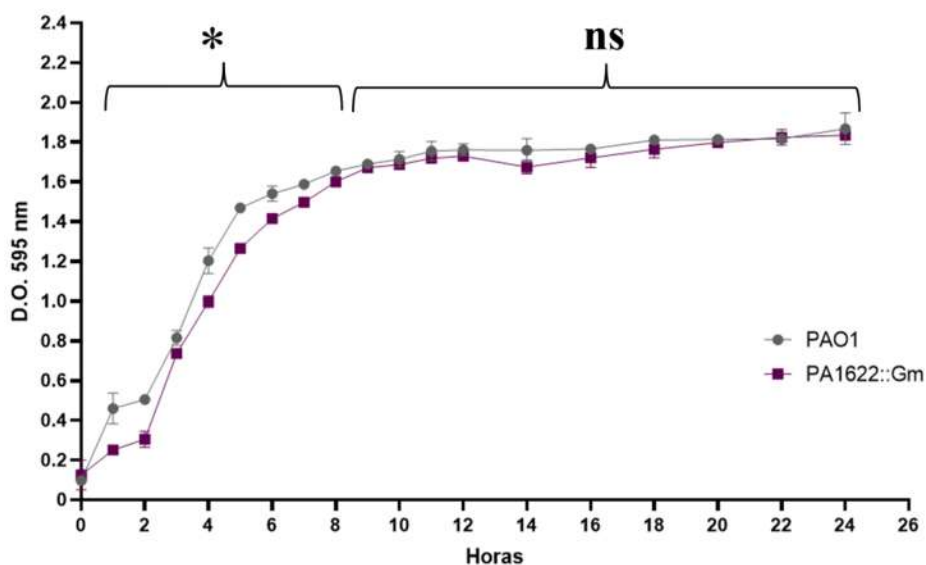


Figura 16. Curva de crecimiento de 24 h en medio LB. Gráfico del crecimiento en donde se observa la capacidad de crecimiento de la cepa PA1622::*Gm* (vino), en comparación con la cepa PAO1 (gris). *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, *= diferencia significativa, SEM, n=4.

7.4.- Efecto de la mutación en el ORF PA1622 sobre la producción de AHL

Con la finalidad de evaluar la actividad del QS, se midió la producción de AHL (OdHSL, perteneciente al sistema Las) en cultivos de 24 horas, utilizando la cepa biosensora pSB1075. Los resultados muestran un incremento en la producción de AHL en comparación con la cepa silvestre PAO1, lo cual podría indicar una relación entre PA1622 y la señalización del QS (Figura 17).

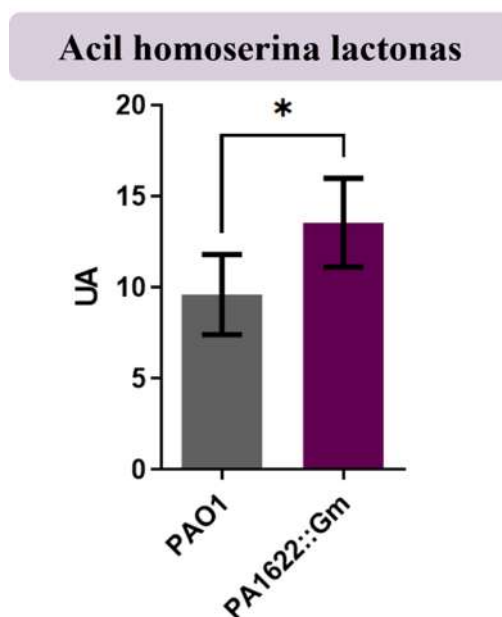


Figura 17. Producción de AHL a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, *= diferencia significativa, SEM, $n=7$. UA = Unidades Arbitrarias.

7.5.- Impacto de la mutación en el ORF PA1622 sobre la producción factores de virulencia

En lo que respecta a las enzimas proteolíticas, se midió la producción tanto de proteasas totales como de elastasas, las proteasas encargadas de degradar las fibras de elastina. En la determinación de proteasas totales no se observó ninguna diferencia significativa, sin embargo, en las elastasas se encontró un aumento de estas enzimas en la cepa PA1622::Gm respecto a PAO1 (Figura 18).

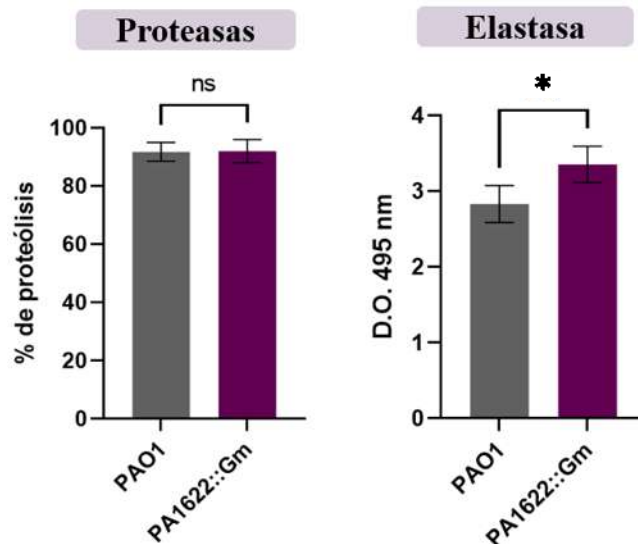


Figura 18. Producción de proteasas totales y elastasas a las las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, *= diferencia significativa, SEM, n=7.

Para observar el efecto de la interrupción del ORF PA1622 sobre la biosíntesis de moléculas quelantes de hierro, se midió la producción de pioverdina y piocianina en cultivos de 24 horas. Los resultados obtenidos indicaron que no existe diferencia significativa en la producción de estos sideróforos (Figura 19).

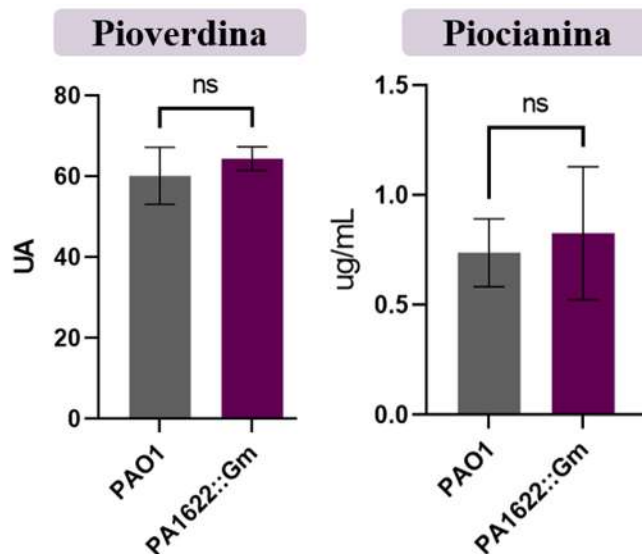


Figura 19. Producción de los sideróforos piocianina y pioverdina a las las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, SEM, n=7. UA (Unidades Arbitrarias).

En cuanto a los ensayos de movilidad, los resultados mostraron que la mutación afecta de manera tanto positiva como negativa la movilidad de *P. aeruginosa*.

En el caso de la movilidad por swimming, que es mediada por el flagelo, se ve un aumento tanto en las 24 h como en las 48 h en comparación con la cepa control. Por el contrario,

en la movilidad por swarming, que se da por la combinación de pilis, flagelos y moléculas biosurfactantes, se puede apreciar una disminución (Figura 20).

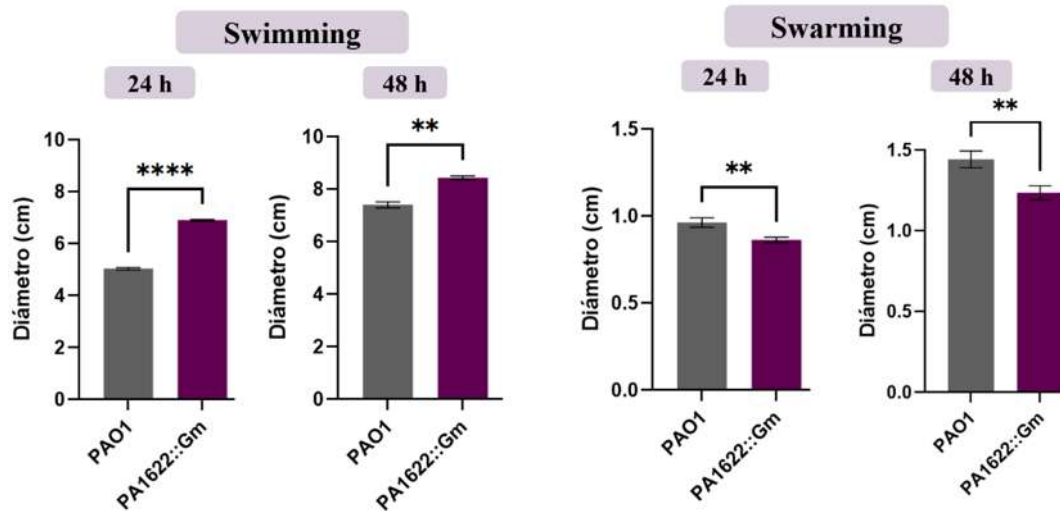


Figura 20. Movilidad por swimming y swarming a las 24 h y 48 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, **= diferencia significativa, ****= diferencia significativa, SEM, $n=7$.

Los resultados también mostraron que la producción de los exopolisacáridos totales aumenta a causa de la pérdida de la función en el ORF PA1622, sin embargo, la producción del exopolisacárido alginato no se vio afectada (Figura 21).

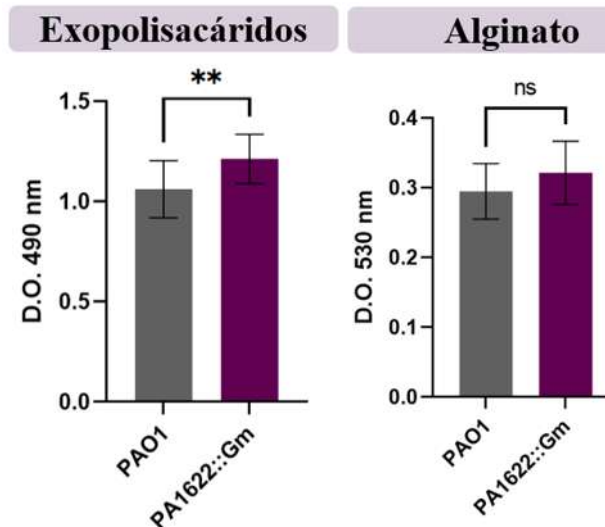


Figura 21. Producción de exopolisacáridos totales y alginato a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, **= diferencia significativa, SEM, $n=7$.

Parte de los elementos principales para la correcta formación de la biopelícula son los LPS y los ramnolípidos. Los resultados obtenidos de la cuantificación de estos factores de virulencia indicaron que la producción de ramnolípidos y lipopolisacáridos se vio incrementada por la interrupción del ORF PA1622 en la mutante (Figura 22).

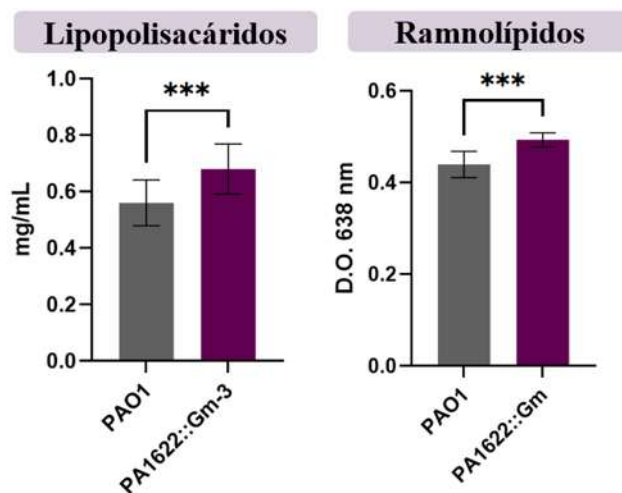


Figura 22. Producción de lipopolisacáridos y ramnolípidos a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ***= diferencia significativa, SEM, $n=7$.

Concordando con el aumento en la producción de ramnolípidos y LPS respecto a la cepa de referencia PAO1, la producción de biopelícula después de 24 h de crecimiento, presentó una elevación en la cantidad producida (Figura 23).

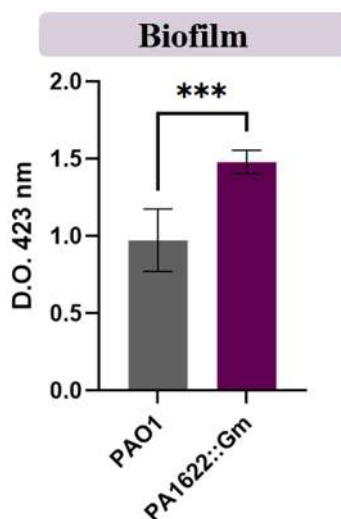


Figura 23. Producción de biopelícula a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ***= diferencia significativa, SEM, $n=7$.

7.6.-Determinación de la composición de la biopelícula en la mutante PA1622::Gm

Debido al drástico aumento en la producción de la biopelícula que presenta la mutante, resultó interesante evaluar su composición debido a que es una estructura que favorece la virulencia y la resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*. Se evaluó la cantidad de algunos componentes de la biopelícula como: la cantidad de proteínas, exopolisacáridos, alginato, ramnolípidos y ADNe contenidos. Los resultados obtenidos

indicaron que no existe diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de proteínas entre las cepas PAO1 y PA1622::Gm (Figura 24).

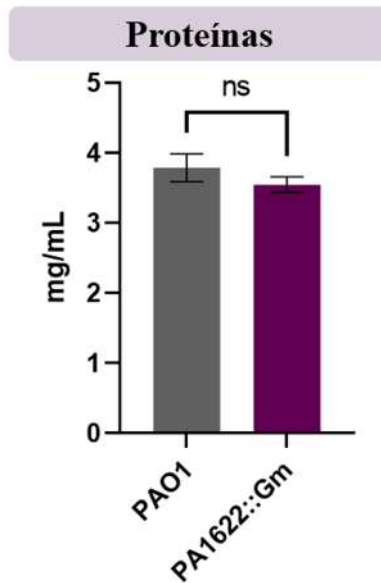


Figura 24. Cuantificación de proteínas de la biopelícula a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, SEM, $n=7$.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de exopolisacáridos totales y alginato, mostraron que existe una disminución significativa en la producción de ambos componentes de la biopelícula en la cepa PA1622::Gm (Figura 25).

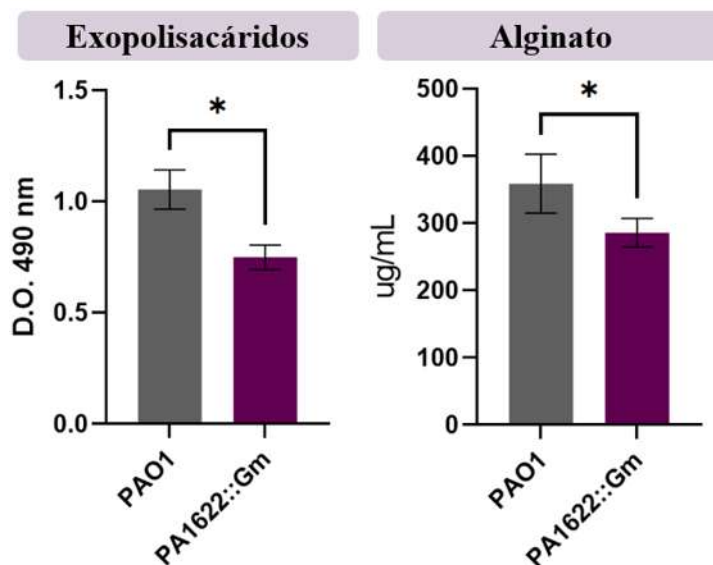


Figura 25. Cuantificación de exopolisacáridos totales y alginato de la biopelícula a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, *= diferencia significativa, SEM, $n=7$.

En la cuantificación de ramnolípidos presentes en la biopelícula no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, si se pudo notar una ligera tendencia al alta en la mutante PA1622::Gm (Figura 26).

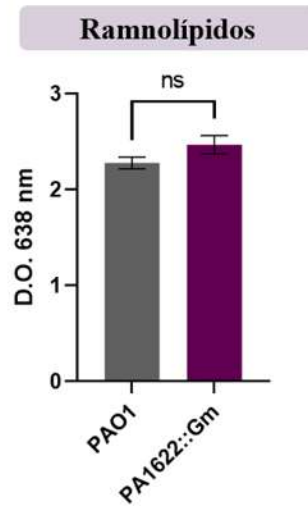


Figura 26. Cuantificación de ramnolípidos a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, SEM, $n=7$.

Finalmente, se evaluó la cantidad de ADN presente en la biopelícula, encontrando una disminución considerable de este en la mutante PA1622::Gm (Figura 27).

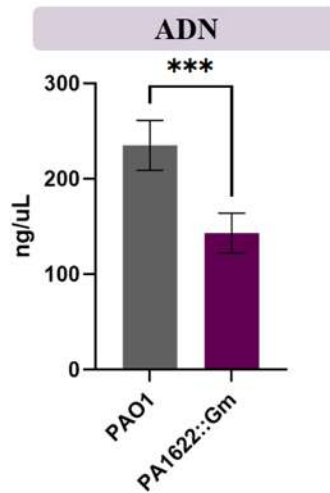


Figura 27. Cuantificación de ADN a las 24 h en medio LB. *t* de Student, donde $p \leq 0.05$, ***= diferencia significativa, SEM, $n=7$.

7.7.-Evaluación de la virulencia de la mutante PA1622::Gm en un modelo *in vivo*

Con la finalidad de observar la implicación del ORF PA1622 en la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1, se llevó a cabo un ensayo de supervivencia en nemátodos empleando cultivos y sobrenadantes de las cepas PAO1 y PA1622::Gm.

En ambos ensayos no se observaron diferencias significativas en la capacidad de matar a los nemátodos, en ninguno de los periodos monitoreados entre las diferentes cepas (Figuras 28 y 29).

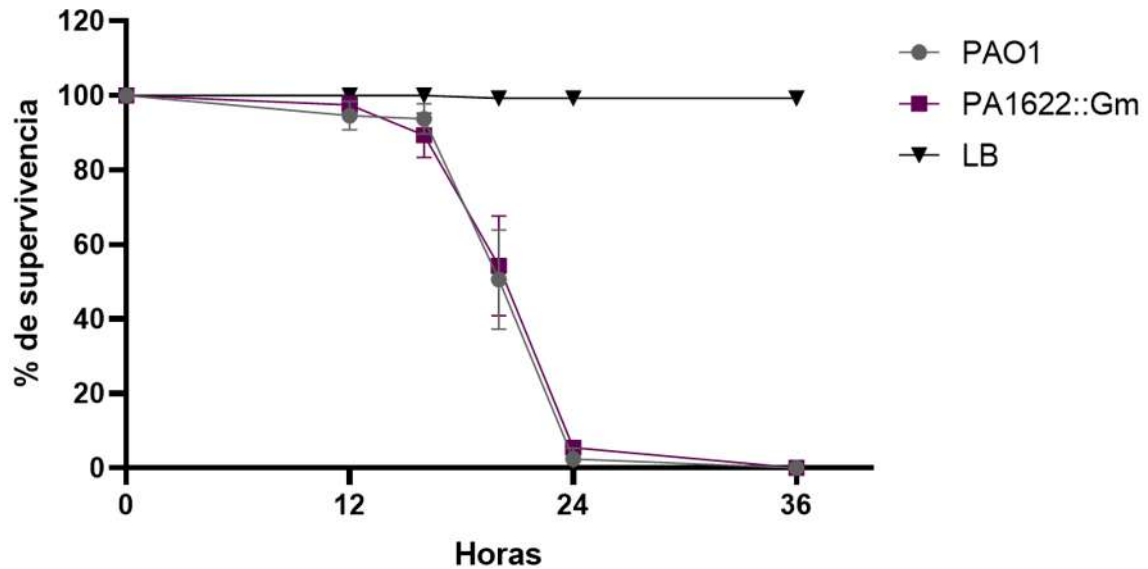


Figura 28. Curva de supervivencia de nemátodos en cultivo. Cultivo directo de 24 h, D.O.= 0.01. t de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, SEM, n=20, tres experimentos independientes.

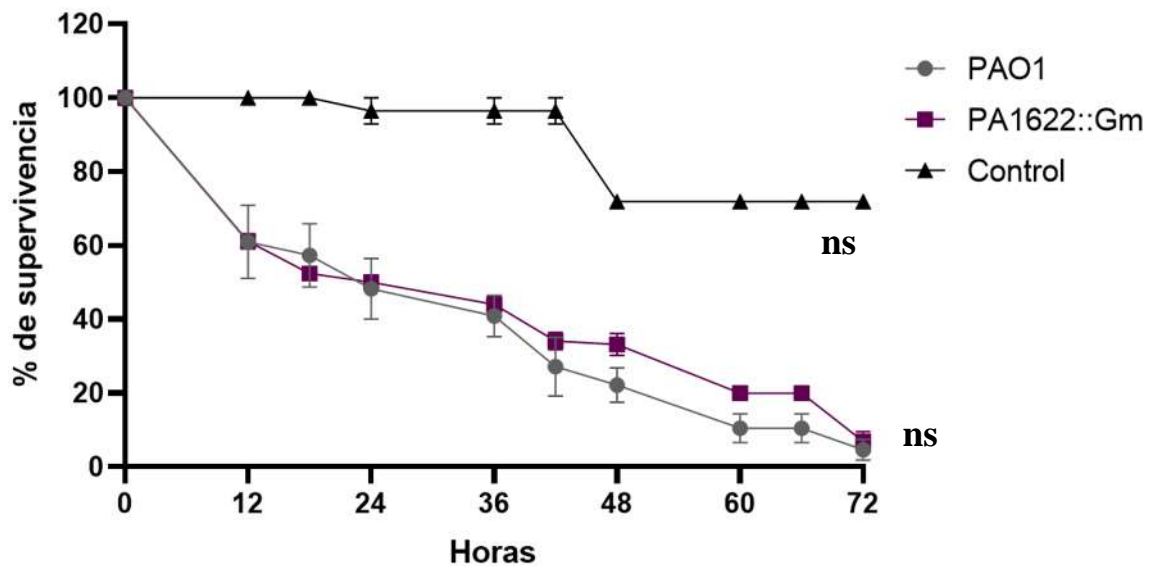


Figura 29. Curva de supervivencia de nemátodos en sobrenadante. Sobrenadante de 24 h. t de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, SEM, n=20, tres experimentos independientes. Control= medio LB.

7.8.-Efecto de la interrupción del ORF PA1622 sobre la resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa* PAO1

Debido a que, tanto la biopelícula como los LPS, que son estructuras que participan en la resistencia a antibióticos, se vieron modificados en la mutante, y a los antecedentes sobre la posible participación del ORF PA1622 en la resistencia a antibióticos, se llevó a cabo la determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) empleando distintas clases de antibióticos (aminoglucósidos, cefalosporina y fluoroquinolona) sobre la mutante PA1622::Gm. Los resultados mostraron que en ausencia del ORF PA1622, la cepa sufrió una disminución general en la resistencia a antibióticos a las 24 h, ya que la IC50 se vio disminuida en todos los antibióticos a los cuales se expuso.

Tabla 21. Evaluación de la sensibilidad antibiótica de PAO1 y PA1622::Gm

Antibiótico	IC50 (µg/mL)	
	PAO1	PA1622::Gm
Ceftriaxona	586.99 ± 29.59	247.12 ± 38.55
Ciprofloxacina	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.01
Kanamicina	327.49 ± 8.44	308.99 ± 7.40
Tobramicina	1.53 ± 0.08	1.39 ± 0.06
Amikacina	5.14 ± 0.24	4.79 ± 0.9

8.-DISCUSIÓN

P. aeruginosa es un patógeno oportunista de relevancia mundial que posee una gran capacidad de adaptación y versatilidad metabólica. Se caracteriza por poseer un amplio arsenal de factores de virulencia, regulados por el metabolismo y los sistemas de QS, y diversos mecanismos que le proporcionan resistencia contra antibióticos (Jurado-Martín et al., 2021). El ORF PA1622 es un gen que codifica para una proteína posiblemente homotetramérica que posee similitud con α/β -hidrolasas.

El análisis bioinformático realizado mediante alineamiento de secuencias muestra que el ORF PA1622 está altamente conservado en múltiples cepas de *P. aeruginosa* y otras especies del género *Pseudomonas*, lo cual concuerda con estudios genómicos previos (Bruce et al., 2009). Además, se identificó una alta similitud con enzimas como la pimeloil-ACP metil éster carboxilesterasas, lipasas y epóxido hidrolasas, lo que sugiere que PA1622 podría estar involucrado en procesos tales como el metabolismo lipídico (Figura 30) o la detoxificación de compuestos tóxicos, como los antibióticos (Tabla 47).

La función del ORF PA1622 se determinó mediante la generación y el uso de la cepa mutante PA1622::Gm, la cual mostró una ligera disminución en su crecimiento durante la fase exponencial, etapa en donde se refleja si existen o no alteraciones en procesos celulares básicos (Alpers et al., 2023). Posteriormente, el crecimiento se estabilizó en la fase estacionaria, la cual está relacionada con la adaptación y la expresión de los factores de virulencia (Alpers et al., 2023). Estos resultados sugieren que la interrupción de PA1622 podría estar afectando temporalmente algún proceso celular básico; sin embargo, la viabilidad no se ve comprometida ya que la bacteria es capaz de adaptarse y continuar su desarrollo con normalidad. Lo anterior indica que, aunque PA1622 no es un gen esencial, sí desempeña un papel importante para la bacteria, lo que explica su conservación evolutiva.

Las AHL, especialmente la OdDHL (sistema Las), son moléculas clave para la activación jerárquica del QS (Lee y Zhang, 2015). Su biosíntesis depende de diversos factores, como la disponibilidad de precursores, el metabolismo, la densidad celular y la regulación genética, entre otros (Davenport et al., 2015; Fuqua et al., 2001; Miller & Bassler, 2001). El aumento en la producción de OdDHL sugiere que PA1622, un gen posiblemente implicado en el metabolismo, podría estar involucrado en la regulación negativa del QS a través de su participación en procesos metabólicos; sin embargo, hace falta explorar más a fondo esta conexión.

El aumento en la producción de factores de virulencia, como elastasas, EPS y ramnolípidos, es consistente con la producción elevada de OdDHL. Las OdDHL activan al regulador LasR, que desencadena la transcripción de elastasa y exopolisacáridos (Lee y Zhang, 2015). La producción elevada de ramnolípidos podría deberse a la sobreactivación del sistema Las, que, debido a su jerarquía, activa al sistema Rhl, el cual controla la producción de ramnolípidos (Lee y Zhang, 2015; Mukherjee y Bassler, 2019). En conjunto, estos resultados nos sugieren una posible sobreactivación del QS en respuesta a la ausencia de la proteína codificada por PA1622.

El movimiento por swimming, es dependiente del flagelo, una estructura cuya biosíntesis es altamente compleja, donde la densidad celular desempeña un papel importante. A pesar de que en *P. aeruginosa* no está bien establecida la relación entre el QS y la biosíntesis del flagelo, se teoriza que podría estar involucrado (Khan et al., 2019; Bouteiller et al., 2021), debido a que se ha demostrado que en otras bacterias Gram negativas el QS activa la expresión de genes flagelares (Sperandio et al., 2002; Kim et al., 2007; Morohoshi et al., 2009; Bouteiller et al., 2021). Por lo tanto, el aumento en la movilidad por swimming podría ser consistente con la producción elevada de AHL que sobreactiva al QS. Por otra parte, el swarming es un tipo de movilidad que depende de la participación del flagelo y el pili tipo IV y de la biosíntesis de ramnolípidos, por lo que es dependiente del sistema Rhl (Köhler et al., 2000; Daniels et al., 2004; Khan et al., 2019). Los resultados arrojaron una disminución del movimiento por swarming, lo cual es consistente con la sobreproducción de ramnolípidos, ya que se ha reportado que los ramnolípidos en concentraciones altas inhiben este tipo de movilidad al crear un ambiente no propicio (Reis et al., 2011).

El incremento en la producción de EPS totales, pero no de alginato puede ser debido a que el alginato no es el EPS predominante en cepas no mucoides de *P. aeruginosa* (como es el caso de la cepa PAO1) cultivadas *in vitro*, además de que no es necesario para la formación de la biopelícula (Ramsey y Wozniak, 2005; Morici et al., 2007).

La pioverdina es un sideróforo cuya biosíntesis está finamente autorregulada de acuerdo a la disponibilidad de hierro en el medio (Ghssein y Ezzeddine, 2022). La ausencia de diferencias en su producción sugiere que el ORF PA1622 no participa directamente ni en su regulación ni en su biosíntesis. Por su parte, la biosíntesis de piocianina depende de una interacción compleja entre los sistemas del QS (Jayaseelan

et al., 2014; Abdelaziz et al., 2023). Se ha demostrado que la expresión de los genes *phz*, los responsables de la biosíntesis de la piocianina y cuya expresión está regulada principalmente por el sistema PQS, se activa en presencia de moléculas autoinductoras como son OdDHL y C4-HSL (Dietrich et al., 2006; Schuster et al., 2003). Sin embargo, debido a que en *P. aeruginosa* los sistemas de QS están regulados jerárquicamente con el sistema Las en la cima, y a que el sistema Rhl regula negativamente al sistema PQS (Welsh et al., 2015; Higgins et al., 2018), es posible que la desregulación en el QS que presenta la mutante PA1622::Gm, tenga impacto sobre el sistema PQS y en la activación de los genes *phz* y no se observe el aumento esperado.

En cuanto a la producción del LPS, no se sabe el mecanismo por el cual está siendo aumentado, sin embargo, concuerda con lo observado en la mutante en *fadD4*, debido a que este gen se encuentra en el mismo operón que el ORF PA1622 y participa en la síntesis y degradación del LPS a través del metabolismo de ácidos grasos (Martínez-Alcantar et al., 2021). Algunas posibles explicaciones podrían ser que ocurra una desregulación metabólica por la transcripción truncada de la hidrolasa putativa codificada por este gen o una desregulación en el operón putativo que contiene al ORF PA1622.

En principio, el aumento en la producción de la biopelícula parecía consistente con la producción exacerbada de EPS, ramnolípidos y LPS en el sobrenadante, debido a que estos son componentes importantes para la formación de la biopelícula. No obstante, una vez que se analizó la composición interna de la biopelícula, se pudo observar una disminución significativa de EPS totales, alginato y ADN. La secreción elevada de EPS, pero disminución en la biopelícula podría indicar que, a pesar de ser excretados por la célula, los EPS no se están incorporando a la matriz de la biopelícula. Una posible explicación a este fenómeno es que la formación de la biopelícula es un proceso complejo que depende de diversos factores. Si algún factor importante llegara a faltar, como el ADNe, se puede producir una matriz defectuosa. Además, los cambios en el metabolismo bacteriano también pueden afectar la composición y arquitectura de la biopelícula (Ghafoor et al., 2011; Rybtke et al., 2015; Thi et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado que las biopelículas pueden retener solutos presentes en el medio y que la cantidad de EPS afecta directamente la capacidad de retención de agua (Ziege et al., 2021; Quan et al., 2022). Lo anterior representa una posible explicación de por qué en nuestra mutante, la cantidad total de biopelícula adherida, no refleja la cantidad de biopelícula componentes estructurales presenten en ella.

La disminución de EPS y ADN puede estar desempeñando un papel importante en la disminución de la resistencia a antibióticos, debido a que estos dos componentes forman una barrera electrostática (Das et al., 2013; Chung et al., 2023). Ambos poseen cargas negativas que interactúan con las cargas positivas presentes en antibióticos (como los aminoglucósidos), capturándolos e impidiendo que estos alcancen a las células bacterianas (Taylor et al., 2014; Wilton et al., 2016; Fernández-Billón et al., 2023).

Otro factor que podría tener una implicación importante en la disminución en la resistencia a antibióticos es la alteración en la producción de LPS. El LPS es una estructura clave en la resistencia a antibióticos, ya que su composición, especialmente en las cadenas de acilo y los grupos fosfato del lípido A, modula la permeabilidad y la carga electrostática de la membrana externa, afectando la penetración de antibióticos a la célula bacteriana. Las modificaciones en la acilación del lípido A o la sustitución de los grupos fosfato pueden alterar la función de barrera del LPS, facilitando la penetración de antibióticos y reduciendo la resistencia bacteriana (Moskowitz y Ernst, 2010; Huszczyński et al., 2020b). Aunque en la mutante PA1622::Gm exhibe un aumento en la producción de LPS, la falta de incremento en la resistencia a antibióticos sugiere que la composición de esta molécula podría estar alterada.

La mutante presenta una menor tolerancia a los antibióticos, ya que su capacidad para crecer en presencia de los aminoglucósidos tobramicina, kanamicina y amikacina, la cefalosporina ceftriaxona y la fluoroquinolona ciprofloxacina se vio disminuida. Lo anterior ocurre probablemente a través mecanismos relacionados con la producción de la biopelícula y/o LPS. Estos hallazgos refuerzan la importancia de PA1622 como un posible blanco para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y apoyan la idea de que es un gen condicionalmente esencial para la resistencia a antibióticos (Bruce et al., 2009; Ranjani et al., 2022).

Finalmente, el modelo de patogenicidad *in vivo* en *C. elegans* no mostró diferencias significativas en la supervivencia cuando se enfrentó al nemátodo con el cultivo o sobrenadante, pese a los incrementos observados *in vitro* en ciertos factores de virulencia. Estas diferencias pueden deberse a que los experimentos realizados *in vitro*, no replican las condiciones naturales de un modelo *in vivo*, donde se evalúa la interacción huésped-patógeno. Como resultado de estas condiciones y de las interacciones entre ambos microorganismos, la producción de factores de virulencia puede diferir *in vivo* e *in vitro* (Sendra et al., 2024). Además, se ha comprobado que, en los ensayos de virulencia

en líquido en *C. elegans*, *P. aeruginosa* requiere de la producción de pioverdina para producir la muerte del nemátodo (Kirienko et al., 2013). Esto concuerda con la ausencia de diferencias en la producción de pioverdina *in vitro* de la mutante.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que, si bien la ausencia de PA1622 da lugar a un fenotipo aparentemente más virulento, que produce una mayor cantidad de AHL, elastasa, ramnolípidos y exopolisacáridos, los ensayos de virulencia *in vivo* en *C. elegans* no mostraron diferencias significativas en la supervivencia. Esto indica que PA1622 no es un gen determinante para virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en este modelo. No obstante, sería importante evaluar su impacto en otros modelos que se asemejen más a las condiciones naturales de la infección en humano, como en ratones o células del epitelio pulmonar.

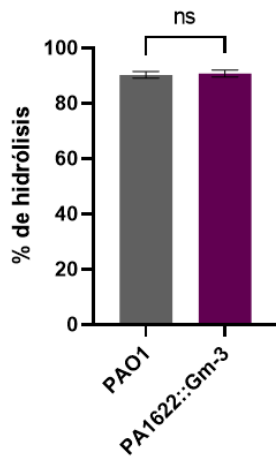
9.-CONCLUSIONES

El presente estudio proporciona evidencia de que el ORF PA1622 de *P. aeruginosa* PAO1 participa en diversos procesos celulares. El análisis bioinformático confirmó su alta conservación evolutiva en el género *Pseudomonas*. Además, su similitud con hidrolasas lipídicas y epóxido hidrolasas sugiere la participación de este gen en rutas metabólicas asociadas a lípidos y detoxificación. Aunque los ensayos *in vitro* mostraron un fenotipo virulento, esto no se correlaciona con lo observado *in vivo* en *C. elegans*, lo que sugiere que el ORF PA1622 no es un determinante esencial para la virulencia de la bacteria en este modelo. La interrupción del gen generó un fenotipo con menor resistencia a antibióticos, lo que sugiere que el ORF PA1622 está involucrado en mecanismos que contribuyen a la resistencia bacteriana, probablemente a través procesos asociados a la biosíntesis de LPS y la estructuración de la biopelícula. En conjunto, estos resultados posicionan a al ORF PA1622 como un gen condicionalmente esencial, con implicaciones en el metabolismo y la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* PAO1.

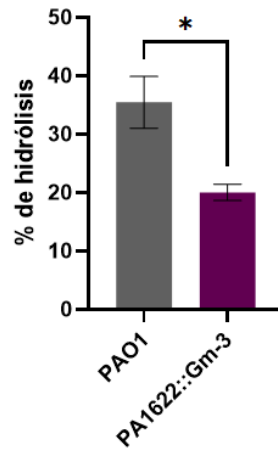
Futuras investigaciones deberán explorar su papel en modelos de infección más complejos, analizar la su participación en el metabolismo lipídico e investigar a fondo los posibles mecanismos de resistencia a antibióticos en los que este gen se encuentre implicado, como la composición del lipopolisacárido y el perfil lipídico de la membrana.

10.- ANEXO

Hidrolisis de fosfatidilcolina



Hidrolisis de aceite de oliva



Hidrólisis de alfa-naftil acetato

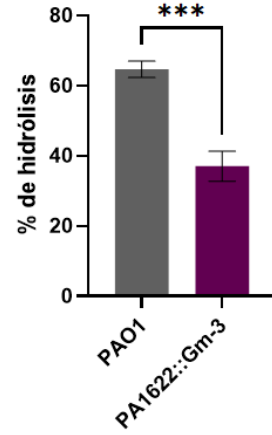


Figura 30. Hidrólisis de sustratos lipídicos. D.O. inicial= 0.01. Medio mínimo suplementado con sustratos lipídicos al 0.1% como única fuente de carbono. t de Student, donde $p \leq 0.05$, ns= sin diferencia significativa, *= diferencia significativa, ***= diferencia significativa, SEM, n=5.

11.-BIBLIOGRAFÍA

- Abdelaziz, A. A., Kamer, A. M. A., Al-Monofy, K. B., & Al-Madboly, L. A. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microbial Cell Factories*, 22(110). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02122-1>
- Aeschlimann, J. R. (2003). The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*, 23(7), 916–924. <https://doi.org/10.1592/phco.23.7.916.32722>
- Allison, T. M., & Castric, P. (2016). Selective distribution of *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen among strains producing group I pilin. *Pathogens and Disease*, 74(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv102>
- Alpers, K., Vatareck, E., Gröbe, L., Müsken, M., Scharfe, M., Häussler, S., & Tomasch, J. (2023). Transcriptome dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* during transition from overlapping to non-overlapping cell cycles. *mSystems*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.01130-22>
- Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2013). Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 180–195. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.699025>
- Andrejko, M., Siemińska-Kuczer, A., Janczarek, M., Janik, E., Bednarczyk, M., Gagoś, M., & Cytryńska, M. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease exhibits a high renaturation capability. *Acta Biochimica Polonica*, 66(1), 91–100. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2741
- Arand, M., Cronin, A., Adamska, M., & Oesch, F. (2005). Epoxide hydrolases: Structure, function, mechanism, and assay. En *Methods in Enzymology* (Vol. 400, pp. 569–588). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00032-7)
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Azimi, S., Thomas, J., Cleland, S. E., Curtis, J. E., Goldberg, J. B., & Diggle, S. P. (2021). O-specific antigen-dependent surface hydrophobicity mediates aggregate assembly type in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 12(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00860-21>
- Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-ghiorghi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas* flagella: Generalities and specificities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3337). <https://doi.org/10.3390/ijms22073337>

- Boyd, A., & Chakrabarty, A. M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology*, *15*, 162–168. <https://academic.oup.com/jimb/article/15/3/162/5988543>
- Brenner, S. (1973). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *77*, 71–94.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, *96*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
- Bruce, K. F., Warrener, P., & Hou, K. (2009). *Essential and important genes of Pseudomonas aeruginosa and the use thereof to desing or identify antibacterial agents* (Patent US 7,629,141 B2).
- Cabot, G., Bruchmann, S., Mulet, X., Zamorano, L., Moyá, B., Juan, C., Haussler, S., & Oliver, A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of amp^c. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(6), 3091–3099. <https://doi.org/10.1128/AAC.02462-13>
- Çakmak, H., Güngörmedi, G., Dikmen, G., Çelik, P. A., & Çabuk, A. (2017). The true methodology for rhamnolipid: Various solvents affects rhamnolipid characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*(10). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700002>
- Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S., & Häussler, S. (2015). LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition. *Infection and Immunity*, *84*(1), 162–171. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15>
- Cassin, E. K., & Shan Tseng, B. (2019). Pushing beyond the envelope: The potential roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, *201*(18). <https://doi.org/10.1128/JB>
- Chadha, J., Harjai, K., & Chhibber, S. (2022). Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, *24*(6), 2630–2656. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>
- Chakraborty, M., & Kotecha, S. (2013). Pulmonary surfactant in newborn infants and children. *Breathe*, *9*(6), 476–488. <https://doi.org/10.1183/20734735.006513>
- Chao, J., Wolfaardt, G. M., & Arts, M. T. (2010). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, *56*(12), 1028–1039. <https://doi.org/10.1139/W10-093>

- Chen, W., Liang, J. P., He, Z., & Jiang, W. (2016). Preliminary study on total protein extraction methods from *Enterococcus faecalis* biofilm. *Genetics and Molecular Research*, *15*(3). <https://doi.org/10.4238/gmr.15038988>
- Chen, Y.-C., Kalawong, R., Toyofuku, M., & Eberl, L. (2022). The role of peptidoglycan hydrolases in the formation and toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* membrane vesicles. *microLife*, *3*, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqac009>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(5), 698–722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, *15*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>
- Chung, J., Eisha, S., Park, S., Morris, A. J., & Martin, I. (2023). How three self-secreted biofilm exopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*, Psl, Pel, and Alginate, can each be exploited for antibiotic adjuvant effects in cystic fibrosis lung infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(8709). <https://doi.org/10.3390/ijms24108709>
- Cirz, R. T., O'Neill, B. M., Hammond, J. A., Head, S. R., & Romesberg, F. E. (2006). Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *Journal of Bacteriology*, *188*(20), 7101–7110. <https://doi.org/10.1128/JB.00807-06>
- Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. En *Pseudomonas Methods and Protocols* (Vol. 1149, pp. 631–641). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48
- Conibear, T. C. R., Willcox, M. D. P., Flanagan, J. L., & Zhu, H. (2012). Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, *61*, 180–190. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034561-0>
- Constantino-Teles, P., Jouault, A., Touqui, L., & Saliba, A. M. (2022). Role of host and bacterial lipids in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931027>
- Cox, C. D., & Parker, J. (1979). Use of 2-Aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, *9*(4), 479–484. <https://journals.asm.org/journal/jcm>

- Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 429–440. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4>
- Daniels, R., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), 261–289. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.004>
- Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 778–786. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12085>
- Davenport, P. W., Griffin, J. L., & Welch, M. (2015). Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 197(12), 2072–2082. <https://doi.org/10.1128/JB.02557-14>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Alves, O., Costa, E., Maltez, L., Pereira, J. E., Martins, Â., Igrejas, G., & Poeta, P. (2023). Study of antimicrobial resistance, biofilm formation, and motility of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urine samples. *Microorganisms*, 11(1345). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051345>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021a). Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021b). Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Dell'annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero, M., Arciola, C. R., Franci, G., & Belén Flórez, A. (2021). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Díaz-Pérez, S. P., Solís, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H., & Campos-García, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm-

- associated is dependent on the pyoverdine and pyocyanin siderophores by Quorum sensing modulation. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>
- Dietrich, L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *61*(5), 1308–1321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x>
- Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, *5*(13), 1213–1219. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>
- Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E., & Briandet, R. (2016). The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Frontiers in Microbiology*, *7*(1673). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01673>
- Ernst, R. K., Hajjar, A. M., Tsai, J. H., Moskowitz, S. M., Wilson, C. B., & Miller, S. I. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *Journal of Endotoxin Research*, *9*(6), 395–400. <https://doi.org/10.1179/096805103225002764>
- Espinoza-Pesantez, D. I., & Sanchez-Esparza, F. G. (2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista Chilena de Infectología*, *38*(1), 69–80. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>
- Everett, M. J., & Davies, D. T. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Fernández-Billón, M., Llambías-Cabot, A. E., Jordana-Lluch, E., Oliver, A., & Macià, M. D. (2023). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*, *5*. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100129>
- Filloux, A. (2010). A variety of bacterial pili involved in horizontal gene transfer. *Journal of Bacteriology*, *192*(13), 3243–3245. <https://doi.org/10.1128/JB.00424-10>
- Filloux, A., & Ramos, J. L. (2014). *Pseudomonas*. *Methods and Protocols*. Humana Press. Springer Science.
- Folch, B., Déziel, E., & Doucet, N. (2013). Systematic mutational analysis of the putative hydrolase PqsE: Toward a deeper molecular understanding of virulence acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073727>
- Friedman, L., & Kolter, R. (2004). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, *51*(3), 675–690. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x>

- Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L., & Schomburg, D. (2010). How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: A metabolomic approach. *Environmental Microbiology*, *12*(6), 1734–1747. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x>
- Firdich, E., & Gaynor, E. C. (2013). Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(6), 767–778. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.09.005>
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone Quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.*, *35*, 439–468. www.annualreviews.org
- Galdino M., A. C., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., & Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host. En S. Chakraborti & N. S. Dhalla (Eds.), *Pathophysiological aspects of proteases* (pp. 381–397). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7>
- Ghafoor, A., Hay, I. D., & Rehm, B. H. A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(15), 5238–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
- Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, *11*(1711). <https://doi.org/10.3390/biology11121711>
- González, O., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal peptide synthases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclodipeptide biosynthesis, Quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microbial Ecology*, *73*(3), 616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- González-Alsina, A., Mateu-Borrás, M., Doménech-Sánchez, A., & Albertí, S. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* and the complement system: A review of the evasion strategies. *Microorganisms*, *11*(664). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030664>
- Grassi, L., Di Luca, M., Maisetta, G., Rinaldi, A. C., Esin, S., Trampuz, A., & Batoni, G. (2017). Generation of persister cells of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by chemical treatment and evaluation of their susceptibility to membrane-targeting agents. *Frontiers in Microbiology*, *8*(1917). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01917>
- Hastings, C. J., Himmler, G. E., Patel, A., & Nogueira Hora Marques, C. (2023). Immune response modulation by *Pseudomonas aeruginosa* persister cells. *mBio*, *14*(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00056-23>

- Hausmann, S., & Jaeger K. K. (2010). Lipolytic Enzymes from bacteria. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1099–1126). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_77
- He, S., & Deber, C. M. (2024). Interaction of designed cationic antimicrobial peptides with the outer membrane of gram-negative bacteria. *Scientific Reports*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51716-1>
- Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., & Cámara, M. (2018). Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(252). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>
- Hofte, M., Buysens, S., Koedam, N., & Cornelis, P. (1993). Zinc affects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *BioMetals*, *6*, 85–91.
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2020a). The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2020b). The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
- Hvorecny, K. L., Dolben, E., Moreau-Marquis, S., Hampton, T. H., Shabaneh, T. B., Flitter, B. A., Bahl, C. D., Bomberger, J. M., Levy, B. D., Stanton, B. A., Hogan, D. A., & Madden, D. R. (2018). An epoxide hydrolase secreted by *Pseudomonas aeruginosa* decreases mucociliary transport and hinders bacterial clearance from the lung. *American Journal Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *314*, 150–156. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00383.2017>.
The
- Iiyama, K., Takahashi, E., Lee, J. M., Mon, H., Morishita, M., Kusakabe, T., & Yasunaga-Aoki, C. (2017). Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, *364*(7). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx051>
- Ilangovan, A., Connery, S., & Waksman, G. (2015). Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends in Microbiology*, *23*(5), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.012>
- IUBMB. (2024, marzo 1). *Enzyme Nomenclature*. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB).

- Jana, S., & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *70*(2), 140–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0>
- Johnson, D. I. (2018). *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors* (Vol. 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Johnston, E. L., Zavan, L., Bitto, N. J., Petrovski, S., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. (2023). Planktonic and biofilm-derived *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles facilitate horizontal gene transfer of plasmid DNA. *Microbiology Spectrum*, *11*(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.05179-22>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Kang, Y., Lunin, V. V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M. J., & Hoang, T. T. (2009). The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of rpoS and the type III secretion exsCEBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *73*(1), 120–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06757.x>
- Kang, Y., Zarzycki-Siek, J., Walton, C. B., Norris, M. H., & Hoang, T. T. (2010). Multiple fadd acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, *5*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013557>
- Kariminik, A., Baseri-Salehi, M., & Kheirkhah, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunology Letters*, *190*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>
- Khan, F., Pham, D. T. N., Oloketuyi, S. F., & Kim, Y. M. (2019). Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(1), 33–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10201-w>
- Kim, J., Kang, Y., Choi, O., Jeong, Y., Jeong, J. E., Lim, J. Y., Kim, M., Moon, J. S., Suga, H., & Hwang, I. (2007). Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology*, *64*(1), 165–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05646.x>
- Kirienko, N. V., Kirienko, D. R., Larkins-Ford, J., Wählby, C., Ruvkun, G., & Ausubel, F. M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic

- response and death. *Cell Host and Microbe*, 13(4), 406–416.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.003>
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T. M., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of Bacteriology*, 192(4), 1113–1121.
<https://doi.org/10.1128/JB.01515-09>
- Kocincova, D., & Lam, J. S. (2011). Structural diversity of the core oligosaccharide domain of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Biochemistry (Moscow)*, 76(7), 755–760.
<https://doi.org/10.1134/S0006297911070054>
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., & Pechère, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 182(21), 5990–5996.
- Krishnan, G., Sethumadhavan, A., Muthusamy, S., & Mani, M. (2019). Antibiotic resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* harbor LasA gene. *Internet Journal of Microbiology*, 16(1).
<https://doi.org/10.5580/IJMB.53869>
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 621–641.
<https://doi.org/10.1128/mubr.00027-10>
- La Rosa, R., Johansen, H. K., & Molin, S. (2018). Convergent metabolic specialization through distinct evolutionary paths in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00269-18>
- La Rosa, R., Johansen, H. K., & Molin, S. (2019). Adapting to the airways: Metabolic requirements of *Pseudomonas aeruginosa* during the infection of cystic fibrosis patients. *Metabolites*, 9(10).
<https://doi.org/10.3390/metabo9100234>
- Laborda, P., Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.010>
- Langendonk, R. F., Neill, D. R., & Fothergill, J. L. (2021). The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for current resistance-breaking therapies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.665759>
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599–606.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>

- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>
- Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Neumann Barroso, C. D., Tuon, F. F., & Faoro, H. (2022). Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>
- Lujan Roca, D. A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica latinoamericana*, 48(4), 465–474. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400009
- Ma, L. Z., Wang, D., Liu, Y., Zhang, Z., & Wozniak, D. J. (2022). Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Review of Microbiology*, 76, 413–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041320>
- MacDonald, I. A., & Kuehna, M. J. (2013). Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 2971–2981. <https://doi.org/10.1128/JB.02267-12>
- Malloy, J. L., W Veldhuizen, R. A., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J., & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288, 409–418. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00322.2004.-Pulmonary>
- Malone, J. G. (2015). Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infection and Drug Resistance*, 8, 237–247. <https://doi.org/10.2147/IDR.S68214>
- Mamat, U., Skurnik, M., & Bengoechea, J. A. (2011). Lipopolysaccharide core oligosaccharide biosynthesis and assembly. En Y. A. Knirel & M. A. Valvano (Eds.), *Bacterial Lipopolysaccharides. Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cell* (pp. 237–273). SpringerWienNewYork. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1>
- Martínez-Alcantar, L., Orozco, G., Díaz-Pérez, A. L., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H., García-Pineda, E., & Campos-García, J. (2021). Participation of acyl-coenzyme A synthetase FadD4 of

- Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in acyclic terpene/fatty acid assimilation and virulence by lipid A modification. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.785112>
- Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>
- Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–199. www.annualreviews.org
- Mishra, R., Kushveer, J. S., Khan, M. I. K., Pagal, S., Meena, C. K., Murali, A., Dhayalan, A., & Venkateswara Sarma, V. (2020). 2,4-Di-tert-butylphenol isolated from an endophytic fungus, *Daldinia eschscholtzii*, reduces virulence and Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01668>
- Morici, L. A., Carterson, A. J., Wagner, V. E., Frisk, A., Schurr, J. R., Zu Bentrup, K. H., Hassett, D. J., Iglewski, B. H., Sauer, K., & Schurr, M. J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7752–7764. <https://doi.org/10.1128/JB.01797-06>
- Morohoshi, T., Yokoyama, Y., Ouchi, M., Kato, N., & Ikeda, T. (2009). Motility and the expression of the flagellin protein FliC are negatively regulated by quorum sensing in *Edwardsiella tarda*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(4), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.04.006>
- Moskowitz, S. M., & Ernst, R. K. (2010). The role of *Pseudomonas* lipopolysaccharide in cystic fibrosis airway infection. In X. Wang & P. J. Quinn (Eds.), *Endotoxins: Structure, Function and Recognition* (Vol. 53, pp. 241–254). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2>
- Mudaliar, S. B., & Bharath Prasad, A. S. (2024). A biomedical perspective of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*: its applications and challenges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(90). <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03889-0>
- Muggeo, A., Coraux, C., & Guillard, T. (2023). Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction with human airway epithelium. *PLoS Pathogens*, 19(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1011221>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>

- Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999). α/β Hydrolase fold enzymes: the family keep growing. *Current Opinion in Structural Biologyn*, 9, 732–737.
- Nasrin, S., Hegerle, N., Sen, S., Nkeze, J., Sen, S., Permal-Booth, J., Choi, M., Sinclair, J., Tapia, M. D., Johnson, J. K., Sow, S. O., Thaden, J. T., Fowler, V. G., Krogfelt, K. A., Brauner, A., Protonotariou, E., Christaki, E., Shindo, Y., Kwa, A. L., ... Tennant, S. M. (2022). Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC Microbiology*, 22(13). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02427-4>
- NCBI. (2020, octubre 5). 7AL6: Crystal structure of the hypothetical protein PA1622 from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/7AL6>.
- Nolan, L. M., Turnbull, L., Katrib, M., Osvath, S. R., Losa, D., Lazenby, J. J., & Whitchurch, C. B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(10), 995–1003. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000956>
- O'callaghan, R., Caballero, A., Tang, A., & Bierdeman, M. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* keratitis: Protease iv and pasp as corneal virulence mediators. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090281>
- Panayidou, S., Georgiades, K., Christofi, T., Tamana, S., Promponas, V. J., & Apidianakis, Y. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66194-4>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019a). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019b). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Patel, H., Buchad, H., & Gajjar, D. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* persister cell formation upon antibiotic exposure in planktonic and biofilm state. *Scientific Reports*, 12(16151). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20323-3>
- Pavoncello, V., Barras, F., & Bouveret, E. (2022). Degradation of exogenous fatty acids in *Escherichia coli*. *Biomolecules*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/biom12081019>
- Perinbam, K., Chacko, J. V., Kannan, A., Digman, M. A., & Siryaporn, A. (2020). A shift in central metabolism accompanies virulence activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio>

- Pesttrak, M. J., Chaney, S. B., Eggleston, H. C., Dellos-Nolan, S., Dixit, S., Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., Parsek, M. R., Sen, C. K., & Wozniak, D. J. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants evade host clearance, are hyper-inflammatory, and persist in multiple host environments. *PLoS Pathogens*, *14*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006842>
- Podlesek, Z., & Žgur Bertok, D. (2020). The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance. *Frontiers in Microbiology*, *11*(1785). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785>
- Pseudomonas* Genome Database. (2023, octubre 6). *Pseudomonas Genome Database. Pseudomonas aeruginosa PAO1, PA1622*. <https://www.pseudomonas.com/feature/show?id=106014>.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(199). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B. W., Flemming, H. C., Mayer, C., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. (2022). Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Critical Reviews in Microbiology*, *48*(3), 283–302. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1962802>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Ramsey, D. M., & Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology*, *56*(2), 309–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x>
- Ranjani, J., Sivakumar, R., Gunasekaran, P., Velmurugan, G., Ramasamy, S., & Rajendhran, J. (2022). Genome-wide identification of genetic requirements of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for rat cardiomyocyte (H9C2) infection by insertion sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, *98*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105231>
- Razvi, E., Whitfield, G. B., Reichhardt, C., Dreifus, J. E., Willis, A. R., Gluscencova, O. B., Gloag, E. S., Awad, T. S., Rich, J. D., da Silva, D. P., Bond, W., Le Mauff, F., Sheppard, D. C., Hatton, B. D., Stoodley, P., Reinke, A. W., Boulianne, G. L., Wozniak, D. J., Harrison, J. J., ... Howell, P. L. (2023). Glycoside hydrolase processing of the Pel polysaccharide alters biofilm biomechanics and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *npj Biofilms and Microbiomes*, *9*(7). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00375-7>

- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C., & Freire, D. M. G. (2011). Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - A review. *Bioresource Technology*, *102*(11), 6377–6384. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.074>
- Renelli, M., Matias, V., Reggie, L. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, *150*(7), 2161–2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>
- Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Weil, P. Anthony. (2016). *Harper bioquímica ilustrada* (30a ed.). Mc Graw Hill Education.
- Rybtke, M., Hultqvist, L. D., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: Community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *Journal of Molecular Biology*, *427*(23), 3628–3645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.016>
- Saleh, M. M., Abbas, H. A., & Askoura, M. M. (2019). Repositioning secnidazole as a novel virulence factors attenuating agent in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, *127*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.042>
- Sarkar, S. (2020). Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(15), 6549–6564. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10687-9>
- Sauvage, S., Gaviard, C., Tahrioui, A., Coquet, L., Le, H., Alexandre, S., Abdelkrim, A. Ben, Bouffartigues, E., Lesouhaitier, O., & Chevalier, S. (2022). Impact of carbon source supplementations on *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00936>
- Sauvage, S., & Hardouin, J. (2020). Exoproteomics for better understanding *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Toxins*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090571>
- Schalk, I. J., & Perraud, Q. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environmental Microbiology*, *25*(4), 811–831. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16328>
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: A transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, *185*(7), 2066–2079. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2066-2079.2003>
- Seder, N., Rayyan, W. A., Al-Fawares, O., & Abu Bakar, M. H. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and antivirulence mechanisms to combat drug resistance; A Systematic Review. *Sapporo Medical Journal*, *56*(12). <https://www.researchgate.net/publication/368335975>

- Seitz, P., & Blokesch, M. (2013). Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 336–363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00353.x>
- Sendra, E., Fernández-Muñoz, A., Zamorano, L., Oliver, A., Horcajada, J. P., Juan, C., & Gómez-Zorrilla, S. (2024). Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of *Pseudomonas aeruginosa*: a microbiological and clinical perspective. *Infection*, 52(4), 1235–1268. <https://doi.org/10.1007/s15010-024-02313-x>
- Sindeldecker, D., Moore, K., Li, A., Wozniak, D. J., Anderson, M., Dusane, D. H., & Stoodley, P. (2020). Novel Aminoglycoside-Tolerant Phoenix Colony Variants of *Pseudomonas aeruginosa*. 64(9). <https://doi.org/10.1128/AAC>
- Sindeldecker, D., & Stoodley, P. (2021). The many antibiotic resistance and tolerance strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofilm*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2021.100056>
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2020). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136–146. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>
- Sperandio, V., Torres, A. G., & Kaper, J. B. (2002). Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): A novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 43(3), 809–821. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02803.x>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. En *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community* (pp. 1–11). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406. www.nature.com
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2(1), 25–32. <https://doi.org/10.7508/iem.2016.01.008>
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M., & Nikaido, H. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16220–16229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600680200>

- Sun, Z., Jiao, X., Peng, Q., Jiang, F., Huang, Y., Zhang, J., & Yao, F. (2013). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *31*(2–3), 347–354. <https://doi.org/10.1159/000343372>
- Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y., & Hancock, R. E. W. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, *191*, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>
- Thakur, P., Saini, N. K., Thakur, V. K., Gupta, V. K., Saini, R. V., & Saini, A. K. (2021). Rhamnolipid the glycolipid biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. *Microbial Cell Factories*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01497-9>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8671), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, *11*(300). <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Van Delden, C. (2004). VIRULENCE FACTORS IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA. En J. L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas Virulence and gene regulation* (Vol. 2, pp. 3–45). Plenum Publishers.
- Van Delden, C., Comte, R., & Bally, M. (2001). Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *183*(18), 5376–5384. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5376-5384.2001>
- Van Schaik, E. J., Giltner, C. L., Audette, G. F., Keizer, D. W., Bautista, D. L., Slupsky, C. M., Sykes, B. D., & Irvin, R. T. (2005). DNA binding: A novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, *187*(4), 1455–1464. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005>
- Van Tilburg Bernardes, E., Charron-Mazenod, L., Reading, D. J., Reckseidler-Zenteno, S. L., & Lewenza, S. (2017). Exopolysaccharide-repressing small molecules with antibiofilm and antivirulence activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.01997-16>
- Vicente-Altabás, M. J. (2017). *Fibrosis quística y ácidos grasos esenciales*. [Trabajo de fin de grado]. Universidad de Zaragoza.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. *Genes*, *11*(11), 1–33. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>

- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard, W. A., & Tang, Y. (2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 842–853. <https://doi.org/10.1002/bit.21462>
- Welsh, M. A., Eibergen, N. R., Moore, J. D., & Blackwell, H. E. (2015). Small molecule disruption of quorum sensing cross-regulation in *Pseudomonas aeruginosa* causes major and unexpected alterations to virulence phenotypes. *Journal of the American Chemical Society*, 137(4), 1510–1519. <https://doi.org/10.1021/ja5110798>
- WHO Bacterial Priority Pathogens. (2024). *Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization.
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., & Lewenza, S. (2016). Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 544–553. <https://doi.org/10.1128/AAC.01650-15>
- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jorgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., & Stewart, G. S. A. B. (1998). Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 163, 185–192.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. En Y.-W. Tang, D. Lui, M. Sussman, I. Proxton, & J. Schwartzman (Eds.), *Molecular Medical Microbiology* (2a ed., Vol. 1, pp. 753–767). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-1-67744-9>
- Xu, Q., Kang, D., Meyer, M. D., Pennington, C. L., Gopal, C., Schertzer, J. W., & Kirienko, N. V. (2024). Cytotoxic rhamnolipid micelles drive acute virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 92(3). <https://doi.org/10.1128/iai.00407-23>
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 103–119.
- Yuan, Y., Leeds, J. A., & Meredith, T. C. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* directly shunts β -oxidation degradation intermediates into de novo fatty acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 194(19), 5185–5196. <https://doi.org/10.1128/JB.00860-12>
- Zarzycki-Siek, J., Norris, M. H., Kang, Y., Sun, Z., Bluhm, A. P., McMillan, I. A., & Hoang, T. T. (2013). Elucidating the *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid degradation pathway: Identification of additional fatty acyl-CoA synthetase homologues. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064554>
- Ziege, R., Tsirigoni, A. M., Large, B., Serra, D. O., Blank, K. G., Hengge, R., Fratzl, P., & Bidan, C. M. (2021). Adaptation of *Escherichia coli* biofilm growth, morphology, and mechanical

properties to substrate water content. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 7(11), 5315–5325. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00927>

Roxana Yughadi Gaona García

Estudio del papel del ORF PA1622 en la virulencia de Pseudomonas aeruginosa PAO1.pdf

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:463336043

Fecha de entrega

30 may 2025, 7:32 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

30 may 2025, 7:36 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Estudio del papel del ORF PA1622 en la virulencia de Pseudomonas aeruginosa PAO1.pdf

Tamaño de archivo

2.5 MB

104 Páginas




32.467 Palabras

184.150 Caracteres

33% Overall Similarity


The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Top Sources

- 31%  Internet sources
- 22%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review

-  **Replaced Characters**
36 suspect characters on 15 pages

Letters are swapped with similar characters from another alphabet.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Estudio del papel del ORF PA1622 en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Roxana Yughadi Gaona García	1608187d@umich.mx
Director	Jesús Campos García	jesus.campos@umich.mx
Codirector	Lorena Martínez Alcantar	lorena.martinez@umich.mx
Coordinador del programa	Mauro Manuel Martínez Pacheco	mauro.martinez.pacheco@umich.mx


Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	Si	Ayuda en la traducción del resumen.
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	Si	Revisión de ortografía y errores gramaticales.
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	Si	Búsqueda de referencias específicas.
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Roxana Yughadi Gaona García 
Lugar y fecha	Morelia, Mich., a 29 de mayo del 2025