



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

ACTIVIDAD ANTIVIRULENCIA DE LOS ÁCIDOS DODECANOICO Y TETRADECANOICO: EFECTO EN EL ESTABLECIMIENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* EN UN MODELO DE INFECCIÓN CUTÁNEA EN RATONES.

MARTHA MARÍA JUÁREZ RODRÍGUEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: **Actividad antivirulencia de los ácidos dodecanoico y tetradecanoico: efecto en el establecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en un modelo de absceso en ratones.** realizada por la alumna: **Martha María Juárez Rodríguez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



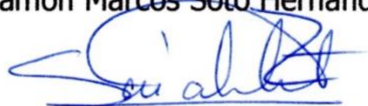
Dr. Israel Castillo Juárez

ASESOR



Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

ASESOR



Dr. José Alberto Rivera Chávez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto 2020

**ACTIVIDAD ANTIVIRULENCIA DE LOS ÁCIDOS DODECANOICO Y
TETRADECANOICO: EFECTO EN EL ESTABLECIMIENTO DE *Pseudomonas
aeruginosa* EN UN MODELO DE INFECCIÓN CUTÁNEA EN RATONES.**

**Martha María Juárez Rodríguez. M.C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

RESUMEN

El fenómeno de comunicación célula-célula por percepción de quórum (PQ) es uno de los blancos antivirulencia más estudiados. En este campo los ácidos grasos (AG) saturados (SAFA) e insaturados han tomado notoriedad por su papel como moléculas autoinductoras (familia DSF), así como antivirulencia en modelos *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue analizar la actividad antivirulencia de los SAFA: C12-18 y comparar su efecto con el autoinductor ácido *cis*-2-decenoico (CDA) en un modelo murino. Se evaluó el efecto de los SAFA: C12-18 sobre seis factores de virulencia regulados por PQ y sobre la secreción del efector ExoU del sistema de secreción tipo III (SST3). Se empleó un modelo infección cutánea en ratones para analizar el efecto de los AG en el establecimiento y daño causado por *Pseudomonas aeruginosa* PA14. El ácido dodecanoico (láurico, C12:0) y tetradecanoico (mirístico, C14:0) redujeron la producción de piocianina (30-65 %), mientras que el CDA la inhibió en un 71 % con 3 μ M. Además, se registró una fuerte actividad inhibidora del “swarming” por el ácido láurico (91 % con 1000 μ M) y el mirístico (90 % con 40 μ M), pero no sobre la formación de biopelículas. De manera contraria, el CDA redujo la biopelícula en 52 % a una concentración de 3 μ M, pero no afectó el “swarming” (Figura 3). También, los SAFA: C12-18 inhibieron la secreción de ExoU, de los cuales el ácido láurico a una concentración de 200 μ M la abatió por completo, mientras que el CDA lo hizo a 50 μ M. Contrario a lo que se esperaba, en los ensayos *in vivo* la coadministración del ácido láurico (1000 μ M) y el mirístico (200 y 1000 μ M) indujeron una mayor área necrótica, favorecieron la dispersión sistémica y redujeron la supervivencia de los animales hasta en un 50 %, mientras que el CDA a 500 μ M evitó el daño sin afectar la viabilidad de PA14. Finalmente, para determinar si el ácido láurico podía modificar la actividad antivirulencia de la curcumina (anti-PQ) y del MBX1641(anti-SST3) se realizaron isobologramas. Se

detectaron efectos horméticos beneficiosos de algunas combinaciones como MBX1641/ácido láurico; no obstante, en la evaluación *in vivo* indujeron un mayor daño. Considerando la literatura disponible sugerimos que los ácidos láurico y mirístico actúan como moléculas señal en el sensor de FA denominado PsrA, el cual regula la expresión de SST3 y PQ. De tal manera, que la presencia del CDA y de SAFA en el microambiente pueden ser determinante en el desarrollo del proceso infeccioso, así como en la eficiencia de las terapias antivirulencia.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, SAFA, SST3, PsrA, factores de señal difusible.

**ANTI-VIRULENCE ACTIVITY OF DODECANOIC AND TETRADECANOIC ACIDS:
EFFECT ON THE ESTABLISHMENT OF *Pseudomonas aeruginosa* IN A
CUTANEOUS INFECTION MODEL IN MICE.**

**Martha María Juárez Rodríguez. M.C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

ABSTRACT

Cell-cell communication by quorum sensing (QS) is one of the most studied anti-virulence targets. In this field, fatty acids (FA) and saturated fatty acids (SAFA) have gained importance, as they act as autoinducer (DSF family) and anti-virulence molecules when evaluated *in vitro*. The aim of this study was to analyze the anti-virulence activity of the SAFA: C12-18, and compare their effect with the autoinducer *cis*-2-decenoic (CDA) in a murine model. The effect of SAFA was evaluated in six virulence factors regulated by QS, and in the secretion of the effector protein ExoU by type three secretion system (T3SS). A murine cutaneous abscess model was used to analyze the effect of the FA in the establishment and damage caused by PA14 wild type. Dodecenoic (lauric, C12:0) and tetradecenoic (myristic, C14:0) acids reduced pyocyanin production (30-50 % with 200 μ M and 1000 μ M), while CDA inhibited its production by 71 % when evaluated at 3 μ M. Furthermore, a sharp inhibitory activity of swarming was registered for both, lauric (91 % with 1000 μ M) and myristic (90 % with 40 μ M) acids. Interestingly, the acids did not affect biofilm formation. Nonetheless, CDA reduced biofilm 52 % with 3 μ M, but swarming was not affected. Additionally, SAFA: C12-18 inhibited ExoU secretion, being lauric acid (200 μ M) the most active, while CDA brought it down with 50 μ M. However, *in vivo* essays with lauric and myristic acids induced a greater necrotic area, stimulated dispersion rate and reduced survival of mice up to 50 %, whereas CDA (500 μ M) avoid damage without affecting the viability of PA14 WT. Finally, to determine if lauric acid could modify the anti-virulence activity of curcumin (anti-QS) and MBX 1641 (anti-T3SS), isobolograms were performed. Until we detected beneficial hormesis effects with some combinations like MBX1641/lauric acid, *in vivo* evaluation induced a greater damage. We suggested with the literature available that lauric and myristic acids act as signal molecules with the FA sensor, called P_{sr}A, which regulates T3SS and QS expression. Then, the presence of

CDA as well as SAFA in the microenvironmental could be determinant in the development of the infective process and in the efficiency of the anti-virulence therapies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, SAFA, SST3, PsrA, diffusible signal factors.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de posgrado a nivel maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por la oportunidad de realizar mis estudios nivel maestría.

Al Dr. Israel Castillo Juárez por su apoyo y confianza incondicional, por incentivarme cada día a ser más analítica e intuitiva y por los constantes retos. Un excelente mentor en la carrera de la investigación.

Al Dr. Daniel Padilla Chacón por su apoyo en la fase experimental del proyecto.

Al Dr. Rodolfo García Contreras por su guía, orientación y sugerencias para el mejor desarrollo del presente proyecto.

Al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández y al Dr. José Alberto Rivera Chávez por su atención y sus acertadas observaciones para el desarrollo de la presente investigación

A la Dra. Bertha González Pedrajo y el M.C. Miguel Díaz Guerrero por su colaboración en el desarrollo de la etapa experimental del proyecto.

DEDICATORIA

A mis papás Martha Rodríguez y Alfredo Juárez, que me acompañan en una etapa más de tantas que me faltan, siempre pacientes y serviciales, gracias por su guía y confianza en este camino.

A Teresa García, la persona más leal que conozco, nunca podré terminar de agradecerte todo lo que has hecho por mi, confiaste en mis capacidades cuando yo misma dejé de hacerlo. Siempre supiste que podría culminar este momento y jamás me abandonaste en los momentos más cruciales. Te quiero mucho.

A mis hermanas Concepción y Celene, por ser mis confidentes en cada etapa de mi vida, siempre cuidándome y buscando mi bienestar, espero poder regresarles todo el cariño y apoyo que me han brindado.

A mis sobrinos Santi, Gabi y Miguelito que aunque los regañaba cuando estuve estresada siempre permanecieron a mi lado y me hicieron sentir mejor solo con su presencia.

A mis compañeros del grupo de investigación: Humberto Cortés y José Luis Díaz, porque además de su compañerismo y amistad, encontré en ellos unos maestros que me enseñaron lo que significan la humildad y sencillez en la carrera de la investigación.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIA	viii
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
Generalidades.....	4
Resistencia a antimicrobianos de <i>P. aeruginosa</i>	4
Establecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	6
Patogénesis de <i>P. aeruginosa</i>	9
Terapias antivirulencia.....	10
PQ en <i>P. aeruginosa</i>	10
Sistemas de secreción bacterianos	15
<i>Ácidos grasos y su papel en la virulencia</i>	19
Generalidades.....	19
Regulación de la degradación de AG en bacterias	21
Papel de los AG en el microambiente de la infección	23
AG como moléculas AI	25
SPQ basados en DSF	27
CDA producido por <i>P. aeruginosa</i>	28
AG como moléculas antivirulencia.....	30
Terapias de combinación antivirulencia y moléculas adyuvantes	31
<i>Modelos de infección en ratones y terapias antivirulencia</i>	32
Efecto del bloqueo del SPQ y SST3 en <i>P. aeruginosa</i> in vivo.....	33
<i>Mecanismos de regulación de virulencia más allá de la PQ y el SST3</i>	33
Mecanismos superiores de regulación de virulencia y su relación con los SPQ	33

PsrA un regulador transcripcional y sensor de LCFA en <i>P. aeruginosa</i>	35
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
IV. OBJETIVOS.....	39
<i>General:</i>	39
<i>Específicos:</i>	39
V. HIPÓTESIS	40
VI. JUSTIFICACIÓN	41
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	42
<i>Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias</i>	44
<i>Evaluación de factores de virulencia de P. aeruginosa</i>	46
Actividad proteolítica.....	46
Actividad hemolítica.....	48
Nado bacteriano tipo “swarming”	49
Piocianina.....	50
Biopelícula.....	50
Ensayo para evaluar el funcionamiento del SST3.....	51
<i>Modelo de infección cutánea con P. aeruginosa</i>	51
VIII. RESULTADOS	54
<i>Efecto de los SAFA en la viabilidad de P. aeruginosa</i>	54
<i>Efecto de los SAFA sobre la producción de factores de virulencia</i>	55
Actividad proteolítica y hemolítica.....	55
Producción de piocianina	56
Movilidad tipo swarming	57
Producción de biopelícula	58
<i>Efecto de los SAFA:C12-18 y CDA sobre secreción de ExoU</i>	59
<i>Ensayos in vivo</i>	60
Efecto del ácido láurico y mirístico sobre la patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i>	60
Efecto del ácido láurico y mirístico sobre la patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i>	
Δ lasR/ Δ rhIR y Δ pscC	64
El CDA reduce el daño causado por <i>P. aeruginosa in vivo</i>	67
<i>Efecto en la virulencia de SAFA en combinación con inhibidores de PQ y SST3</i>	69

Efecto de la combinación de SAFA con curcumina y MBX 1641 en el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	69
Efecto de la combinación de MBX 1641 con curcumina y SAFA en la producción de pirocianina in vitro.....	71
Efecto de la combinación de ácido láurico y MBX 1641 en un modelo de infección en ratones.....	74
IX. DISCUSIÓN	78
X. CONCLUSIONES.....	90
XI. LITERATURA CITADA	91
APENDICES.....	107
PRODUCTOS.....	114

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>P. aeruginosa</i> . Elaborado con base en el Manual de Bergey de bacteriología sistemática, (2002).	4
Cuadro 2. Infecciones asociadas a <i>P. aeruginosa</i> en diferentes grupos de estudio	8
Cuadro 3. Alteraciones provocadas por <i>P. aeruginosa</i> en sus diferentes etapas de establecimiento en el humano.....	9
Cuadro 4. Componentes y subunidades de los SPQ de <i>P. aeruginosa</i>	14
Cuadro 5. Categorías de los DSF que regulan diferentes SPQ.	27
Cuadro 6. Descripción de las etapas de la fase experimental de la investigación.	43
Cuadro 7. Tratamientos utilizados para determinar el efecto en el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PA14 WT.....	44
Cuadro 8. Tratamientos utilizados sobre la actividad proteolítica, hemolítica y producción de pirocianina de <i>P. aeruginosa</i> PA14 WT.	47
Cuadro 9. Tratamientos utilizados sobre la motilidad tipo “swarming” y la formación de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> PA14 WT.	49
Cuadro 10. Tratamientos utilizados sobre la virulencia PA14 WT en un modelo de infección cutánea.	52
Cuadro 11. Efecto de ácido láurico y ácido mirístico (μM) en el modelo de infección cutánea.....	63
Cuadro 12. Efecto de ácidos grasos (μM) en el modelo de infección cutánea con cepas mutantes.....	66
Cuadro 13. Influencia del CDA sobre la patogenicidad de PA14 en un modelo de infección cutánea.	68

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sobre la relación de crecimiento bacteriano con la PQ.....	11
Figura 2. Moléculas autoinducidas producidas por <i>P. aeruginosa</i> : A: 3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (C12-HSL). B: N-butiril-L-homoserina lactona (C4-HSL). C: 2-heptil-4-quinolona (HHQ). D: 2-heptil-4-hidroxiquinolona (PQS). E: 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS) y F: ácido <i>cis</i> -2-decenoico (CDA).	13
Figura 3. Estructura de los ocho sistemas de secreción proteica. Trastoy-Pena et al., 2019.....	15
Figura 4. Estructuras de ácidos grasos saturados SAFA: C4-C18. A: ácido butírico, B: ácido caproico, C: ácido caprílico, D: ácido caprico, E: ácido láurico, F: ácido mirístico, D: ácido palmítico, E: ácido esteárico.....	20
Figura 5. Ruta metabólica de la degradación (FAD) y biosíntesis (FAB) de AG en bacterias. Tomado y modificado de Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019.....	22
Figura 6. AG que componen la fosfatidilcolina encontrada en el surfactante pulmonar. Son et al., 2006.....	24
Figura 7. Estructuras químicas de la familia DSF. A: ácido <i>cis</i> -2-undecenoico; B: ácido <i>cis</i> -9-metil-2-decenoico; C: ácido <i>trans</i> -2-decenoico (SDSF); D: ácido <i>cis</i> -2-decenoico (CDA); E: ácido <i>cis</i> -11-metil-2-dodecenoico; F: ácido <i>cis</i> -2-dodecenoico (BDSF); G: ácido <i>cis,cis</i> -11-metil-dodeca-2,5-dienoico; H: ácido <i>cis</i> -10-metil-dodecenoico; I: ácido <i>cis</i> -2-tetradecenoico (DSFXf1); J: ácido 13-metiltetradecenoico (DSFLe3); K: ácido <i>cis</i> -2-hexadecenoico (DSFXf2); L: ácido 11-metil-dodecenoico; M: ácido 12-metil-tetradecenoico; N: ácido <i>cis</i> -12-metil-2-tridecenoico; O: ácido <i>cis</i> -12-metil-2-tetradecenoico; P: ácido <i>cis</i> -13-metil-2-tetradecenoico; Q: ácido <i>cis</i> -2 tridecenoico; R: ácido 10-metil-dodecanoico; S: ácido 3-hidroxihexadecanoico; T: ácido farnesoico. Deng, Wu, Tao, & Zhang, 2011; Zhou, Zhang, Cámara, & He, 2017; Kumar et al., 2020.....	26

Figura 8. Clasificación de genes funcionales en <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en presencia de CDA. Tomado y modificado de Rahmani-Badi et al., 2015.....	28
Figura 9. Visualización de la regulación de los FT y los genes que regula (positiva/negativamente) representados en PAGnet. Los rectángulos representan 20 FT y los círculos los blancos funcionales. Tomado y modificado de Huang et al., 2019.....	35
Figura 10. Ruta de actividad de PsrA. Líneas sólidas representan actividad de PsrA. Líneas punteadas representan actividad del complejo PsrA-LCFA.....	37
Figura 11. Efecto de los AG en el crecimiento de PA14. A) Ácido <i>cis</i> -2-decenoico (CDA), B) ácido láurico y C) ácido mirístico. En (A) también, se muestra el efecto de las mutaciones en los SPQ basado en autoinductores del tipo de las <i>N</i> -acil homoserina lactonas ($\Delta lasR/\Delta rhIR$) y SST3 ($\Delta pscC$).	54
Figura 12. Efecto de ácido láurico y mirístico sobre la actividad hemolítica (A) y proteolítica (B) de PA14. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y se muestran los errores estándar de las medias.....	56
Figura 13. Efecto de los ácidos grasos láurico, mirístico y CDA en la producción de piocianina. CDA: ácido <i>cis</i> -2-decenoico, $\Delta lasR/\Delta rhIR$: cepa mutante de SPQ. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y el error estándar de la media.	57
Figura 14. Efecto de los ácidos grasos láurico, mirístico y CDA en la motilidad tipo swarming. CDA: ácido <i>cis</i> -2-decenoico, $\Delta lasR/\Delta rhIR$: cepa mutante de SPQ, $\Delta pscC$: mutante de SST3. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y el error estándar de la media.	58
Figura 15. Efecto de los ácidos láurico y mirístico sobre la producción de biopelícula. CDA: ácido <i>cis</i> -2-decenoico, $\Delta lasR/\Delta rhIR$: cepa mutante de SPQ, $\Delta pscC$: mutante de SST3. Las letras sobre las barras indican las	

diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y el error estándar de la media.	59
Figura 16. Efecto de SAFA: C12-18 y CDA en la secreción de la proteína ExoU en PA14. SAFA 100 μ M (A) y 200 μ M (B). C , CDA a diferentes concentraciones La proteína efectora ExoU, fue detectado por un ensayo de “Western Blotting”. ExoU extraída de <i>P. aeruginosa</i> PA14 se uso como control positivo y Δ pscC es el control negativo.....	60
Figura 17. Áreas de inoculación después de la inyección intramuscular del ácido láurico (A) y mirístico (B) a una concentración de 200 μ M sin <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	62
Figura 18. Imágenes representativas del efecto del ácido láurico, ácido mirístico y CDA en un modelo de infección cutánea. <i>P. aeruginosa</i> PA14 y cepas mutantes de SPQ (Δ lasR/ Δ rhIR) y de SST3 (Δ pscC).....	68
Figura 19. Efecto en el crecimiento de las distintas combinaciones con inhibidores de virulencia y SAFA. A) ácido láurico con curcumina, B) ácido mirístico con curcumina, C) ácido láurico con MBX 1641 y D) ácido mirístico con MBX1641.....	70
Figura 20. Efecto de MBX 1641 y curcumina en la producción de piocianina de PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX1641 (A), curcumina (B), la actividad de las distintas combinaciones (C) y diagrama de barras que ejemplifica combinaciones con mayor sinergia (D). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$).	72
Figura 21. Efecto de MBX 1641 y ácido mirístico en la producción de piocianina de <i>P. aeruginosa</i> PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (A), ácido mirístico (B), la actividad de las distintas combinaciones (C) y diagrama de barras que ejemplifica combinaciones con mayor sinergia (D). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$).....	73

- Figura 22.** Efecto de MBX 1641 y ácido láurico en la producción de pirocianina de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (**A**), ácido láurico (**B**), la actividad de las distintas combinaciones (**C**) y diagrama de barras que ejemplifica combinaciones con mayor sinergia (**D**). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$). 74
- Figura 23.** Efecto de ácido láurico (200 μM) y MBX 1641 (20 μM) de forma individual y en combinación sobre un modelo con ratones de la cepa CD1. A: Efecto visual registrado en el día 1 y día 3, B: Gráfica Kaplan-Meier de la supervivencia de cada tratamiento (** $\alpha = 0.01$). 76
- Figura 24.** Efecto de ácido láurico (200 μM) y MBX1641 (20 μM) de forma individual y en combinación sobre un modelo de infección cutánea con ratones de la cepa CD1 sobre las variables de estudio. **A:** área de absceso, **B:** área necrótica, **C:** $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ en el área de lesión para evaluar el establecimiento de *P. aeruginosa* PA14, **D:** $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ en el área de lesión para evaluar la dispersión de *P. aeruginosa* PA14. (U Mann-Whitney, * $\alpha < 0.05$, ** $\alpha < 0.01$). 77
- Figura 25.** Modelo propuesto del papel de los SAFA: C12/C14 y PsrA en un nivel de regulación superior de la patogenicidad en *P. aeruginosa*. **A:** En la fase de crecimiento logarítmica tardía PsrA se une a los promotores de *fadBA5* y *PA056* reprimiendo la β -oxidación por la vía *fadBA5* (Kang et al., 2008; Kojic, Jovcic, Vindigni, Odreman, & Venturi, 2005; Son et al., 2007) estimulando la síntesis de PQS al bloquear la expresión de FadE (Wells et al., 2017) y favoreciendo la desregulación de la reacción inmune del huésped (Lin, Cheng, Wang, & Shen, 2018). Del mismo modo PsrA mantiene una autorregulación negativa sobre su región promotora *psrA* (Kojic et al., 2002), así como regula positivamente la transcripción de *rpoS* el cual evita la activación temprana de Rhl y Las (Pearson, 2002; Schuster et al., 2004). En este escenario PsrA mantiene una regulación positiva del operón *exsCEBA* por el pegado a la región promotora *exsC* que transcribe los genes para la formación del SST3 (Kang et al., 2009)

y posiblemente la secreción de ExoU, una lipasa que favorecerá el aumento de la concentración de ácido láurico y mirístico en el microambiente al liberarlos de los lípidos saponificables del hospedero (Foulkes et al., 2019). **B** sugerimos que un aumento en la concentración de ácido láurico y mirístico (moléculas señal) en la fase estacionaria favorecería la formación del complejo PsrA-LCFA que quita la represión de las regiones promotoras *fadBA5* (Kang et al., 2009, 2008), *PA056* (Wells et al., 2017), así como en *rpoS* (Kang et al., 2009), activando la β -oxidación por la vía *fadBA5* y la producción de factores de virulencia regulados por los sistemas Rhl y Las (Pearson, 2002; Schuster et al., 2004). Mientras que la formación del complejo evita la unión con la región promotora de *exsCEBA* deteniendo la formación del SST3 (Kang et al., 2009). 86

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de terapias antivirulencia surge como una estrategia viable en el control de las infecciones bacterianas y la prevención de la generación de resistencia a los antibióticos, que parte del principio de erradicar los elementos relacionados con la virulencia de la bacteria, sin afectar su viabilidad (Nunes-Silva et al., 2016). La inhibición de la percepción de quórum (PQ) representa uno de los principales blancos ya que es un regulador global de la virulencia (Nunes-Silva et al., 2016) y consiste en un mecanismo de comunicación química de célula a célula en respuesta a una alta densidad de población a través de moléculas conocidas como autoinductores (AI) (Defoird 2018; Rémy et al 2018).

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno que coloniza de manera crónica pacientes con el sistema inmune debilitado, sobre todo aquellos con fibrosis quística (FQ) causando brotes nosocomiales difíciles de controlar debido a la presencia de cepas multi-resistentes a los antibióticos (Moradali et al. 2017). Esta bacteria se caracteriza por tener cuatro sistemas de PQ (SPQ) regulados de forma jerárquica, Las y Rhl que emplean AIs de la clase de las lactonas acil-homoserina, Pqs que utiliza 2-alkil-4-quinolonas e IQS que utiliza 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (Moradali et al. 2017). Estos sistemas controlan la liberación de factores de virulencia, que sirven para la adquisición de nutrientes y dispersión de la bacteria. Además, cuenta con sistemas de secreción proteico que le permiten evadir al sistema inmune, producir daño en el tejido e invadir las células hospederas (Trastoy-Pena et al., 2019). Los sistemas de secreción que inyectan toxinas en el citosol de las células epiteliales del hospedero son el tipo 6 (SST6) (Jiang, Waterfield, Yang, Yang, & Jin, 2014) y el tipo 3 (SST3) (ExoY, ExoT, ExoS y ExoU), siendo este último propuesto como un buen blanco anti-virulencia (Fasciano, Shaban, & Mecsas, 2019). Cabe señalar que todos estos sistemas se regulan de manera ordenada y eficiente en una red compleja y jerarquizada en el que también participan distintos factores de transcripción como PsrA (Kang et al., 2009), ExsA, Rsm y factores sigma como RpoH, RpoN y RpoS entre otros (Huang et al., 2019).

Recientemente se ha descrito la regulación de la virulencia de *P. aeruginosa* a partir de un AI de tipo ácido graso (AG), el ácido *cis*-2-decenoico (CDA) perteneciente a

la familia DSF (factores de señales difusibles) (David & Marques, 2009). El CDA es sintetizado a partir de una putativa enoil-coenzima A hidratasa/isomerasa denominada Dspl (dispersor inducer) (Davies & Marques, 2009). Aunque no se ha identificado el receptor para el CDA, se ha demostrado regula positivamente la producción de pioverdina y el “swarming”, además de inducir dispersión de las biopelículas y promover la infección sistémica en un modelo infección pulmonar en ratones (Liu et al., 2018).

Por otra parte, la evaluación de los SPQ en monocultivos *in vitro* no analiza el efecto de elementos del hospedero (microambientes) y no considera la naturaleza polimicrobiana de la infección (Díaz-Pascual, Ortíz-Severín, Varas, Allende, & Chávez, 2017; Welsh & Blackwell, 2016). En algunos microambientes como es el tejido pulmonar de pacientes con FQ, se registra la presencia de ácidos grasos saturados (SAFA) obtenidos a partir de la fosfatidilcolina presente en el surfactante pulmonar degradado por lipasas (Son et al., 2007) y DSF producidos por bacterias asociadas a la infección como son *Burkholderia cenocepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia* las cuales alteran la virulencia de *P. aeruginosa* a través del sensor quinasa PA1396 (Boon et al., 2008; Deng et al., 2013).

Los ácidos grasos (AG) son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza principalmente con funciones estructurales, como fuente de carbono (Cortes-López et al., 2020) y propiedades bactericidas por mencionar algunas (Kumar et al., 2020). No obstante, a concentraciones subletales algunos actúan como moléculas señal en la regulación de la virulencia bacteriana (Cortes-López et al., 2020, Kumar et al., 2020). Se reporta que SAFA: C12-18 reducen algunos factores de virulencia de *Proteus mirabilis* (Liaw, Lai & Wang, 2004), *Chromobacterium violaceum* (Pérez-López et al., 2017), *Vibrio sp* (Windmer et al., 2007; Santhakumari et al., 2016, 2017) y *P. aeruginosa* (Inoue et al., 2008; Abd-Alla & Bashandy, 2012). Aunque no se conoce el mecanismo de acción exacto, se sugiere interfieren en los sistemas PQ.

De tal manera, aún no es claro el papel de los AG (señal ambiental) en esta compleja red de regulación de virulencia, el efecto sobre el daño y su efecto en la eficacia de las terapias antivirulencia. En este sentido, la siguiente investigación tuvo como objetivo analizar las propiedades antivirulencia de los SAFA: C12-18 sobre factores

regulados por PQ y el SST3 de *P. aeruginosa*, así como evaluar su efecto en el establecimiento y dispersión en un modelo de infección cutánea.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Pseudomonas aeruginosa

Generalidades

P. aeruginosa es una bacteria patógena bacilar Gram negativa perteneciente a la familia Pseudomonadaceae (Cuadro 1) que se desarrolla de forma óptima a 37 °C (tolera hasta los 50 °C) y puede crecer en fuentes mínimas de carbono. Crece de forma aeróbica y anaeróbica dependiendo de la disponibilidad de nitrato en el ambiente y forma especies reactivas de oxígeno en pacientes con FQ (Planet, 2017).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *P. aeruginosa*. Elaborado con base en el Manual de Bergey de bacteriología sistemática, (2002).

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria γ-Proteobacteria
Clase	Zynobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Resistencia a antimicrobianos de P. aeruginosa

Las infecciones provocadas por bacterias patógenas lideran la causa de muerte prematura a nivel mundial (Kirienko, Rahme, & Cho, 2019). Aunque el descubrimiento de fármacos antimicrobianos revolucionó el cuidado de la salud, no tardaron en desarrollarse cepas que presentaron una plétora de mecanismos de resistencia, con lo que muchos se volvieron poco efectivos (Opoku-Temeng et al., 2018).

Los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) son conocidos por causar las infecciones nosocomiales y representan una gran amenaza por su capacidad para resistir a la mayoría de los antimicrobianos disponibles (Pletzer, Mansour, Wuerth, Rahanjam, & Hancock, 2017; Kirienko et al., 2019).

P. aeruginosa es considerado un patógeno multiresistente a antimicrobianos y declarado *Prioridad Crítica* por la Organización Mundial de la Salud (OMS), por lo que se requiere urgentemente el desarrollo de fármacos para su tratamiento. Se ha identificado que presenta tres tipos de resistencia (Moradali, Ghods, & Rehm, 2017; Schütz & Empting, 2018):

- Resistencia intrínseca: se refiere a la expresión de genes que dan como resultado mecanismos de resistencia inherentes a la bacteria. Un ejemplo de ellos son las bombas de flujo localizada entre la membrana interna y externa que se encargan de expulsar un amplio rango de xenobióticos (cefalosporinas, carbapenémicos, fluoroquinolonas y los aminoglicósidos), lo que limita que lleguen a sus blancos intracelulares (Moradali et al., 2017; Schütz & Empting, 2018).
- Resistencia adquirida: se desarrolla como resultado de mutaciones espontáneas en la codificación de genes relacionados con la resistencia a antibióticos, sobre todo por transferencia de plásmidos. Este tipo de resistencia puede ser transferida a su descendencia (Moradali et al., 2017; Wu et al., 2014).
- Resistencia adaptativa: Es un tipo de resistencia inestable y transitoria, ya que es inducida en la presencia de antibióticos específicos y otros estresores ambientales (Moradali et al., 2017). Depende de alteraciones inducidas en la expresión de genes, producción de proteínas o alteraciones en los blancos de los antibióticos y es reversible si el estresor ambiental es eliminado (Moradali et al., 2017).

De las tres resistencias citadas, tanto la adquirida como la adaptativa son tópicos centrales que se deben tomar en cuenta en el tratamiento de *P. aeruginosa*. En este sentido, el uso de moléculas antivirulencia representa una alternativa, ya que se ha

observado que disminuyen la resistencia a antibióticos adquirida sin afectar la viabilidad celular y no imponen presión selectiva sobre la bacteria (Kirienko et al., 2019).

Establecimiento de P. aeruginosa

El establecimiento de la bacteria en el humano inicia con la adhesión a las células epiteliales que es un paso crítico para el proceso infeccioso (Wu et al., 2014):

- Adhesión por pili: están compuestos por proteínas y llevan a cabo múltiples funciones, como la motilidad, formación de biopelículas, de microcolonias, transferencia de ADN y adhesión, entre otras. Cerca del 90 % de la adhesión de *P. aeruginosa* es debido a la presencia de pili, el cual contiene alginato en sus extremos que interactúa con los glicoesfingolípidos de las células epiteliales del hospedero, sobre todo de aquellos que padecen FQ (Martínez-Antonio y Soberón-Chávez, 2002; Wu et al., 2014).
- Adhesión por flagelos: *P. aeruginosa* contiene un flagelo compuesto por flagelinas llamadas FliC, que son proteínas globulares en forma cilíndrica. Las funciones que se le aluden son la adhesión, motilidad y formación de biopelículas. Los flagelos se adhieren a las células epiteliales a través de mucinas, que son proteínas glucosiladas encargadas de secretar geles para proteger al epitelio y son producidas en forma abundante por pacientes con FQ (Wu et al., 2014).
- Adhesión por oligosacáridos centrales de lipopolisacáridos: Se presenta cuando los oligosacáridos ramificados producidos por la bacteria se unen al gen *CFTR*, que se encarga de facilitar el transporte de iones cloruro, y que se encuentra en las glándulas sudoríparas, pancreáticas, intestinales, renales y pulmonares. En pacientes con FQ el gen *CFTR* puede presentar una mutación que ocasiona que aumente la concentración de cloruro y sodio en las secreciones corporales (Orozco et al., 2006; Wu et al., 2014).

Las moléculas necesarias para el establecimiento de *P. aeruginosa* en las células epiteliales, específicamente el alginato, aumentan en pacientes con FQ debido a que hay

una sobreproducción de mucina por la alteración genética de *CFTR* (Panayidou y Apidianakis, 2017). El alginato está relacionado con la producción de biopelículas, además que induce la expresión de otros factores de virulencia como los sistemas de secreción tipo III (SST3) (Wu et al., 2014; Planet, 2017).

Una vez que la bacteria se establece en las células epiteliales empieza a secretar proteasas, citotoxinas y exotoxinas causando estrés oxidativo en la célula y provocando apoptosis (Planet, 2017). Estos efectos son significativos sobre todo cuando se llega a un umbral de densidad bacteriana, la cual activa su sistema de percepción de quórum (SPQ).

La interacción simbiótica que se da entre el ser humano y *P. aeruginosa* ha sido ampliamente estudiada. De acuerdo a Planet, 2017 se desarrolla en dos grupos de estudio denominados “hospederos normales” y “hospederos especiales” (Cuadro 2).

Uno de los principales requisitos para su establecimiento es la presencia de humedad con la que se desarrollan infecciones menores (Planet, 2017). El problema se agrava cuando los hospederos presentan un sistema inmune debilitado, como los pacientes en proceso de quimioterapia, con pie diabético, con quemaduras de tercer grado y principalmente aquellos con FQ, debido a la concentración de mucosa excesiva en sus pulmones (Planet, 2017; Schütz & Empting, 2018; Wu et al., 2014).

Cuadro 2. Infecciones asociadas a *P. aeruginosa* en diferentes grupos de estudio

		Grupos de estudio		
		Hospederos normales	Hospederos especiales	
Manifestaciones clínicas	Comunidad adquirida	Infección ocular: asociado con personas que usan lentes de contacto.	VIH	Infección de <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con neumonía.
		Otitis externa: asociada con la presencia de excesiva humedad.		Heridas por quemaduras contaminadas por desbridamiento (aseo quirúrgico).
		Endocarditis: asociado al abuso de drogas intravenosas		FQ: provoca inflamación crónica dominada por los neutrófilos.
		Infección ligera en tejido por heridas con objetos punzantes en la piel		
		Foliculitis: inmersión en bañeras o albercas contaminadas.		
	Nosocomiales	Infección en el tracto respiratorio: asociado a pacientes con neumonía, puede haber complicaciones por la contaminación de equipo médico.	Disfunción neutrofilia	Septicemia (complicación en quimioterapias): se da por alteración en los neutrófilos.
		Infección en el tracto urinario: asociado al uso de catéteres urinarios u otro objeto ajeno al cuerpo que se encuentren contaminados.		Éctimia gangrenosa (asociada con septicemia): lesión del área, donde se observa el desarrollo de necrosis en la misma.
		Infección quirúrgica derivado de quemaduras: procedimientos quirúrgicos con material contaminado.		Infección en el sistema nervioso central: provocada por bacteriemia o contaminación secundaria.

Tomado y modificado de Liu, Chan, & Chang, 2015; Planet, 2017.

Patogénesis de P. aeruginosa

Las bacterias patógenas han desarrollado diferentes estrategias de colonización que involucran mecanismos relacionados con la adhesión, los SPQ y los sistemas de secreción proteica, especialmente el SST3 (Cuadro 3) (Lombardi et al., 2019).

Cuadro 3. Alteraciones provocadas por *P. aeruginosa* en sus diferentes etapas de establecimiento en el humano.

	Componente patógeno	Componente hospedero	Efectos
Adhesión	Alginato	Mucinas	Establecimiento y resistencia antibióticos.
	Flagelo	Mucinas	Activa la inflamación del tejido del epitelio.
SPQ	Elastasa	Elastina	Destruye matriz extracelular del tejido conjuntivo.
	Proteasa	Membrana citoplasmática	Destrucción del tejido.
	Piocianina	Membrana citoplasmática	Estrés oxidativo.
	Pioverdina	Iones Fe ⁺⁺ hemoglobina	Fe ⁺⁺ para metabolismo bacteriano.
	Autoinductor (C12-HSL)	Membrana citoplasmática Macrófagos Neutrófilos	Induce apoptosis, despolarización de la membrana y desprotección del epitelio.
	Exotoxina A	Citoplasma del hospedero	Activación en presencia de hierro, perturba el metabolismo del hospedero, provocando apoptosis.
	Fosfolipasa C	Tejido	Media el daño tisular y estimula la inflamación. Promueve actividad hemolítica.
SST3	Efectores (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY)	Sistema inmune	Alteran el movimiento celular, inhibiendo la producción de

	Componente patógeno	Componente hospedero	Efectos
			citoquinas y causando muerte celular.

Tomado y modificado de (Martínez-Antonio y Soberón-Chávez, 2002; Michalska & Wolf, 2015; Panayidou & Apidianakis, 2017; Planet, 2017).

Terapias antivirulencia

Ante la problemática que representan las infecciones bacterianas con cepas multiresistentes, el desarrollo de terapias antivirulencia representan una opción viable para su control mediante un mecanismo de acción que se sugiere no genera resistencia o al menos reduce su velocidad de aparición (Nunes-Silva, Zimmer, Macedo, & Trentin, 2016). Estas terapias tienen como objetivo abatir los factores de virulencia que permiten la colonización, invasión y persistencia de las bacterias, pero sin afectar su viabilidad directamente (Nunes-Silva et al., 2016; Fleitas-Martínez, Henrique-Cardoso, Meira-Ribeiro, & Luiz-Franco, 2019).

Se han propuesto distintos blancos para el desarrollo de terapias antivirulencia, como son las biopelículas, la motilidad bacteriana, la neutralización de toxinas, los microdominios de membrana, los sistemas de secreción proteica entre otros (Fleitas-Martínez et al., 2019). Sin embargo, la inhibición de los SPQ ha sido uno de los más investigados en los últimos años, debido a que es un regulador central de diversos factores de virulencia (Nunes-Silva et al., 2016; Fleitas-Martínez et al., 2019).

PQ en P. aeruginosa

La PQ es un mecanismo de regulación molecular por el cual se establece la comunicación entre bacterias en respuesta a una alta densidad de población y el ambiente que lo rodea (Waters & Bassler, 2005; Rémy et al., 2018). Controla procesos específicos mediante la coordinación en la expresión de genes y en presencia de moléculas pequeñas conocidas como autoinductores (AI) que son producidas y censadas por la comunidades bacterianas (Defoirdt, 2018; McLean, Pierson, & Fuqua,

2004; Rémy et al., 2018; Schütz & Empting, 2018). La PQ permite a las bacterias exhibir comportamientos multicelulares o colectivos, que ayudan a la comunidad realizar procesos que son altamente costosos y no efectivos en bajas densidades celulares, como es la producción de factores de virulencia (Abd-Alla & Bashandy, 2012; Rémy et al., 2018; Schütz & Empting, 2018).

Un SPQ consiste en tres elementos clave para su funcionamiento, que son el AI o molécula señal, la proteína que sintetiza el AI (sintasa) y la proteína receptora del AI (Waters & Bassler, 2005). De acuerdo con las etapas de crecimiento bacteriano, el AI producido por la proteína sintasa se propaga libremente a través de las membranas bacterianas al inicio de la fase logarítmica (Figura 1), por lo cual se encuentra en la misma concentración tanto dentro como fuera de la célula. Su concentración incrementa conforme aumenta la densidad celular que alcanza un punto máximo al final de la etapa logarítmica e inicio de la etapa estacionaria. Cuando el AI alcanza la concentración umbral se une a la proteína receptora (que al igual que el AI, se ha estado produciendo desde el inicio de la fase logarítmica) y activa los genes que permiten la liberación de los factores de virulencia (Waters & Bassler, 2005).

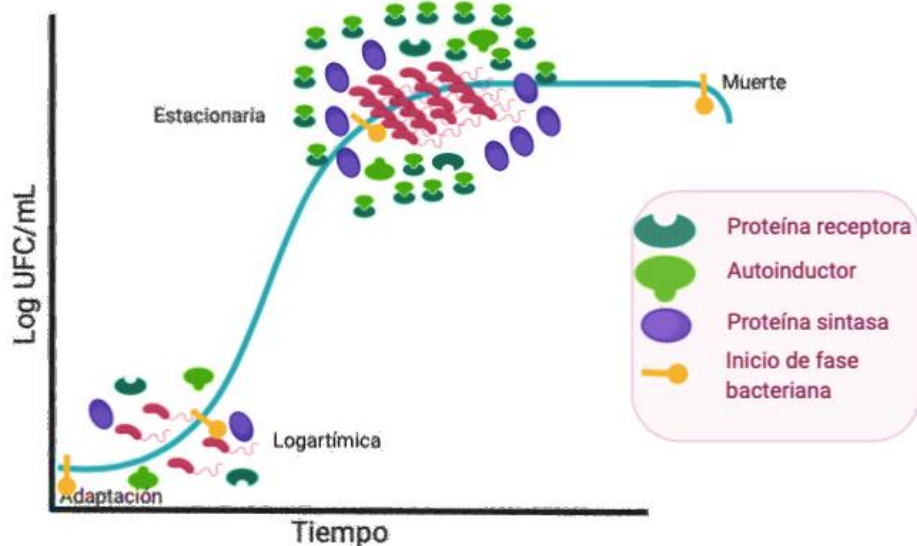


Figura 1. Esquema sobre la relación de crecimiento bacteriano con la PQ.

En *P. aeruginosa* hasta el momento se han descrito cuatro SPQ regulados en orden jerárquico, nombrados de acuerdo a los factores de virulencia que fueron

identificados inicialmente en cada uno de ellos (Castillo-Juárez et al., 2015; Wu et al., 2014).

Sistemas las y rhl

El sistema LasI/LasR es expresado por los genes *lasI* que activan la producción de la proteína sintasa LasI, la cual se encarga de producir el AI lactona 3-oxododecanoil)-L-homoserina (C12-HSL). LasR, proteína receptora producida por la activación del gen *lasR*, se une a C12-HSL (Figura 2A), lo cual da como resultado la activación de los genes regulados por este sistema que son los encargados de la liberación de los factores de virulencia mencionados en el Cuadro 4. Además de dichos factores, se activa el gen *lasI* dando una retroalimentación positiva y directamente aumentando la transcripción de los genes *rhlI* y *rhlR*, lo cual da paso a la activación del segundo sistema RhlI/RhIR, donde se produce el AI lactona N-butilil-L-homoserina (C4-HSL) (Figura 2B) y al igual que en el sistema LasI/LasR se da una retroalimentación positiva (Castillo-Juárez et al., 2015; Lee et al., 2013; Lee & Zhang, 2015; Schütz & Empting, 2018; Wu et al., 2014).

Sistema basado en quinolonas

El tercer sistema se denomina PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) y es controlado positivamente por el sistema LasI/LasR por la sobreexpresión de los genes *pqsH* y *pqsR* (aunque el sistema RhlI/RhIR regula negativamente el operón *pqsABCD* y *pqsR*) y alcanza su máxima producción en la fase logarítmica tardía. Este sistema es mediado por AI del tipo de las alquilquinolonas, como la 2-heptil-4-hidroxiquinolona (PQS) y la 2-heptil-4-quinolona (HHQ) (Figura 2C y D). PQS es sintetizada ante la presencia de dos proteínas claves, PqsA (activada por el operón *pqsABCD*) que produce HHQ a partir de antrniloil-CoA, la cual posteriormente es transformada a PQS por la proteína PqsH (activada por el gen *pqsH*). Este sistema mantiene la particularidad de tener un funcionamiento tipo cascada, puesto que las alquilquinolonas se enlazan con la proteína PqsR (proteína receptora), producida por la activación del gen *pqsR*, también conocido como regulador del factor de virulencia múltiple. Dicho complejo activa el operon *pqsABCDE*, el cual produce las enzimas para obtener las alquilquinolonas y la

proteína PqsE, importante en la producción de piocianina (Liu et al., 2018; Schütz y Empting, 2018; Wells, Palethorpe, & Pesci, 2017; Wu et al., 2014).

Sistema IQS

El sistema IQS es inducido por la ausencia de fosfato en el ambiente y controlado por el sistema LasI/LasR mediante la activación del operón *ambABCDE*, produciendo el AI IQS (2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído) (Figura 2E) y uniéndose a la proteína receptora IqsR (Liu et al., 2015). Se ha demostrado que la expresión del sistema IQS toma parcialmente funciones del LasI/LasR, ya que puede aumentar la regulación en la expresión de los sistemas RhII/RhIR y PQS, además de controlar la expresión de un amplio conjunto de genes relacionados con los SPQ y asociados a virulencia (Lee et al., 2013; Lee & Zhang, 2015; Liu et al., 2015).

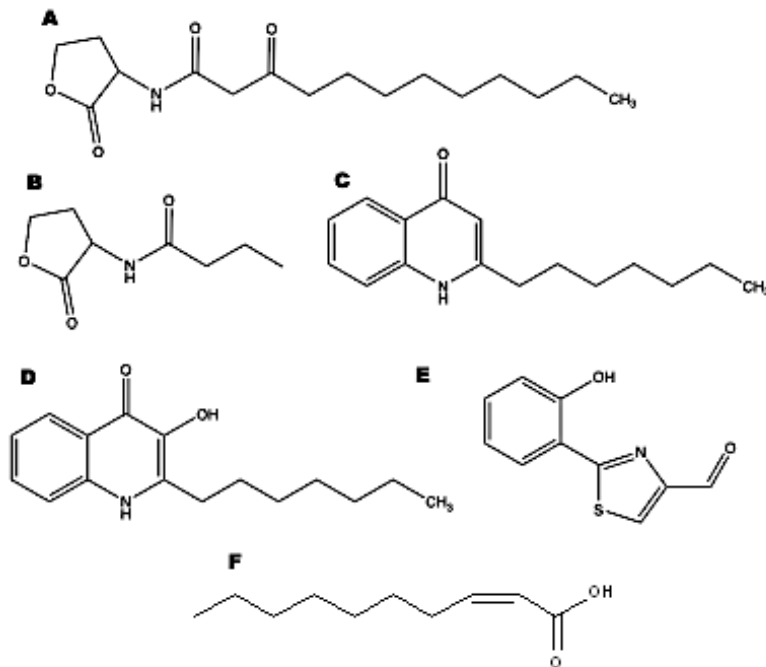


Figura 2. Moléculas autoinducidas producidas por *P. aeruginosa*: **A:** 3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (C12-HSL). **B:** N-butiril-L-homoserina lactona (C4-HSL). **C:** 2-

heptil-4-quinolona (HHQ). **D:** 2-heptil-4-hidroxiquinolona (PQS). **E:** 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS) y **F:** ácido *cis*-2-decenoico (CDA).

Factores de virulencia regulados por PQ en P. aeruginosa

Varias toxinas y enzimas son secretadas a través de los SPQ entre los que se resaltan, la exotoxina A, fosfolipasa C, elastasa, proteasas alcalinas, la producción de biopelículas entre otros que contribuyen a la virulencia de la bacteria (Aiello et al., 2010; Bowlin et al., 2014; Planet, 2017; Wu et al., 2014).

Cuadro 4. Componentes y subunidades de los SPQ de *P. aeruginosa*.

Circuito/ Sistema	Proteína sintasa	Factor transcripcional	Molécula señal	Factores de virulencia	Ref
Las	LasI	LasR	C12-HSL	Elastasa LasA Elastasa LasB Exotoxina A Proteasa alcalina Swarming Biopelícula	Castillo- Juárez et al. 2015 Malgaon kar & Nair, 2019
Rhl	RhII	RhIR	C4-HSL	Ramnolípidos Elastasa LasB Piocianina Swarming Cianuro de hidrógeno	Castillo- Juárez et al. 2015 Malgaon kar & Nair, 2019
PQS	PqsABCDE PqsH	PqsR	Pqs	Elastasa Lectina LecA Piocianina Pioverdina Pioquelina Lectina LecA	Castillo- Juárez et al. 2015 Malgaon kar & Nair, 2019

Circuito/ Sistema	Proteína sintasa	Factor transcripcional	Molécula señal	Factores de virulencia	Ref
				Cianuro de hidrógeno	
IQS	AmbBCDE	IqsR	Iqs	rhl, PQS	Lee et al. 2013; Lee y Zhang, 2015

Sistemas de secreción bacterianos

Uno de los mecanismos de *P. aeruginosa* para establecerse en su hospedero son los sistemas de secreción proteica, los cuales emiten principalmente toxinas (llamados efectores) hacia el ambiente o el citosol de las células hospederas, permitiendo a la bacteria atacar otros organismos, evadiendo su sistema inmune y dañando el tejido del hospedero (Anantharajah et al., 2016; Nilles et al., 2017).

Hasta el momento, se han descrito ocho tipos de sistemas de secreción en bacterias patógenas (Figura 3), de los cuales en *P. aeruginosa* se han encontrado cinco, siendo el SST3 uno de los más importantes, debido a la manipulación que realiza sobre las células eucariotas (Nilles et al., 2017; Trastoy-Pena et al., 2019).

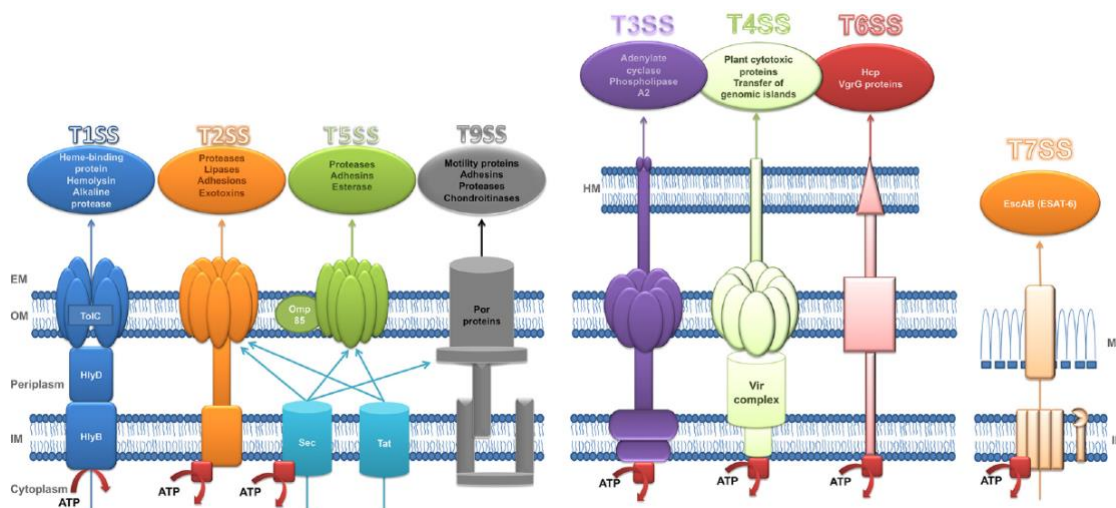


Figura 3. Estructura de los ocho sistemas de secreción proteica. Trastoy-Pena et al., 2019.

El SST3 es generalmente asociado con infecciones invasivas agudas, sepsis neumonía y enfermedades oculares (Berube et al., 2017). Una vez activado por el contacto con células eucariotas vía pili o flagelos, el SST3 inyecta toxinas a través de una aguja nanoproteica dentro del citoplasma de la célula hospedera (Anantharajah et al., 2016). Las toxinas interfieren con la señal de transducción, causando citotoxicidad en las células del sistema inmune (neutrófilos y macrófagos) para evitar la fagocitosis, permitir la persistencia y la diseminación de la bacteria (Anantharajah et al., 2016; Berube et al., 2017; Filloux, 2011).

Estructura del SST3

Los SST3 se encuentran altamente conservados en bacterias Gram negativas y evolucionaron a partir del flagelo (Cornelis, 2006 de Anantharajah et al., 2016). Comprende 43 genes, los cuales codifican y regulan 25 diferentes proteínas que componen una estructura nanoproteica ensamblada en tres partes principales. El *cuero basal*, que es un conjunto de anillos compuestos por la lipoproteína PscJ en el anillo de la membrana interna y la secretina PscC en el anillo de la membrana externa. La *aguja* compuesta por la proteína PscF con subunidades repetidas, a través de la cual los efectores serán transportados. Finalmente, el *translocón* hecho por una proteína hidrofílica (PcrV) que sirve como estructura para formar el poro de translocación y por dos proteínas hidrofóbicas PopB, PopD, las cuales se insertan en la membrana celular del hospedero para translocar los efectores al citosol de la célula hospedera (Anantharajah et al., 2016; Berube et al., 2017; Trastoy-Pena et al., 2019).

Efectores del SST3 de P. aeruginosa

Las proteínas efectoras tienen la capacidad de mediar diversas funciones como la alimentación, alteraciones en la respuesta del sistema inmune o la prevención de fagocitosis (Nilles et al., 2017). Los efectores descritos principalmente en *P. aeruginosa* son ExoS, ExoT, ExoU y ExoY, los cuales tienen la capacidad de prevenir la fagocitosis, alterar la dispersión celular, inhibir la liberación de citocinas y causar la muerte celular

(Hauser, 2009 en Nilles et al., 2017; Berube et al., 2017; Nilles et al., 2017; Trastoy-Pena et al., 2019).

Los efectores ExoS y ExoT son proteínas bifuncionales que trabajan en la cohesión e interrupción del citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis, migración y división celular y causan apoptosis (Anantharajah et al., 2016). Una vez dentro de la célula hospedera, ExoS se queda transitoriamente en la membrana del plasma y después se dispersa en las membrana de los organelos internos, como los endosomas o el retículo endoplásmico (Anantharajah et al., 2016; Johnson, 2017).

El efector ExoU es el más virulento entre los efectores inyectados, tiene una actividad de fosfolipasa A₂, pero solo después de interactuar con la superóxido dismutasa de la célula del hospedero y se localiza en la membrana citoplasmática (Anantharajah et al., 2016; Johnson, 2017). De acuerdo con Berube et al. (2017), ExoU es un efector clave para la formación de absceso en un modelo animal, mientras que ExoS y ExoT no son requeridos. ExoU causa daño irreversible a la membrana celular, así como una muerte necrótica rápida de las células epiteliales, macrófagos y neutrófilos (Berube et al., 2017). También, es considerado la mayor citotoxina secretada vía SST3 y está asociada con lesiones agudas de pulmón, sepsis y mortalidad (Anantharajah et al., 2016).

El efector ExoY es una adenilciclase con preferencia en la producción de cAMP, cGMP y cUMP, su efecto es potencializado por un cofactor eucariótico aún desconocido (Anantharajah et al., 2016). ExoY causa rompimiento del citoesqueleto de actina, necrosis celular y alteración de las células endoteliales de barrera integradas seguida de lesión en pulmón (Anantharajah et al., 2016; Johnson, 2017).

Regulación de la expresión del SST3

La expresión del SST3 tiene como eje al regulador central ExsA, el cual es activado indirectamente en medios con limitaciones de calcio, en respuesta al contacto con la célula hospedera o en presencia de suero (Brutinel et al., 2008). ExsA despliega un efecto en cascada al interactuar con proteínas clave como son ExsD, ExsC y ExsE (Anantharajah et al., 2016; Brutinel, Vakulskas, Brady, & Yahr, 2008; Brutinel, Vakulskas,

& Yahr, 2010; Shen, Filopon, Kuhn, Polack, & Toussaint, 2006). ExsD es una proteína “anti-activadora” que inhibe la transcripción de ExsA (Brutinel et al., 2008). ExcC es una proteína que al enlazarse con ExsD, inhibe su actividad sobre ExsA, mientras que ExsE es una proteína que se enlaza con ExsC e inhibe su actividad sobre ExsD (Brutinel et al., 2008, 2010).

En condiciones ideales, se realizan los complejos ExsE-ExsC y ExsD-ExsA, con lo que ExsA se encuentra inactiva (Brutinel et al., 2010). Sin embargo, cuando las condiciones de crecimiento de *P. aeruginosa* se ven limitadas por ambientes con bajas concentraciones de Ca^{2+} o en respuesta al contacto con la célula hospedera, surge en respuesta la translocación de ExsE, con lo que queda liberado ExsC que se enlaza con ExsD y por ende el resultado es la liberación de ExsA que activa el SST3 (Brutinel et al., 2008, 2010).

De acuerdo con Anantharajah et al. (2016), existen otras vías de regulación global alternas que controlan la expresión de ExsA. El complejo cAMP/Vfr codifica el adenilato ciclasas CyaA y CyaB, útiles en la activación de la molécula cAMP especialmente CyaB. Posterior a ello, cAMP influencia la regulación de los genes para la activación del regulador de factor de virulencia (Vfr). cAMP-Vfr forman un complejo que se encargan de la expresión de cerca de 200 genes de *P. aeruginosa* que están relacionados con la capacidad infecciosa de la bacteria como el pili tipo IV, el sistema de secreción tipo II (SST2), los SPQ LasI/LasR, RhII/RhIR y el SST3, en este último incrementando la transcripción de *exsA* y la secreción del efector ExoY (Anantharajah et al., 2016; Wu et al., 2014).

Mientras que el autorregulador PsrA participa en procesos como el metabolismo (β -oxidación) y la virulencia de *P. aeruginosa*. PsrA tiene la función de activar completamente la transcripción del operon *exsCEBA*, lugar donde se encuentran localizados los genes *exsA*, *exsC* y *exsE*, así como la producción de los efectores ExoS y ExoT que son liberados al citosol de la célula hospedera (Anantharajah et al., 2016; Shen et al., 2006).

Ácidos grasos y su papel en la virulencia

Generalidades

Los AG son moléculas compuestas de cadenas de carbono de tamaño variable (C4-C28), un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo y un grupo metilo (-CH₃) en el otro (Figura 4), lo que le proporciona una característica anfipática por la hidrofilia e hidrofobia de cada extremo de la molécula (Desbois & Smith, 2010; Kumar, Lee, Beyenal, y Lee, 2020; Petrovic & Arsic, 2015). Los AG se encuentran divididos en saturados (SAFA) (todos los enlaces de la cadena de carbonos son sencillos) (Figura 4), insaturados (MUFA) (presenta un doble enlace), poliinsaturados (PUFA) (presentan más de un doble enlace) y ramificados con el grupo acil conectado a la cadena de hidrocarburos (Petrovic & Arsic, 2015). Es importante mencionar que los dobles enlaces que presentan los AG generalmente son enlace *cis*, el cual juega un rol importante en la actividad antimicrobiana (Desbois & Smith, 2010; Petrovic & Arsic, 2015).

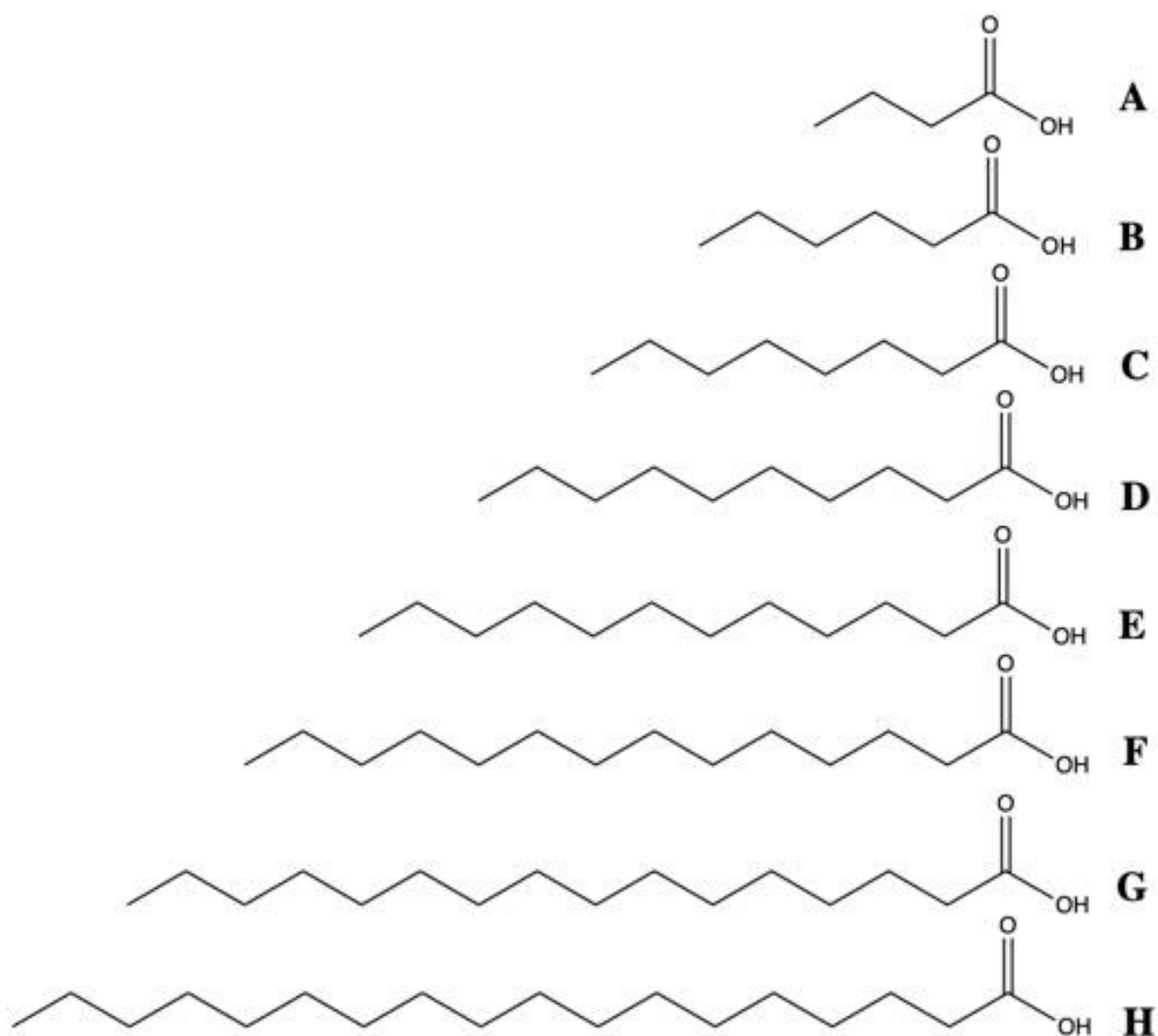


Figura 4. Estructuras de ácidos grasos saturados SAFA: C4-C18. **A:** ácido butírico, **B:** ácido caproico, **C:** ácido caprílico, **D:** ácido caprico, **E:** ácido láurico, **F:** ácido mirístico, **D:** ácido palmítico, **E:** ácido esteárico.

La función de los AG se ha relacionado con la defensa del hospedero contra microorganismos patógenos potenciales, influenciada por su forma y estructura (Desbois & Smith, 2010). El metabolismo de los AG tiene una función importante en el control de la expresión de factores de virulencia, así como en la señalización en los SPQ, como es el caso los factores de señal difusible (DSF) (Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019; Kumar et al., 2020). También, tienen la capacidad de afectar la fluidez de la membrana celular reduciendo la formación de exopolisacáridos necesarios para la adhesión de la

bacteria en el hospedero. (Desbois & Smith, 2010; 2019; Kumar et al., 2020). Sin embargo, los SAFA de cadena alifática de 12 a 18 átomos de carbono (SAFA: C12-18) se ha reportado exhiben propiedades antivirulencia en algunos sistemas bacterianos en ensayos *in vitro* (Desbois & Smith, 2010; Pérez-López et al., 2017).

Regulación de la degradación de AG en bacterias

La ruta metabólica de AG es de utilidad central en los procesos primarios y secundarias de las bacterias, estando implicado en el almacenamiento de energía, en los componentes estructurales celulares (bicapa lipídica) y en las moléculas de señalización como cofactores (biotina, lipoato) y metabolitos secundarios (moléculas de señalización de PQ, sideróforos y biosurfactantes) (Desbois & Smith, 2010; Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019).

Aunque los AG son moléculas sencillas, su ruta metabólica en bacterias comparte una estrecha relación entre la degradación (FAD) y biosíntesis (FAB) de las mismas (Figura 5), teniendo a la proteína FadR, regulador transcripcional global con actividad dual encendiendo genes de biosíntesis (*fabA*, *fabB*, *fabHDG*) y reprimiendo genes de degradación (*fadL*, *fadD*, *fadE*, *fadBA*, *fadH*) (Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019).

La adición exógena de AG de cadena larga (LCFA) inicia el transporte a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas mediado por la proteína FadL (Figura 5). Posteriormente, son transformados por la acil-CoA sintetasa (FadD) convirtiéndose a AG-acil-CoA a expensas de un ATP, con la cual se inicia el ciclo de degradación (FAD) (Jimenez-Díaz, Caballero, & Segura, 2019). Primero se da la deshidrogenación de AG-acil-CoA con la acil-CoA deshidrogenasa (FadE), que la convierte en 2-enoil-CoA (Jiménez-Díaz, Caballero y Segura, 2019). Posteriormente, el complejo FadBA, hidrata el AG mediante la enzima enoil-CoA hidratasa (FadB), seguido de la oxidación por FadB, donde se obtiene el 3-cetoacil-CoA y finalmente ocurre una catálisis con la enzima α -cetotiolasa (FadA) en apoyo con una CoA donde se corta el AG, liberando una acetil-CoA y reiniciando el ciclo (Figura 5) (Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019).

La acetil-CoA liberada puede entrar en dos rutas, en el ciclo de Krebs o en la biosíntesis de AG. La ruta de biosíntesis de AG (Figura 5) inicia con la condensación entre malonil-ACP y acetil-CoA para formar 3-cetoacyl-ACP, la cual es catalizada por la enzima de iniciación cetoacil-ACP sintasa III (FabH). Posteriormente, el 3-cetoacyl-ACP es reducido a 3-hidroxicil-ACP por NADPH dependiente de la enzima cetoacil-ACP reductasa (FabG), seguido de un proceso de deshidratación por hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabZ/FabA) para formar enoil-ACP, para finalmente ser reducido a AG-acil-ACP saturado por enoil-ACP reductasa (FabI). El intermediario AG-acil-ACP es condesado con malonil-ACP por la elongación de cetoacil ACP sintasas I/II (FabB/FabF) (Yuan et al. 2012; Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019).

Además de contribuir en la síntesis y degradación de AG, las enzimas mencionadas pueden jugar un rol importante en la virulencia de la bacteria y como es en el caso del grupo de genes *fad* involucrados en la degradación de AG y que responden en forma integrada a diferentes señales ambientales como son la de carbono, los niveles de oxígeno, el estrés osmótico y el estado fisiológico de la célula (Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019).

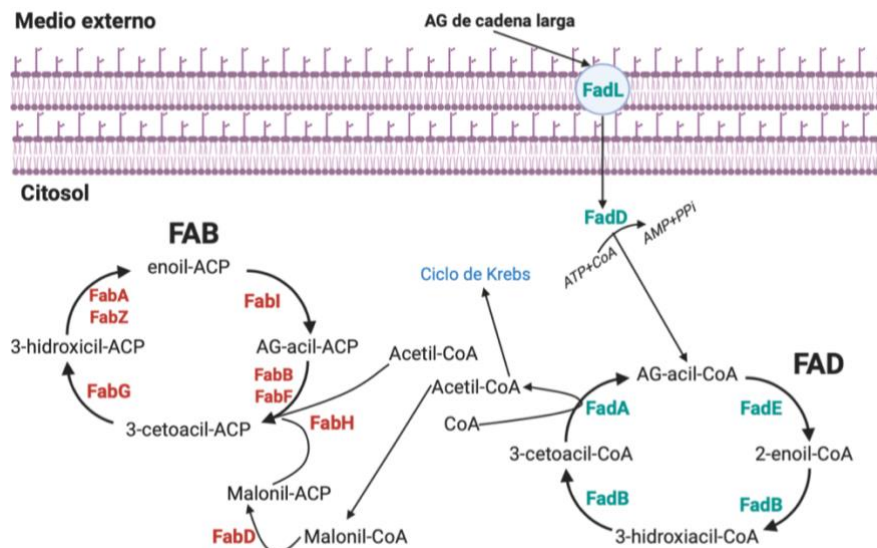


Figura 5. Ruta metabólica de la degradación (FAD) y biosíntesis (FAB) de AG en bacterias. Tomado y modificado de Jiménez-Díaz, Caballero & Segura, 2019.

Papel de los AG en el microambiente de la infección

Los AG son moléculas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. La mayoría de los organismos donde se han encontrado (bacterias, levaduras, algas, insectos, peces, plantas, entre otros) tienen la capacidad de sintetizarlas y se ha demostrado que aportan protección contra microorganismos patógenos tanto Gram positivos como negativos, sobre todo SAFA y MUFA de C8-C18 (Kumar et al., 2020)

En el humano, los AG se encuentran difundidos en la capa superficial de la piel y son los principales componentes del sebo humano, los cuales son liberados en presencia de bacterias del microbioma de la piel (*Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermis*) o por la presencia de sebocitos (Gallo & Nakatsuji, 2011). Gallo & Nakatsuji (2011) propone que los AG libres son responsables de la actividad antibacteriana directa de la superficie de la piel contra la colonización e infección de patógenos, siendo las moléculas más representativas los ácidos láurico, palmítico y oleico (Gallo & Nakatsuji, 2011; Kumar et al., 2020).

Por otro lado, además de los AG mencionados, los lípidos aportados en la alimentación desde fases tempranas juegan un rol importante en el comportamiento y fortalecimiento del sistema inmune (Quin & Gibson, 2019). Se ha estudiado el alcance de la lactancia en el desarrollo de las células inmunitarias, ya que se ha observado que el único componente variable en las diferentes etapas de lactancia es el perfil de AG, siendo la porción de SAFA la más abundante (34–47 %). El ácido láurico y el ácido palmítico tienen la capacidad de activar los receptores de tipo Toll, proteínas que forman parte del sistema inmune relacionado a la respuesta inflamatoria, crítica para la defensa del hospedero contra patógenos (Quin & Gibson, 2019). Sumado a ello, la ingesta de SAFA de alimentos de origen animal muestra un incremento de bacterias del microbioma intestinal como *Bacteroides* spp. y tiene efecto en la inhibición de infecciones de tipo entérico, sobre todo con AG de C12-C18 (Quin & Gibson, 2019).

En un estudio publicado por Golubeva et al. (2016) se detectó la importancia de los LCFA, tanto SAFA (mirístico, palmítico) como MUFA (oleico) en la prevalencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Dicha bacteria coloniza preferentemente el

íleon distal, siendo el SST3 fundamental para la invasión de células epiteliales del intestino delgado. El SST3 de *S. enterica* es regulado por un complejo proteico conformado por las proteínas RtsA, HilC y HilD que regulan la producción de la proteína Hila, con la cual se activa la isla de patogenicidad SPI1 (fracción de ADN genómico que faculta a *S. enterica* como virulenta) para expresar el SST3 (Golubeva, Ellermeier, Chubiz, & Slauch, 2016; Nickerson & Schurr, 2006). Los LCFA actúan en el intestino como señales ambientales ante la presencia de dicho patógeno y al poseer afinidad con la proteína HilD se forma una unión que evita la formación del complejo proteico y da como resultado la inhibición del SST3 (Ellermeier, Ellermeier, & Slauch, 2005; Golubeva et al., 2016).

En la infección de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ, Son et al. (2006) establecieron que la fuente de carbono utilizada por dicho patógeno en el pulmón es obtenida a través del surfactante pulmonar, compuesto por 10 % de proteínas y 90 % de lípidos, del cual la fosfatidilcolina (FC) conforma un 80 % (Son et al., 2007). *P. aeruginosa* degrada la FC mediante lipasas con la cual se obtienen SAFA (10-20 % de ácido mirístico y 50-60 % de ácido palmítico), glicerol y colina (Figura 6). Posteriormente, los AG son metabolizados por las enzimas que dan paso a la β -oxidación, ruta importante en la adquisición de nutrientes y en la patogénesis de *P. aeruginosa* (Kang, Nguyen, Son, & Hoang, 2008; Son et al., 2007).

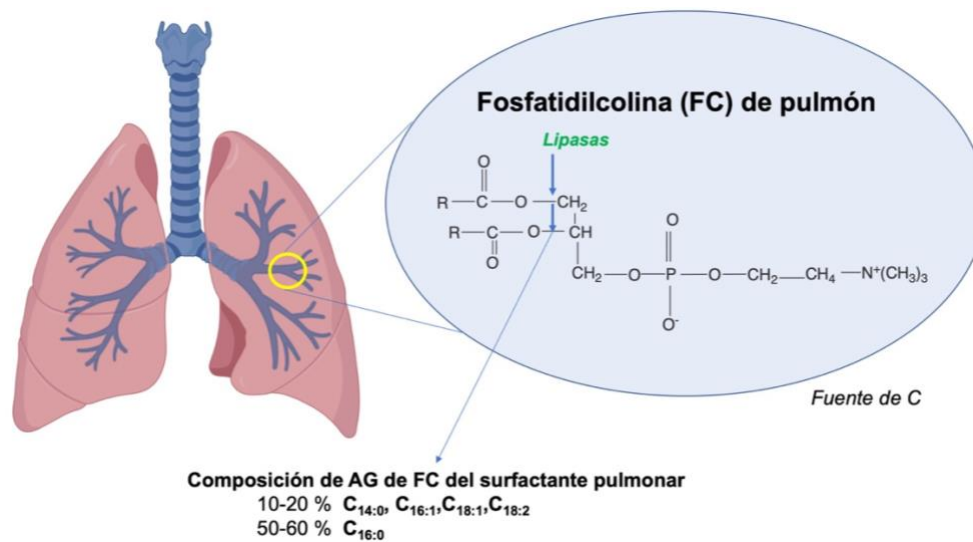


Figura 6. AG que componen la fosfatidilcolina encontrada en el surfactante pulmonar. Son et al., 2006.

AG como moléculas AI

Los SPQ dependen de la síntesis y liberación de AI (Dow, 2017). Los factores de señal difusible (DSF) son una familia de AI del tipo AG *cis*-2 insaturados que fueron inicialmente descubiertos en bacterias fitopatógenas (Dow, 2017), pero también están presentes en géneros asociados a animales (Figura 7) (Dow, 2017; Ryan, An, Allan, McCarthy, & Dow, 2015).

Los DSF fueron descritos por primera vez en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) y fue el ácido *cis*-11-metil-dodecenoico (Figura 7H) el primer DSF identificado. Este AI modula varias funciones biológicas incluidas la expresión de factores de virulencia, la biopelícula, la resistencia a antibióticos y la comunicación *intra* e *interespecie* (incluso *intradominio*) con lo cual modulan el comportamiento de otros microorganismos (Deng et al., 2014; L. Liu et al., 2018; Ryan et al., 2015; Waldron et al., 2019). Además *Xcc* produce un AI del tipo SAFA, el 13-metiltetradecenoico que también es esencial en la regulación de su virulencia (Figura 7J) (Deng, Wu, Tao, & Zhang, 2011; Zhou, Zhang, Cámara, & He, 2017).

Entre los DSF descritos en patógenos de animales y humanos está el ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico (Figura 7E) producido por *Stenotrophomonas maltophilia*, el *cis*-2-dodecenoico (BDSF) (Figura 7F) por *Burkholderia cenocepacia* así como el ácido *cis*-2-decenoico (Figura 7D) por *P. aeruginosa* (Ryan et al., 2015).

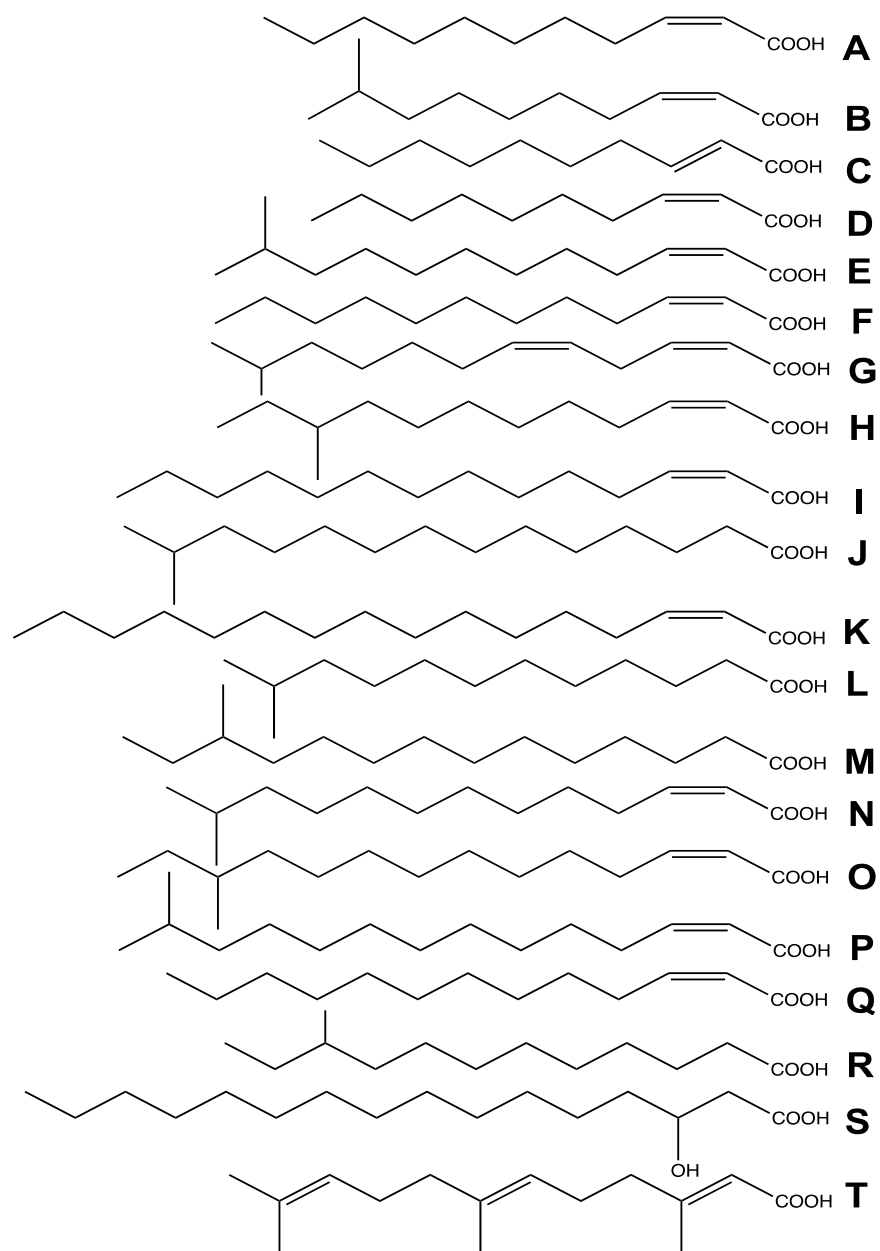


Figura 7. Estructuras químicas de la familia DSF. **A:** ácido *cis*-2-undecenoico; **B:** ácido *cis*-9-metil-2-decenoico; **C:** ácido *trans*-2-decenoico (SDSF); **D:** ácido *cis*-2-decenoico (CDA); **E:** ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico; **F:** ácido *cis*-2-dodecenoico (BDSF); **G:** ácido *cis,cis*-11-metil-dodeca-2,5-dienoico; **H:** ácido *cis*-10-metil-dodecenoico; **I:** ácido *cis*-2-tetradecenoico (DSFXf1); **J:** ácido 13-metiltetradecenoico (DSFLe3); **K:** ácido *cis*-2-hexadecenoico (DSFXf2); **L:** ácido 11-metil-dodecenoico; **M:** ácido 12-metil-tetradecenoico; **N:** ácido *cis*-12-metil-2-tridecenoico; **O:** ácido *cis*-12-metil-2-tetradecenoico; **P:** ácido *cis*-13-metil-2 tetradecenoico; **Q:** ácido *cis*-2 tridecenoico; **R:**

ácido 10-metil-dodecanoico; **S**: ácido 3-hidroxihexadecanoico; **T**: ácido farnesoico. Deng, Wu, Tao, & Zhang, 2011; Zhou, Zhang, Cámara, & He, 2017; Kumar et al., 2020.

SPQ basados en DSF

Los DSF han sido descritos en bacterias tipo Gram negativas y de acuerdo con Ryan et al. (2015) se encuentran divididos en tres categorías conforme a su contexto genómico (Cuadro 5).

Las dos primeras categorías se encuentran reguladas por el grupo de genes *rpf* (regulation of pathogenicity factors) involucrados tanto en la síntesis como en la percepción de los DSF (Ryan et al., 2015). La tercera categoría se encuentra regulada por *Dspl*, proteína perteneciente a la familia de las crotonasas, pero hasta el momento no se ha detectado la proteína receptora para este sistema (Ryan et al., 2015, Zhou et al., 2017; Cortés-López et al., 2020).

Cuadro 5. Categorías de los DSF que regulan diferentes SPQ.

Categoría	Proteína síntesis	Proteína recepción	Ejemplo de patógeno	DSF sintetizado
DSF I	RpfF	RpfC-RpfG	<i>Xanthomonas campestris</i>	Figura 7B,E,G,H
			<i>Xanthomonas oryzae</i>	Figura 7E,F,G
			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Figura 7E,I,L,N,O,P,Q,R
			<i>Xylella fastidiosa</i>	Figura 7E,I,K,M
DSF II	RpfF	RpfR	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Figura 7E,F
DSF III	<i>Dspl</i>	?	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Figura 7D

Tomado y modificado de Ryan et al. 2015, Zhou, Zhang, Cámara, & He, 2017, Kumar et al. 2020.

Aunque algunas bacterias no producen DSF tienen mecanismos para detectarlos, lo que favorece la comunicación interespecie e interdominio (Ryan et al., 2015). Un claro ejemplo es la comunidad polimicrobiana en las vías respiratorias de los pacientes con FQ, específicamente en el esputo, donde se ha detectado la presencia de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cenocepacia* y *Candida albicans*. Por un lado, BDSF (Figura 7B) producido por *B. cenocepacia* y el ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico (Figura 7E)

producido por *S. maltophilia* inducen la formación de biopelícula, la resistencia a antibióticos y el desarrollo de persistencia de *P. aeruginosa*, pero también inhiben la transición levadura-hifa de *C. albicans* (Ryan et al., 2015). Por otro lado, el CDA producido por *P. aeruginosa* inhiben la formación de biopelícula de *C. albicans* y *Staphylococcus aureus* (Ryan et al., 2015).

CDA producido por *P. aeruginosa*

El DSF sintetizado por *P. aeruginosa* es el CDA, el cual es causante de la expresión de múltiples genes relacionados con el metabolismo, biosíntesis de flagelo, motilidad, quimiotaxis, secreción de exopolisacáridos y lipopolisacáridos entre otros (Figura 8) (Davies & Marques, 2009; Rahmani-Badi, Sepehr, Fallahi, & Heidari-Keshel, 2015).

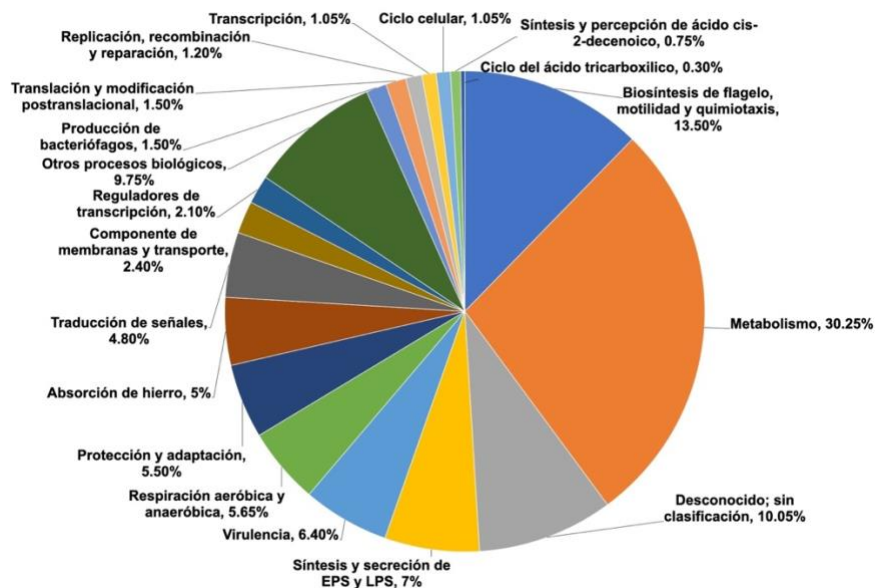


Figura 8. Clasificación de genes funcionales en *P. aeruginosa* PAO1 en presencia de CDA. Tomado y modificado de Rahmani-Badi et al., 2015.

CDA es sintetizado en presencia de la enzima enoil-CoA hidratasa/isomerasa mejor conocida como DspI (Dispersion Inducer), miembro putativo de la familia de las

crotonasas y enzima homóloga de RpfF (Amari, Marques, & Davies, 2013). Dspl tiene la función de catalizar la reacción de deshidratación de 3-hidroxiacil tioester unido a una proteína acarreadora de acilos (genera la formación de un doble enlace entre los carbonos 2,3), para después catalizar la isomerización *cis* del doble enlace liberando el CDA de la proteína acarreadora de acilos (Amari, Marques, & Davies, 2013; Liu et al., 2018; Waldron et al., 2019).

Dspl es un regulador importante en la expresión de factores de virulencia como la pioverdina (sideróforo requerido para el establecimiento de la infección), la formación de biopelícula y la motilidad tipo swarming (Liu et al., 2018), la cual se ha visto tiene una expresión inversa con la formación de biopelícula (Amari et al., 2013; Liu et al., 2018).

Aunque aún no se conoce la proteína receptora de CDA en *P. aeruginosa*, para el caso de *Burkholderia cenocepacia* se ha caracterizado con gran detalle el receptor RpfR (factor de regulación de patogenicidad R) donde se une el ácido *cis*-2-dodecenoico (BSDF). RpfR cuenta con tres dominios importantes para que se realice la expresión de factores de virulencia y la dispersión de biopelícula (Waldron et al., 2019):

- Dominio PAS: es un dominio estructural que se encuentra presente en muchas proteínas de señalización donde son utilizados como sensores de señal (Waldron et al., 2019). Se encuentran en una gran variedad de organismos desde bacterias a humanos y su nombre se debe por las letras iniciales de tres proteínas en las que se encuentra, como son la proteína del periodo circadiano en *Drosophila* (Per), la proteína translocadora del receptor nuclear Ah (Arnt) y la proteína “single-minded” que regula el desarrollo del sistema nervioso central (Sim) (Taylor y Zhulin, 1999). PAS se encuentra presente en todos los dominios de la vida, es capaz de detectar una multitud de señales incluyendo moléculas pequeñas como los AI (Ryan et al., 2015; Taylor & Zhulin, 1999; Waldron et al., 2019).
- Dominio DGC: Dicho dominio consiste en la enzima diguanilato ciclasa (DGC), en específico la ciclasa-di-GMP o c-di-GMP, que es un segundo mensajero que desencadena la dispersión de biopelícula y la expresión de factores de virulencia (Ryan et al., 2015; Waldron et al., 2019).
- Dominio PDE: el dominio PDE o fosfodiesterasa. Dicha actividad es desencadenada por la unión del DSF con su proteína receptora, con lo cual

decrece la concentración intracelular de c-di-GMP y favorece la dispersión de biopelícula (Ryan et al., 2015; Waldron et al., 2019; Wu et al., 2014).

AG como moléculas antivirulencia

El uso de plantas superiores como fuente de moléculas antivirulencia ha sido tópico central en las últimas dos décadas (Muñoz-Cazárez et al., 2017). Las propiedades antimicrobianas de los AG, en particular las bactericidas, han sido descritas ampliamente, pero sus propiedades reguladoras de virulencia a concentraciones subletales, aún están en proceso de ser entendida (Cortez-López et al., 2020).

Se ha identificado que SAFA, MUFA y PUFA de cadena media a larga (C12-C18) regulan la virulencia bacteriana, inhibiéndola o estimulándola en función de las condiciones de experimentación y de la cepa bacteriana (Cortés-López et al., 2020).

Proteus mirabilis es un patógeno que coloniza el tracto urinario y causa infecciones sobre todo en pacientes con uso frecuente de catéter (Moura, Nicolau, Hooton, & Azeredo, 2009). En el proceso de establecimiento de la infección el nado tipo swarming y la actividad hemolítica son factores de virulencia muy importantes. Se ha reportado que SAFA: C12-18 (en especial el ácido mirístico y láurico) a concentraciones subletales reducen estos factores (Liaw, Lai, & Wang, 2004). Widmer et al. (2007) identificaron que los AG presentes en la carne de pollo (ácido linoleico, oleico, palmítico y esteárico) inhiben la producción del AI-2 de *Vibrio harveyi*. Mientras que Pérez-López et al. (2017) estudió el efecto del aceite de amaranto, chía y girasol, ricos en SAFA (ácido palmítico, ácido mirístico, ácido láurico y ácido esteárico) sobre *Chromobacterium violaceum*, encontrando que inhiben la producción de violaceína, que es un pigmento regulado por PQ. Mediante un análisis de acoplamiento molecular docking se registró una alta afinidad de SAFA: C12-18 con el sitio activo de la proteína receptora CviR (Pérez-López et al. 2017).

En *P. aeruginosa* se ha encontrado que los AG interfieren sobre diferentes factores de virulencia regulados por PQ. Inoue, Shingaki, & Fukui (2008) demostraron que el uso de SAFA y SAFA-ramificados tienen un efecto inhibitorio sobre “swarming”, atribuyendo su efecto a características como el número de carbonos, la saturación y la

ramificación de estos. También, Abd & Bashandy (2012) mediante la infección de bulbos de cebolla con *P. aeruginosa* encontraron que, en respuesta a la infección, la planta aumenta la producción de algunos metabolitos en el que destaca el ácido mirístico, el cual reduce la producción de piocianina y la actividad proteolítica.

Por otra parte, cabe señalar que no obstante la evidencia mostrada en estudios *in vitro*, sobre el papel regulador de virulencia de los AG en los SPQ, hasta el momento el efecto en sistemas *in vivo* ha sido muy poco estudiado, sobre todo en modelos murinos.

Terapias de combinación antivirulencia y moléculas adyuvantes

Debido a la pérdida de actividad de muchos antibióticos, la combinación con moléculas adyuvantes es una opción que se tiene para alargar el tiempo de uso de muchos antibacterianos que se usan en la clínica. Esta estrategia surge del éxito de las sinergias registradas de la combinación de antibióticos (Kumar et al., 2020; Wright, 2016).

Se ha descrito que el mecanismo de acción de los AG como moléculas coadyuvantes entran en la Clase I.B. ya que mejoran la actividad de los antibióticos al evitar mecanismos de resistencia intrínsecos, barreras metabólicas, fisiológicas (penetración de membrana) y elementos de resistencia específicos (formación de biopelículas) (Kumar et al., 2020; Wright, 2016). Sin embargo, aún no se entiende el mecanismo adyuvante de los AG reguladores de SPQ.

Los AG se han relacionado con la inhibición de la formación de biopelículas, las cuales son estructuras complejas que proveen alta tolerancia a antibióticos y permiten la prevalencia en diferentes superficies (Kumar et al., 2020). Al respecto, Salini, Santhakumari, & Veera (2019) demostraron que la combinación de auxinas, con el ácido undecanoico tiene un efecto sinérgico en la inhibición de virulencia de *V. harveyi*, ya que la combinación es más eficiente en reducir la formación de biopelícula y el swarming, además de que aumenta la supervivencia de *Artemia salina* hasta en un 80 %. También, Muthamil, Balasubramaniam, & Balamurugan (2018) demostraron que la combinación del ácido quínico y el ácido undecanoico reducen mejor la formación de biopelícula, la transición levadura-hifa, la filamentación y la producción de sustancias extrapoliméricas

en *Candida* spp, así como aumentan la supervivencia en *Caenorhaditis elegans* infectados en un rango de 55-60 %.

Modelos de infección en ratones y terapias antivirulencia

Para tener un mayor entendimiento sobre el funcionamiento de los métodos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, los experimentos con modelos animales son esenciales (Vandamme, 2014). Una de las principales críticas realizadas a las evaluaciones de moléculas antivirulencia *in vitro*, es que se realizan en monocultivos con medios ricos y en condiciones controladas de crecimiento (Defoirt, 2018); además, de que no se considera la participación de elementos del hospedero que interfieren en el desarrollo del proceso infeccioso (Vandamme, 2014). La eficacia de las terapias antivirulencia está determinada por su efecto *in vivo*, por lo que es fundamental su evaluación en modelos animales, principalmente en modelos murinos por sus similitudes con el humano. De los modelos animales utilizados en la experimentación de moléculas antivirulencia, los ratones cuentan con un genoma similar al humano (99 %) y han sido utilizados exitosamente para validar fármacos y determinar su eficacia (Vandamme et al., 2014). La cepa de ratones CD1 es de un amplio uso en la investigación farmacológica y toxicológica (Aldinger, Sokoloff, Rosenberg, Palmer, & Kathleen, 2009; Brekke, Steele, & Mulley, 2018).

Para determinar la efectividad de algunas terapias antivirulencia *in vivo*, se han empleado algunos modelos murinos de infección con *P. aeruginosa* como son el de lesión por daño térmico (Rumbaugh, Griswold, Iglewski, & Hamood, 1999), sepsis (Coopersmith et al., 2003), el de cuerpo extraño (Bjarnsholt et al., 2010) y cicatrización (Dunn et al., 2013). Recientemente, Pletzer et al. (2017) propusieron un modelo de infección cutánea, señalando que es altamente reproducible y emplea un número reducido de animales. El modelo permite evaluar la actividad del patógeno con variables relacionadas con el proceso inflamatorio, formación de tejido necrótico, establecimiento en el área de infección y la dispersión sistémica (Pletzer et al., 2017).

Efecto del bloqueo del SPQ y SST3 en P. aeruginosa in vivo

Para identificar y definir el papel de los determinantes de la virulencia en la patogénesis de *P. aeruginosa* se han utilizado varios modelos animales que incluyen el nemátodo (*Caenorhabditis elegans*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el pez cebra (*Danio rerio*) y el ratón (*Mus musculus*) (Castillo-Juárez et al., 2015).

Mediante el empleo de cepas mutantes de SPQ y SST3 se ha podido conocer la importancia de estos reguladores en la virulencia y en la inducción del daño (Castillo-Juárez et al., 2015). En el modelo de lesión por daño térmico, la mutante de $\Delta lasR$ disminuye su dispersión sistémica, así como en etapas tempranas se reduce el establecimiento en el área de lesión (Rumbaugh et al., 1999). En este mismo modelo la doble mutante $\Delta lasR/\Delta rhII$ disminuyó la mortalidad de los animales en un 88 %, reduciendo su establecimiento en la lesión, la dispersión sistémica (Rumbaugh et al., 1999). Mientras que la doble mutante $\Delta lasR/\Delta rhIR$ no logró establecerse en el área de infección después de siete días, en contraste con la cepa PAO1 WT que permaneció hasta por 21 días (Christensen et al., 2007).

En el modelo de absceso se reportó la evaluación de las cepas mutantes de $\Delta lasR/rhIR$ y $\Delta pscC$ (mutante de SST3) derivadas de PA14 (N. R. Muñoz-Cazares, 2018). Claramente, las dos mutaciones redujeron la virulencia de *P. aeruginosa*, sin embargo, el efecto fue más evidente con la mutante $\Delta pscC$. En la cepa de PQ $\Delta lasR/\Delta rhIR$ se redujo el área necrótica, el establecimiento y se evitó la dispersión sistémica, mientras que en la cepa mutante de SST3 evito el establecimiento y el daño (Muñoz-Cazares, 2018).

Mecanismos de regulación de virulencia más allá de la PQ y el SST3

Mecanismos superiores de regulación de virulencia y su relación con los SPQ

Como se ha mencionado, la inhibición de la PQ es uno de los principales blancos de estudio y con potencial para el desarrollo de terapias antivirulencia (Kumar et al., 2020). Sin embargo, cabe señalar que a medida que se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos de virulencia, se han descrito otros elementos que participan en el

daño y el establecimiento bacteriano, pero que tienen un nivel de regulación superior (más global) al de los involucrados "localmente" y asociados comúnmente a los SPQ (Kumar et al., 2020) como son:

Los **reguladores de ARN** influyen en la expresión y función de las proteínas en respuesta a señales externas como la temperatura, el pH y los niveles de metabolitos, mientras que los **segundos mensajeros de nucleótidos** son reguladores globales y controlan múltiples aspectos del comportamiento bacteriano y desarrollo. Algunos ejemplos de ellos son el AMP cíclico y el c-di-GMP que regulan la formación de biopelícula, varias formas de motilidad y los SST3 (Defoirdt, 2018; Thompson & Malone, 2020).

Los **factores sigma** son subunidades de la ARN polimerasa bacteriana que se encarga de la transcripción del ARN y determinar la especificidad del promotor de enlace de ADN, afectando la expresión génica. Algunos ejemplos son RpoS y RpoN, los cuales tienen influencia sobre la liberación de algunos factores de virulencia y regulan indirectamente la PQ. RpoN fue reportado por reducir la producción de RhlI y LasI en *P. aeruginosa* (Defoirdt, 2018; Frederix & Downie, 2011).

Factores transcripcionales (FT) controlan la expresión de los SPQ y de secreción de proteínas. Los FT son proteínas que se unen a regiones promotoras del ADN que controlan la expresión de genes (algunos de virulencia) de manera coordinada en respuesta a las condiciones ambientales (Huang et al., 2019). En un estudio reciente utilizando inmunoprecipitación de cromatina junto con secuenciación de alto rendimiento (ChIP-seq), así como RNA-seq se analizó con un enfoque global la regulación de 20 FT relacionados con la virulencia en *P. aeruginosa* (Huang et al., 2019). Se identificaron alrededor de 1200 genes a los que se unieron los FT y de los cuales validaron experimentalmente la funcionalidad de 347, y se describieron las relaciones reguladoras. Con esta estrategia se obtuvo una red de regulación de alta complejidad denominada "red reguladora genómica de *Pseudomonas aeruginosa*" (PAGnet), que es una

plataforma digital dinámica donde se pueden realizar análisis personalizados en función del FT que uno desea analizar (Figura 9).

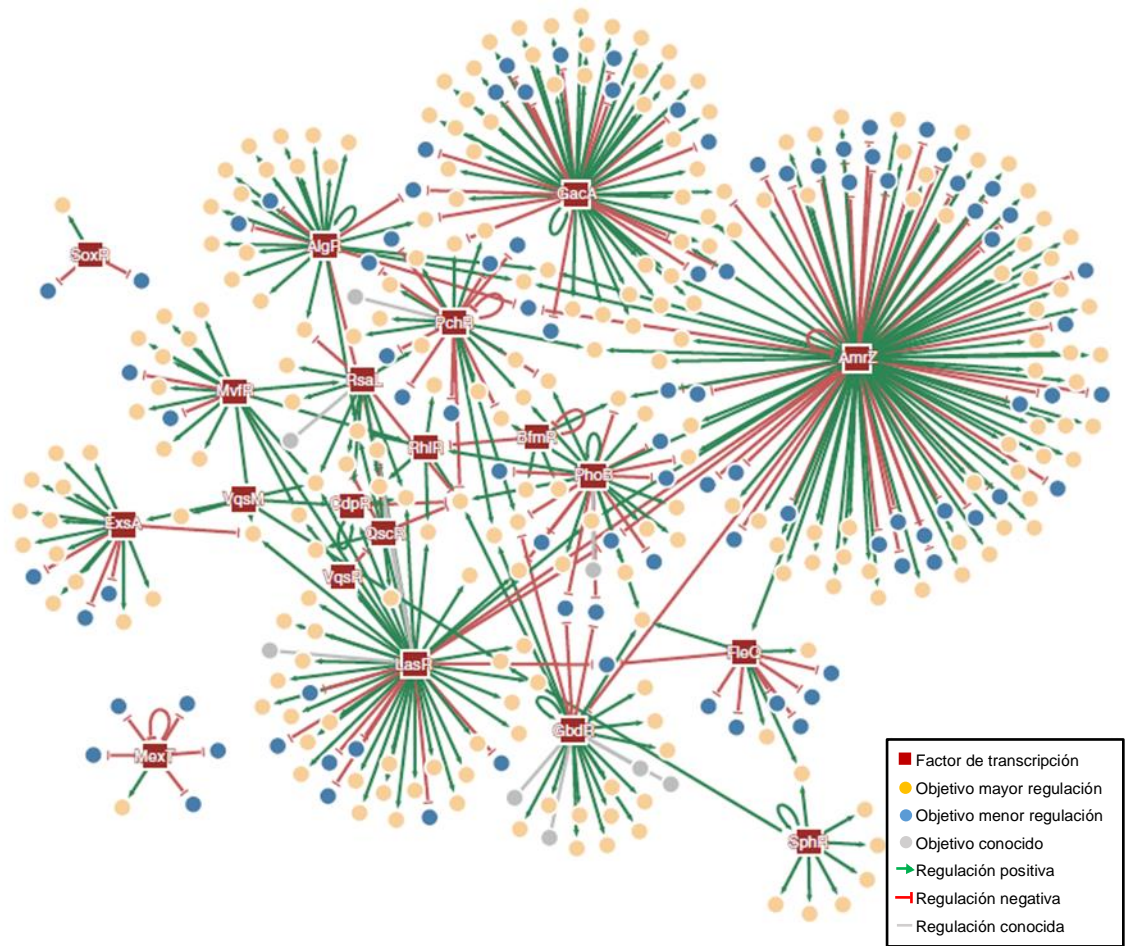


Figura 9. Visualización de la regulación de los FT y los genes que regula (positiva/negativamente) representados en PAGnet. Los rectángulos representan 20 FT y los círculos los blancos funcionales. Tomado y modificado de Huang et al., 2019.

*PsrA un regulador transcripcional y sensor de LCFA en *P. aeruginosa**

PsrA es un regulador transcripcional tipo TetR (regulador transcripcional de los genes de resistencia antibiótica a tetraciclina en las Proteobacterias) de categoría global, debido a que controla positiva o negativamente múltiples genes que influyen en la virulencia de *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que regula la activación del pili tipo IV,

que influye en la motilidad tipo “swarming”, la síntesis de biopelícula, la síntesis de pioverdina, la activación de RpoS (factor sigma) y la regulación de la vía degradativa de los ácidos grasos (β -oxidación) (Kang et al., 2009, 2008; Shen et al., 2006).

Al respecto, podemos mencionar que RpoS es un factor sigma involucrado en la regulación negativa de factores de virulencia controlados por PQ en la fase de crecimiento estacionaria. Es importante mencionar que se ha observado que RpoS, solo está presente cuando *P. aeruginosa* se encuentra en un medio limitado de nutrientes y se inhibe el SST3. Se ha sugerido que esta regulación temporal, es debido al alto costo energético que se requiere para producir esta estructura (Kang et al., 2009, 2008; Shen et al., 2006).

Por otro lado, la β -oxidación tiene un papel importante en la adquisición de nutrientes y la patogénesis de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ, debido a que la alta concentración de fosfatidilcolina es una fuente de FA para la bacteria (Kang et al., 2008). En la β -oxidación el PsrA reprime la enzima FadE a través de la unión con el gen *PA0506* y el operón *fadAB5*, esto permite que la molécula AG-acil-CoA funcione como precursora de la síntesis de PQS (Kang et al., 2008; Wells et al., 2017).

Es importante mencionar que la actividad del regulador PsrA se puede ver modificada en presencia de LCFA mayores de 12 átomos de carbono, ya que favorecen la formación del complejo PsrA-LCFA. La formación de PsrA-LCFA quita la represión sobre los operones *fadE*, *fabAB5* activando nuevamente la β -oxidación, pero reprime los genes *rpoS* y *exsCEBA*, no obstante ante la constante producción de PsrA eventualmente los genes *rpoS* y *exsCEBA* aumentan su expresión y se reactivan. Por otro lado, si la concentración de LCFA en el medio excede la concentración de PsrA, entonces *rpoS* y *exsCEBA* no se reactivaran, puesto que se ha demostrado que LCFA tiene la capacidad de inhibir la expresión de dichos genes (Kang et al., 2009, 2008; Wells et al., 2017).

Cuando RpoS disminuye su presencia en el medio, se ha observado una sobreexpresión del gen *rhII* y del autoinductor C4-HSL, con lo que la bacteria se vuelve más virulenta produciendo mayor concentración de pioverdina y la sintasa de cianuro de hidrógeno, factores de virulencia típicos de PQ. En el caso de la represión del operón

exsCEBA se ha observado una disminución en la producción de los efectores ExoS y ExoT específicamente (Kang et al., 2009).

En el caso específicamente de la activación de *fadE*, se reduce la síntesis de PQS, puesto que la molécula AG-acil-CoA da paso al inicio de la β -oxidación, con lo que la materia prima para la producción de PQS, se encuentra comprometida (Wells et al., 2017). Esto da un panorama de la importancia de PsrA en la regulación de la virulencia en las fases tardías de crecimiento de *P. aeruginosa* (Figura 10).

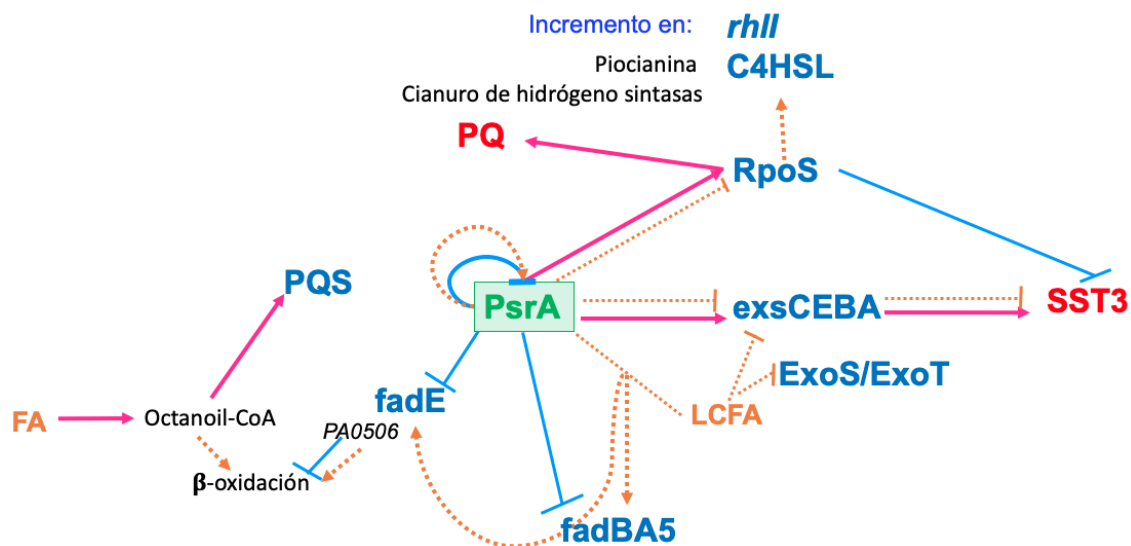


Figura 10. Ruta de actividad de PsrA. Líneas sólidas representan actividad de PsrA. Líneas punteadas representan actividad del complejo PsrA-LCFA.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública a nivel mundial, con un aumento constante en la dispersión y en la aparición de cepas multirresistentes (Opoku-Temeng et al., 2018). El panorama se complica por el bajo número de antibióticos que se han generado en la última década debido al poco interés de la industria farmacéutica, ya que no resulta redituable invertir en medicamentos que en unos años dejen de funcionar por la aparición de resistencia (Wright et al., 2016). También, la presencia de cepas multirresistentes en el ambiente hospitalario representa un serio problema para las unidades médicas, en la que los brotes causan la muerte de pacientes con padecimientos tratables (Moradali et al., 2017; Planet, 2017). *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista con gran capacidad intrínseca para generar resistencia y es catalogado de *prioridad crítica* (urgencia máxima para el desarrollo de nuevos antibacterianos) por la OMS (Moradali et al., 2017).

Los productos naturales en especial los de origen microbiano han sido la principal fuente de antibacterianos hasta la actualidad (Bérdy, 2005). Sin embargo, en la última década se ha demostrado que muchos de metabolitos secundarios reducen la virulencia bacteriana cuando se evalúan a concentraciones subletales (Muñoz-Cazares, García-Contreras, Pérez-López, & Castillo-Juárez, 2017). En este sentido el desarrollo de terapias antivirulencia es uno de los principales mecanismos de acción propuestos para combatir la generación de resistencia y combatir cepas multirresistentes (Rémy et al., 2018; Scoffone, Trespidi, Chiarelli, Barbieri, & Buroni, 2019).

Las semillas oleaginosas, el pescado, así como otras fuentes ricas en ácidos grasos libres han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades bactericidas, sin embargo, en años recientes se ha empezado a analizar sus efectos moduladores de virulencia y coadyuvantes (Kumar et al., 2020), que se presentan a concentraciones subletales (Cortes-López et al., 2020). No obstante, una de las principales limitantes para el desarrollo de las terapias antivirulencia es la falta de estudios a nivel preclínico (modelos animales) y clínico que muestren su eficacia.

IV. OBJETIVOS

General:

Analizar las propiedades antivirulencia de los SAFA: C12-18 y comparar su efecto con el ácido *cis*-2-decenoico (CDA) *in vitro* y en un modelo de infección en ratón.

Específicos:

- Determinar las concentraciones subinhibitorias de SAFA: C12-18 y el CDA.
- Evaluar su capacidad antivirulencia sobre fenotipos regulados por percepción de quórum (PQ) y sobre el sistema de secreción tipo III (SST3).
- Analizar el efecto coadyuvante o sinérgico de la combinación de SAFA con un inhibidor del SST3.
- Evaluar la eficacia de su administración para evitar el desarrollo de la infección y el daño causado por *P. aeruginosa* en un modelo de infección cutánea en ratones.

V. HIPÓTESIS

Si los SAFA: C12-18 a concentraciones subletales y en condiciones *in vitro* reducen la producción de factores de virulencia de *P. aeruginosa*, entonces su administración en ratones infectados con la bacteria evitará el desarrollo de la infección y el daño.

VI. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es un grave problema que requiere ser solucionado en un corto tiempo, ya que, si no se logra detener o reducir su tasa de aparición podemos entrar en una era denominada postantibiótica, en el que cepas multi y panresistentes causaran la muerte por infecciones no controladas. El desarrollo de terapias antivirulencia es una de las estrategias con un alto potencial para lograr reducir la resistencia bacteriana, debido a que se plantea que, al no tener un efecto directo sobre la viabilidad de las bacterias, estas no generan mecanismos de resistencia como con los antibióticos. En este sentido, los AG libres son una de las moléculas orgánicas más estudiadas por sus diversas funciones en la naturaleza; sin embargo, su capacidad para modular la virulencia es un área que estamos aun descifrando. Hay evidencia de que ciertos AG como son los SAFA: C12-18 a concentraciones subletales reducen la virulencia de algunas especies bacterianas (incluida *P. aeruginosa*) mediante la interferencia en los sistemas de PQ. No obstante, no se ha analizado su efecto sobre otros mecanismos de regulación bacteriana y sobre todo demostrado su eficacia a nivel preclínico. De tal manera, que en esta investigación se analizó su efecto sobre factores de virulencia regulados por PQ (piocianina, elastasa, proteasa, hemolítica), así como otros parcialmente regulados (biopelícula y swarming) y sobre el SST3, que en *P. aeruginosa* parece tener una regulación independiente de PQ. También, se evaluó su efectividad a nivel preclínico empleando un modelo de infección en ratones.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental se desarrolló en el laboratorio de Fitoquímica ubicado en el área de Laboratorios Generales y el anexo del laboratorio de Fitoquímica del área de Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y consistió en tres etapas:

1. Ensayos a nivel *in vitro*.
2. Ensayos moleculares.
3. Ensayos a nivel *in vivo* en modelos murinos.

En cada etapa se realizaron diferentes actividades para encontrar el tratamiento adecuado para reducir la virulencia de *P. aeruginosa*. Asimismo, en cada etapa se evaluaron las variables respuesta de interés y se analizaron estadísticamente con base en diseños experimentales establecidos previamente. El Cuadro 6 muestra las particularidades de cada etapa experimental.

Cuadro 6. Descripción de las etapas de la fase experimental de la investigación.

Etapa	Tratamientos	Variable Respuesta	Análisis
1. Ensayos a nivel <i>in vitro</i>	<p>Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias.</p> <p>Efecto de factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> con diferentes tratamientos.</p>	<p>UFC/mL</p> <p>Hemólisis y proteasa – diámetro (mm)</p> <p>Piocianina – Porcentaje de producción</p> <p>Swarming – Área (cm²)</p> <p>Biopelícula – Porcentaje de producción</p>	<p>Análisis de varianza con prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), mediante el uso del paquete estadístico R 3.6.1.</p>
2. Ensayos moleculares	Western Blot.	Secreción de efector ExoU.	Análisis descriptivo con base en las variables respuesta.
3. Ensayos en modelos murinos	Modelo de absceso en ratones de cepa CD1.	<p>Mortalidad</p> <p>Absceso</p> <p>Necrosis</p> <p>UFC/mL</p>	<p>Curvas de Kaplan Meyer ($\alpha \leq 0.05$)</p> <p>Prueba de U-Mann Whitney ($\alpha \leq 0.05$) mediante el uso del paquete estadístico SPSS Statistics Versión 25.</p>

Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias

Se realizaron curvas de crecimiento para determinar el efecto sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PA14 WT. Para ello se ajustó un cultivo de *P. aeruginosa* PA14 WT a una D.O._{620 nm} y se depositaron 200 µL en cada pocillo de una placa de 96 pozos, en los cuales se agregaron los tratamientos mencionados en el Cuadro 7. Se realizaron mediciones durante 24 horas cada dos horas y la placa se mantuvo a una temperatura de 37 °C con agitación de 250 rpm. Como control positivo se utilizó *P. aeruginosa* PA14 WT con DMSO y como controles negativos se utilizaron *P. aeruginosa* $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y *P. aeruginosa* $\Delta pscC$ (Apéndice 1). Para este experimento y posteriores SAFA, CDA, curcumina y MBX 1641 fueron disueltos en DMSO. Las moléculas MBX 1641 (inhibidor de SST3) y curcumina fueron utilizar para determinar la actividad coadyuvante de los SAFA.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados para determinar el efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* PA14 WT.

Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis
DMSO	37.5 µL	Curcumina	0.068 µM	Ácido láurico y curcumina	250 µM + 0.068 µM
CDA	3.1 µM		0.34 µM		250 µM + 0.34 µM
Ácido láurico	40 µM		1.7 µM		250 µM + 1.7 µM
	200 µM	MBX 1641	2 µM		500 µM+0.068 µM
	1000 µM		10 µM		500 µM+0.34 µM
Ácido mirístico	40 µM		50 µM		

Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis
	200 μM		4 μM		1000 $\mu\text{M}+0.068$ μM
	1000 μM		20 μM		1000 $\mu\text{M}+0.34$ μM
			100 μM		1000 $\mu\text{M}+1.7$ μM
Ácido mirístico y curcumina	250 μM + 0.068 μM	MBX 1641 + ácido láurico	50 μM + 250 μM	MBX 1641 + ácido mirístico	50 μM + 250 μM
	250 μM + 0.34 μM		50 μM + 500 μM		50 μM + 500 μM
	250 μM + 1.7 μM		50 μM + 1000 μM		50 μM + 1000 μM
	500 $\mu\text{M}+0.068$ μM		100 μM + 250 μM		100 μM + 250 μM
	500 $\mu\text{M}+0.34$ μM		100 μM + 500 μM		100 μM + 500 μM
	500 $\mu\text{M}+1.7$ μM		100 μM + 1000 μM		100 μM + 1000 μM
	1000 $\mu\text{M}+0.068$ μM		200 μM + 250 μM		200 μM + 250 μM
	1000 $\mu\text{M}+0.34$ μM		200 μM + 500 μM		200 μM + 500 μM
1000 $\mu\text{M}+1.7$ μM	200 μM + 1000 μM	200 μM + 1000 μM			

Evaluación de factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Para determinar el efecto en el comportamiento de *P. aeruginosa* PA14 WT cuando es expuesta a moléculas inhibidoras de PQ (IPQ) y moléculas inhibidoras de SST3 (ISST3) como MBX 1641 se evaluó la actividad de los siguientes factores de virulencia.

El modelo lineal que permitió realizar los análisis de varianza de este apartado es:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} : Observación del tratamiento i -ésimo en la j -ésima repetición.

μ : Media general.

τ_i : Tratamiento i -ésimo.

ε_{ij} : Error del tratamiento i -ésimo a la j -ésima repetición.

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se estableció de acuerdo al protocolo de (Pineda-Castellanos et al., 2015). Se adicionó agar Luria-Bertani (LB) al 2 % en placas cuadradas con leche en polvo como indicador para formar halos que resultan de la hidrólisis de la caseína de la leche en una concentración de 10 %. En la placa se realizaron 18 pocillos de un diámetro de 3.8 mm.

Se incubó *P. aeruginosa* PA14 WT previamente ajustada a una D.O_{600 nm} de 0.05 con los tratamientos que se observan en el Cuadro 8 en caldo Luria-Bertani durante 15-16 horas a 36 °C en agitación a 250 rpm.

Cuadro 8. Tratamientos utilizados sobre la actividad proteolítica, hemolítica y producción de pirocianina de *P. aeruginosa* PA14 WT.

Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis
DMSO	37.5 μL	Curcumina	0.068 μM	MBX 1641 + Curcumina	2 μM + 0.068 μM
			0.34 μM		2 μM + 0.34 μM
Ácido láurico	40 μM	MBX 1641	1.7 μM		2 μM + 1.7 μM
	200 μM		2 μM		10 μM+0.068 μM
	1000 μM		10 μM		10 μM+0.34 μM
Ácido mirístico	40 μM		50 μM		10 μM+1.7 μM
	200 μM		4 μM		50 μM+0.068 μM
	1000 μM		20 μM		50 μM+0.34 μM
			100 μM		50 μM+1.7 μM
Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis
MBX + ácido láurico			4 μM + 40 μM	MBX + ácido mirístico	4 μM + 40 μM
			4 μM + 200 μM		4 μM + 200 μM
			4 μM + 1000 μM		4 μM + 1000 μM
			20 μM + 40 μM		20 μM + 40 μM

Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis
		20 μ M + 200 μ M			20 μ M + 200 μ M
		20 μ M + 1000 μ M			20 μ M + 1000 μ M
		100 μ M + 40 μ M			100 μ M + 40 μ M
		100 μ M + 200 μ M			100 μ M + 200 μ M
		100 μ M + 1000 μ M			100 μ M + 1000 μ M

Se centrifugó el cultivo a una velocidad de 10,000 rpm durante tres minutos, y se tomaron 5 μ L del sobrenadante que se agregaron en los pocillos de las placas, para dejarlas incubando a 37 °C durante 16 horas y finalmente se midió el diámetro del halo. El experimento se realizó con tres repeticiones por duplicado, teniendo como unidad experimental los pocillos donde se aplicó el sobrenadante.

Se implementó un diseño completamente al azar y se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. La variable respuesta medida es el diámetro (mm) de los halos formados.

Actividad hemolítica

De manera similar a la actividad proteolítica, para la actividad hemolítica se hicieron placas de agar sangre con 5 % (v/v) de sangre desfibrilada en placas cuadradas con 18 pocillos (3.8 mm) de acuerdo a la metodología propuesta por Rowe & Welch, 1994, para ver la formación de halos característicos de *P. aeruginosa*, que es β -hemólisis y un brillo metálico verdoso, provocado por la producción de pigmentos.

Se incubó *P. aeruginosa* PA14 WT previamente ajustada a una D.O_{600 nm} de 0.05 con sus respectivos tratamientos (Cuadro 8) en caldo Luria-Bertani durante 15-16 horas a 36 °C en agitación a 250 rpm.

Se centrifugó el cultivo a una velocidad de 10,000 rpm durante tres minutos, y se tomaron 5 μ L que se agregaron en los pocillos de las placas, para posteriormente

dejarlas incubando a 37 °C durante 16 horas y finalmente se midió el diámetro del halo. El experimento se realizó con tres repeticiones por duplicado, teniendo como unidad experimental los pocillos donde se aplicó el sobrenadante.

Se implementó un diseño completamente al azar y se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. La variable respuesta es el diámetro (mm) de los halos formados.

Nado bacteriano tipo “swarming”

Para determinar si las moléculas utilizadas tienen impacto en la formación de “swarming”, se siguió la metodología propuesta por (Kollaran et al., 2019) utilizando como medio de cultivo M9, de acuerdo a las concentraciones que se presenta en el Apéndice 2.

Se realizó el medio de cultivo, y se agregaron 3 mL junto con los tratamientos (Cuadro 9) en cada pocillo en una placa de seis pocillos. Después se dejaron secar y se agregaron 5 μ L de cultivo fresco de *P. aeruginosa* PA14 WT (incubación de cuatro horas) en el centro de cada placa y se dejaron secar durante 24 horas. Finalmente se tomaron fotografías, para medir el área de “swarming” en el programa ImageJ.

Cuadro 9. Tratamientos utilizados sobre la motilidad tipo “swarming” y la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* PA14 WT.

Tratamiento	Dosis
DMSO	37.5 μ L
CDA	3.1 μ M
Ácido láurico	40 μ M
	200 μ M
	1000 μ M
Ácido mirístico	40 μ M
	200 μ M
	1000 μ M

Como control positivo se utilizó PA14 WT con DMSO y como controles negativos se utilizaron $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y $\Delta pscC$. Se implementó un diseño completamente al azar y se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. La variable respuesta es el área de formación de “swarming” (cm²).

Piocianina

Se cuantificó la producción de piocianina de acuerdo a la metodología propuesta por (Essar, Eberly, Hadero, & Crawford, 1990) con modificaciones, donde se tomó la absorbancia de piocianina a una D.O._{520 nm} en una solución ácida. Para ello en placas de 24 pocillos, se depositaron 1000 μ L de un cultivo de PA14 WT ajustado a una D.O._{620 nm} de 0.05 junto con los tratamientos que se presentan en el Cuadro 8, y se dejaron incubando durante 15 -16 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm.

Se midió el crecimiento de PA14 WT a una D.O._{600 nm} y después se transfirieron los cultivos a viales de 1.5 mL y se centrifugaron a 10,000 rpm durante tres minutos. Se extrajeron 800 μ L de sobrenadante y se mezclaron con 420 μ L de cloroformo durante dos minutos. Los viales se centrifugaron durante 8 minutos a 13,000 rpm. Se colectó la fase orgánica (cloroformo) y se le añadieron 800 μ L de ácido clorhídrico 0.2 N. Se agitó por un minuto. Se tomaron 650 μ L de la fase acuosa y se añadieron 650 μ L de agua para determinar la absorbancia a 520 nm. Como control positivo se utilizó PA14 WT con DMSO y como controles negativos se utilizaron $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y $\Delta pscC$.

Se implementó un diseño completamente al azar y se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. La variable respuesta es el porcentaje de inhibición de piocianina.

Biopelícula

Se cuantificó la producción de biopelícula de acuerdo al protocolo propuesto por O’Toole, 2010. Se ajustó un cultivo de PA14 a 0.08 a una D.O._{620 nm} y se depositaron 200 μ L del cultivo en una placa de 96 pocillos junto con los tratamientos mencionados en el

Cuadro 9. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C a una agitación de 250 rpm. Posterior al periodo de incubación, se desechó el cultivo, la placa se lavó con agua destilada tres veces y se dejó secando a una temperatura de 40 °C durante 20 minutos. Subsecuentemente se añadieron 200 µL de cristal violeta al 0.1 % en cada pocillo y se dejó en reposo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se removió el cristal violeta de la placa y se realizó un lavado por triplicado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. La placa se secó a temperatura ambiente durante una hora y se suspendió el colorante adherido a la biopelícula con 200 µL de etanol al 80 % por pocillo, el cual fue transferido a una nueva placa para su lectura. Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas a una absorbancia de 570 nm. El experimento fue realizado por triplicado dos veces. Como control positivo se utilizó PA14 WT con DMSO y como controles negativos $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y $\Delta pscC$.

Se implementó un diseño completamente al azar, y se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. La variable respuesta es la absorbancia a una D.O._{570 nm}

Ensayo para evaluar el funcionamiento del SST3

El ensayo de SST3 se realizó de acuerdo con el protocolo reportado por Soto-Aceves et al. (2019) y Toska et al., 2014 con modificaciones. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida SDS al 15 %, las cuales se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y para probar la presencia del efector ExoU se utilizaron anticuerpos policlonales contra anti-ExoU. Las proteínas fueron detectadas usando el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate en películas de rayos X.

Modelo de infección cutánea con *P. aeruginosa*

El experimento se realizó de acuerdo al protocolo de Pletzer et al. (2017), con modificaciones. Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1, de seis a ocho semanas inoculados con PA14 WT y se siguieron las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para

manejo y uso de animales de laboratorio. Previo a la inoculación, se utilizó un cultivo fresco de la bacteria de dos horas, el cual se ajustó a una D.O._{600nm} de 0.08 (1x10⁷ UFC). Se realizaron tres lavados al inóculo con un tampón de fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) y las células fueron suspendidas en 1500 µL de este. A cada tratamiento se le agregaron los tratamientos como se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Tratamientos utilizados sobre la virulencia PA14 WT en un modelo de infección cutánea.

Tratamiento	Dosis
DMSO	37.5 µL
CDA	3.1 µM
	500 µM
Ácido láurico	40 µM
	200 µM
	1000 µM
Ácido mirístico	40 µM
	200 µM
	1000 µM
MBX 1641	20 µM
Ácido láurico + MBX1641	200 µM + 20 µM
<i>ΔlasR/ΔrhIR</i>	10 ⁷ UFC
<i>ΔpscC</i>	10 ⁷ UFC

Para el control positivo se utilizó PA14 WT con DMSO y para los controles negativos se utilizaron las cepas *ΔlasR/ΔrhIR* y *ΔpscC*. Del cultivo suspendido se inocularon 60 µL en cada ratón para producir abscesos y conteos bacterianos reproducibles. El inóculo fue inyectado del lado derecho del dorso debajo del músculo previamente depilado. El proceso de infección fue monitoreado cada 24 horas durante cuatro días. Los abscesos fueron medidos con un vernier los primeros dos días y las áreas necróticas fueron medidas por cuatro días más. Los animales se sacrificaron al cuarto día de infección y se tomaron muestras de lesión e hígado, los cuales fueron

suspendidos en 3 mL de PBS para realizar diluciones seriadas para determinar el grado de infección acorde a la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Se implementó un diseño completamente al azar y se aplicó la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney ($\alpha \leq 0.05$), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Las variables respuestas evaluadas fueron área de absceso (mm^2), área de necrosis (mm^2) y \log UFC/mL.

Para la variable respuesta de mortalidad, se aplicó la prueba no paramétrica Kaplan-Meier ($\alpha \leq 0.05$) con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

VIII. RESULTADOS

Efecto de los SAFA en la viabilidad de *P. aeruginosa*

La adición en los cultivos de ácido láurico y mirístico a una concentración máxima de 1000 μM no afectaron el crecimiento de PA14 en un periodo de 24 horas de incubación (Figura 11B, C). Así mismo, el CDA no afectó la cinética de crecimiento a la concentración de 3.1 μM (Figura 11A). Finalmente, ninguna de las mutaciones en el SPQ y el SST3 interfirieron con la viabilidad de la bacteria (Figura 10A).

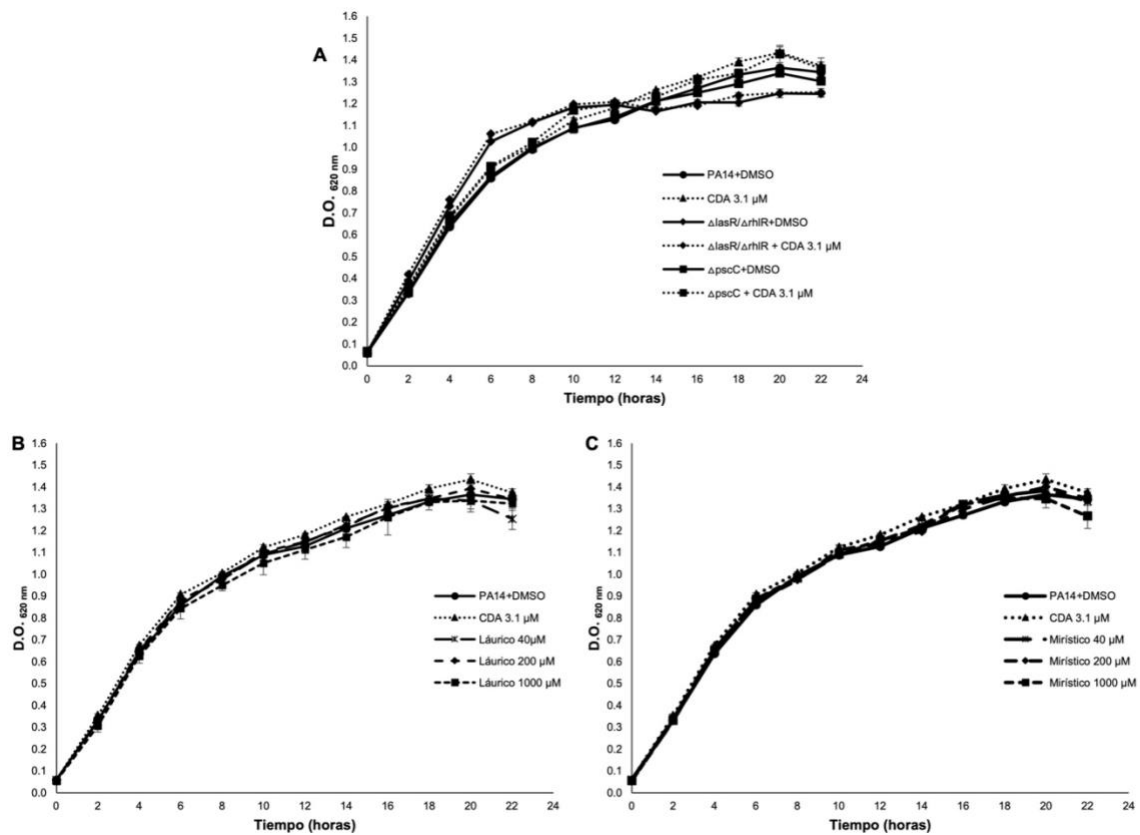


Figura 11. Efecto de los AG en el crecimiento de PA14. **A)** Ácido *cis*-2-decenoico (CDA), **B)** ácido láurico y **C)** ácido mirístico. En **(A)** también, se muestra el efecto de las mutaciones en los SPQ basado en autoinductores del tipo de las *N*-acil homoserina lactonas ($\Delta lasR/\Delta rhIR$) y SST3 ($\Delta pscC$).

Efecto de los SAFA sobre la producción de factores de virulencia

Actividad proteolítica y hemolítica

P. aeruginosa produce elastasas LasA y LasB, proteasa alcalina y proteasa W, las cuales juegan un papel importante durante la infección del patógeno (Schweizer & Choi, 2011). Se observó una ligera inhibición en la actividad proteolítica, registrándose el mayor efecto con el ácido láurico a una concentración de 40 μM (26.61 %) y el ácido mirístico a una concentración de 1000 μM (10.07 %), no obstante, no fueron estadísticamente significativas (Figura 12A).

La secreción de fosfolipasa C hemolítica tiene una importancia relevante en *P. aeruginosa*, al tener la capacidad de disminuir la actividad de las células neutrófilas en el hospedero, con lo que da paso a su establecimiento (Terada et al. 1999). En este estudio, los tratamientos que presentaron mayor inhibición sobre la actividad hemolítica de *P. aeruginosa* fueron el ácido láurico a 40 μM (15.47 %) y el ácido mirístico a 1000 μM (18.57 %) (Figura 12B); sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico, las diferencias no fueron significativas con respecto al control.

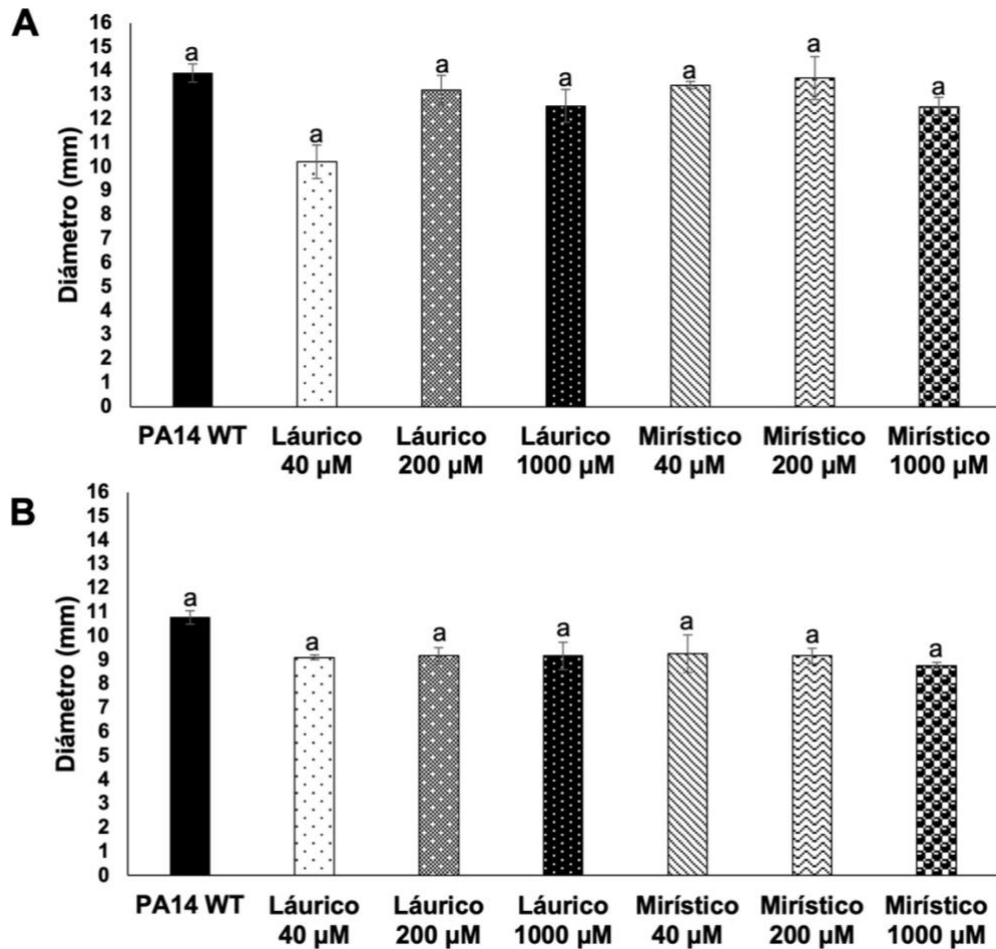


Figura 12. Efecto de ácido láurico y mirístico sobre la actividad hemolítica (A) y proteolítica (B) de PA14. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y se muestran los errores estándar de las medias.

Producción de piocianina

La piocianina es una fenazina producto del metabolismo secundario de *P. aeruginosa*, la cual provoca el estrés oxidativo de las células hospederas y actúa como un sideróforo (Hall et al., 2016; Jayaseelan, Ramaswamy, y Dharmaraj, 2014). Los ácidos láurico y mirístico redujeron su producción, aunque no lo hicieron de manera dosis respuesta. Para el caso del ácido láurico, la máxima inhibición registrada fue de 51.2 % a la concentración de 40 μ M, mientras que del ácido mirístico fue de 65.4 % a la misma

concentración (Figura 13). De manera interesante, el efecto no aumentó en las concentraciones más altas.

Para el caso del CDA se inhibió la producción de piocianina en un 71.2 % a 3.1 μM (Figura 13), mientras que la cepa mutante $\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ redujo la producción de piocianina en un 91.7 % (Figura 13).

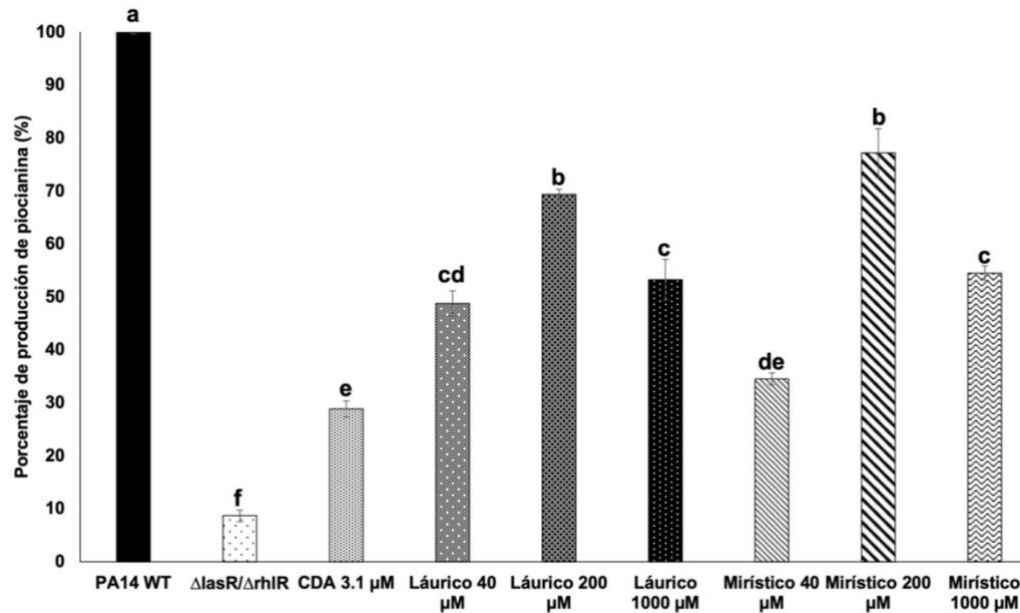


Figura 13. Efecto de los ácidos grasos láurico, mirístico y CDA en la producción de piocianina. CDA: ácido *cis*-2-decenoico, $\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$: cepa mutante de SPQ. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y el error estándar de la media.

Movilidad tipo swarming

El ácido láurico inhibió el nado bacteriano tipo swarming de manera dosis respuesta, con un 52.9 % a 40 μM , 71.6 % a 200 μM y 91 % con 1000 μM . Mientras que el ácido mirístico mostró una reducción máxima del 90 % a la concentración de 40 μM (Figura 14), valor similar al mostrado por la cepa mutante $\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ en el que se redujo

en un 95 % (Figura 14). Por otra parte, el CDA no inhibió el nado a una concentración de 3.1 μM , efecto similar al exhibido por la cepa mutante de $\Delta pscC$ (Figura 14).

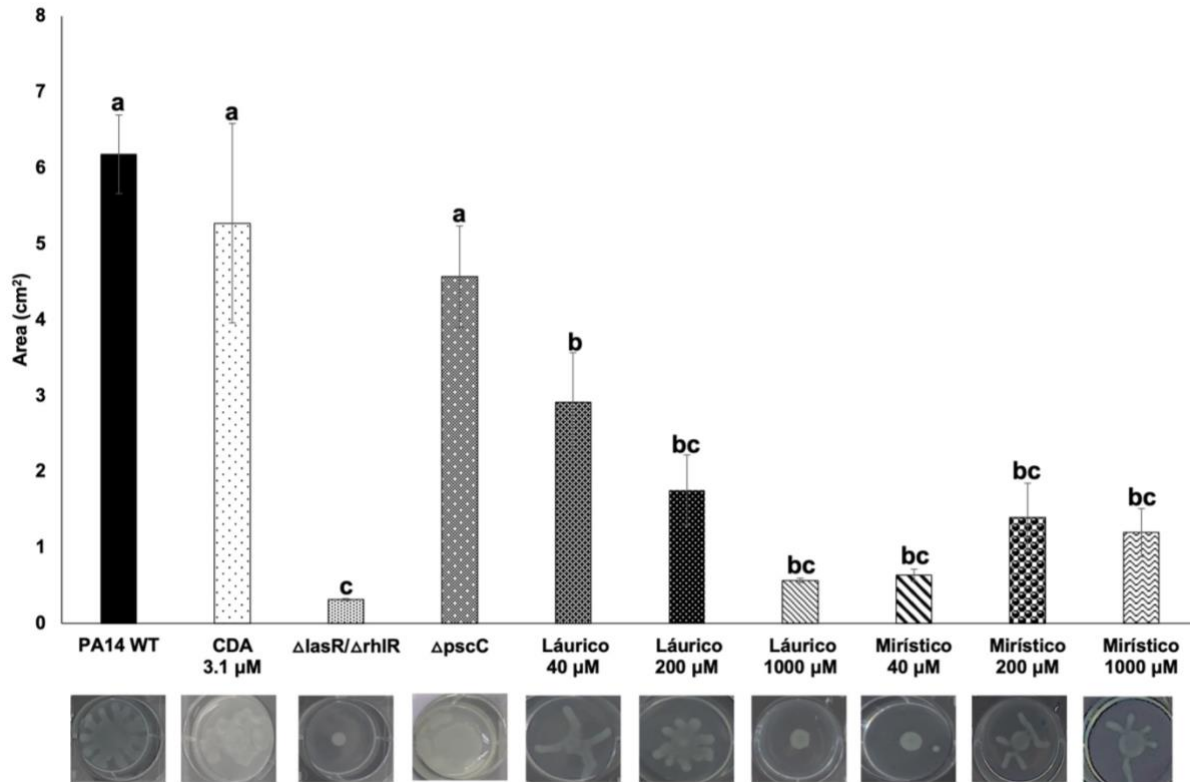


Figura 14. Efecto de los ácidos grasos láurico, mirístico y CDA en la motilidad tipo swarming. CDA: ácido *cis*-2-decenoico, $\Delta lasR/\Delta rhIR$: cepa mutante de SPQ, $\Delta pscC$: mutante de SST3. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y el error estándar de la media.

Producción de biopelícula

El CDA a 3.1 μM inhibió la formación de biopelícula en 52.6 %, mientras que la cepa mutante $\Delta lasR/\Delta rhIR$ se redujo en un 40.5 % y la $\Delta pscC$ en 31.48 % (Figura 15). Para el caso del ácido láurico, aunque se registró una inhibición de 18.6 % y 19.7 % a 40 y 1000 μM respectivamente, esta no fue estadísticamente significativa.

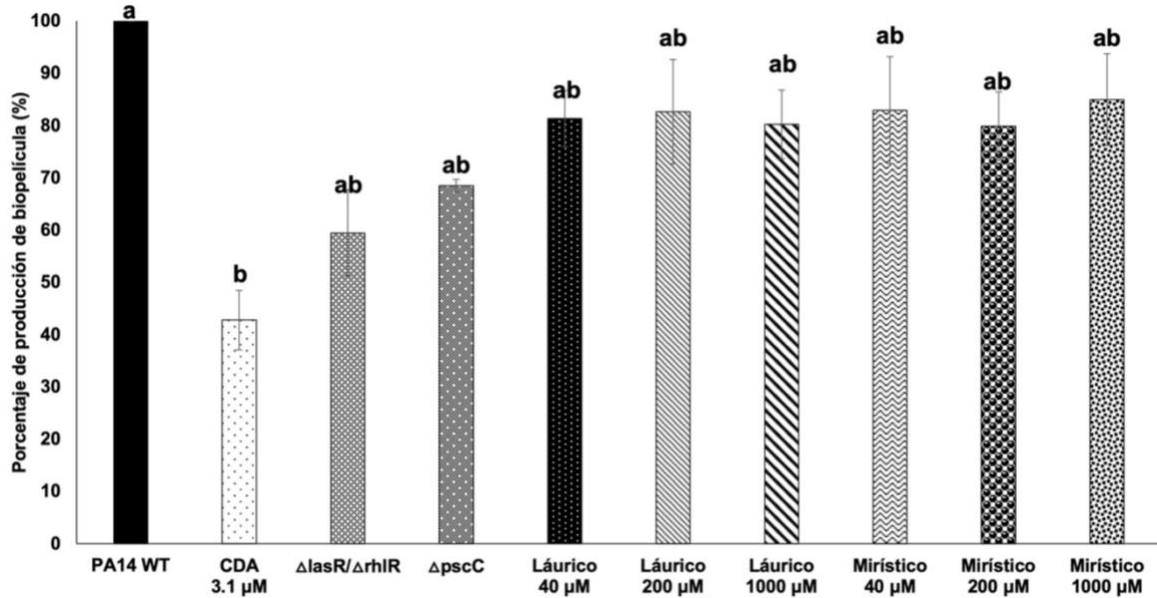


Figura 15. Efecto de los ácidos láurico y mirístico sobre la producción de biopelícula. CDA: ácido *cis*-2-decenoico, $\Delta lasR/\Delta rhIR$: cepa mutante de SPQ, $\Delta pscC$: mutante de SST3. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los grupos dados por la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los resultados mostrados son las medias de tres repeticiones y el error estándar de la media.

Efecto de los SAFA:C12-18 y CDA sobre secreción de ExoU

El SST3 es determinante en la virulencia de *P. aeruginosa* y aunque aún no se ha elucidado completamente su relación con la PQ, es un sistema altamente complejo que contribuye al establecimiento de la bacteria en su hospedero (Trastoy-Pena et al., 2019). En este trabajo, se evaluó el efecto de los SAFA: C12-18 en la producción del efector ExoU, proteína clave en la formación de absceso observado en modelos murinos (Berube et al., 2017). A través de un análisis de Western Blot se observó que los SAFA: C12-18 tienen la capacidad de inhibir la secreción del efector ExoU en función al largo de cadena. El ácido láurico inhibió su secreción con 100 μM (Figura 16A), mientras que el ácido mirístico lo hizo a 200 μM (Figura 16B). Sin embargo, el ácido palmítico y esteárico solo lograron reducir la secreción del efector a la misma concentración (Figura 16B).

De manera interesante, el CDA muestra una ligera inhibición desde una concentración de 0.6 μM , y una completa inhibición desde 50 μM en adelante (Figura 16C).

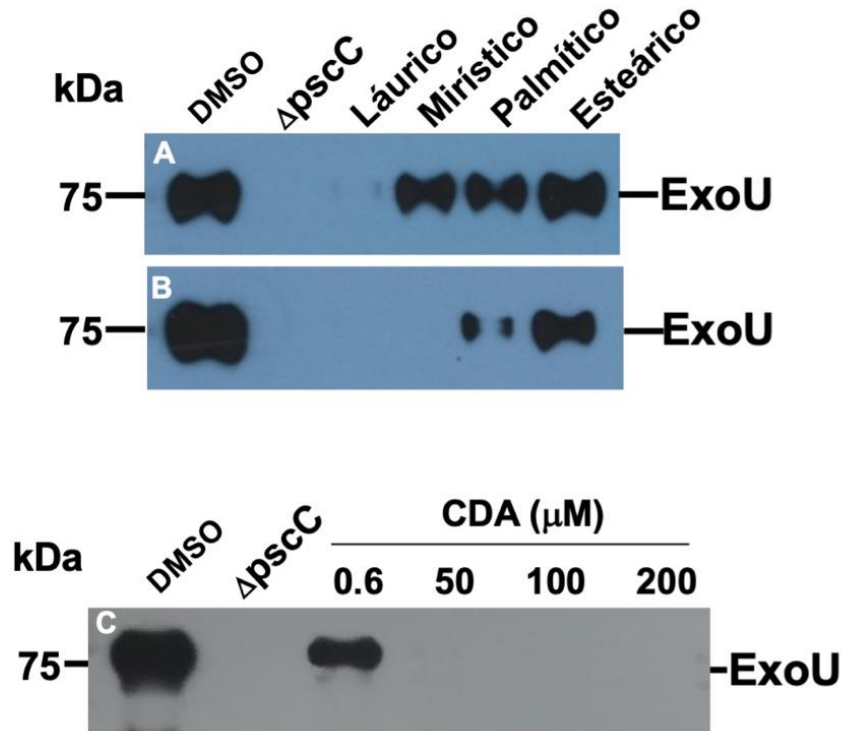


Figura 16. Efecto de SAFA: C12-18 y CDA en la secreción de la proteína ExoU en PA14. SAFA 100 μM (A) y 200 μM (B). C, CDA a diferentes concentraciones. La proteína efectora ExoU, fue detectado por un ensayo de “Western Blotting”. ExoU extraída de *P. aeruginosa* PA14 se uso como control positivo y ΔpscC es el control negativo.

Ensayos *in vivo*

Efecto del ácido láurico y mirístico sobre la patogenicidad de P. aeruginosa

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* indicaron que el ácido láurico (C12:0) y el ácido mirístico (C14:0) exhiben propiedades inhibitoras de virulencia en algunos factores regulados por PQ (producción de piocianina y swarming), así como sobre la secreción del efector ExoU por el SST3. Para analizar el posible efecto benéfico

de estos AG en la inhibición de los procesos infecciosos *in vivo*, se empleó un modelo de infección cutánea con *P. aeruginosa* en ratón (Pletzer et al. 2017).

La inoculación intramuscular de PA14 (10^7 UFC) indujo un absceso de tamaño promedio de 171.9 mm² a las 24 h y un área necrótica de 10.1 mm² a las 96 h. También, se registró un establecimiento en la zona de infección de $\log 7$ UFC/g, una dispersión sistémica de $\log 0.7$ UFC/g y una reducción en la supervivencia del 71.4 % (Cuadro 11).

Por otro lado, en comparación con los grupos tratados con las cepas mutantes estos valores promedio se ven reducidos. Con $\Delta lasR/\Delta rhIR$ la formación de absceso fue de 120.4 mm² ($\alpha \leq 0.05$) y de necrosis de 5.3 mm², con un establecimiento en el área de infección de $\log 4.5$ UFC/g y una dispersión sistémica de $\log 0.6$ UFC/g, así como una supervivencia del 81 % (Cuadro 11).

En cuanto a la cepa $\Delta pscC$ fue la que mostró la menor virulencia de todo el estudio, debido a que únicamente indujo un promedio de absceso de 42.7 mm² ($\alpha < 0.01$), no se generó necrosis ($\alpha < 0.01$) y no se registró la presencia de la bacteria en la zona de inoculación ($\alpha < 0.01$); además, de que se presentó el 100 % de supervivencia de los animales (Cuadro 11).

Por otra parte, y contrario a lo esperado la inoculación intramuscular de los grupos tratados con el ácido láurico y mirístico mostraron una tendencia para favorecer el establecimiento y el daño causado por la cepa de *P. aeruginosa* PA14. El grupo tratado con ácido láurico a 1000 μ M indujo un absceso promedio de 201.3 mm² y un área necrótica de 45.9 mm² ($\alpha < 0.05$), con una supervivencia del 50 % (Cuadro 11).

El ácido mirístico a 200 μ M indujo un área necrótica de 31.1 mm² ($\alpha < 0.05$) y una dispersión sistémica de $\log 3.23$ UFC/gr ($\alpha < 0.01$), superior a la observada en la cepa silvestre sin tratamiento. Mientras que a una concentración de 1000 μ M indujo un absceso promedio de 230.4 mm² ($\alpha < 0.01$), así como una mayor dispersión sistémica de $\log 2.9$ UFC/gr ($\alpha < 0.01$). También, de manera general se registró una supervivencia promedio del 60 % de las tres concentraciones de ácido mirístico (Cuadro 11).

Es importante señalar, que para descartar que el efecto negativo exhibido *in vivo* por los ácidos láurico y mirístico pudiera atribuirse a un proceso causado únicamente por los AG, se evaluó su efecto en el modelo animal sin la presencia de la bacteria. Ninguno

indujo inflamación, necrosis o alteración en el área donde se inyectaron intramuscularmente (Figura 17).

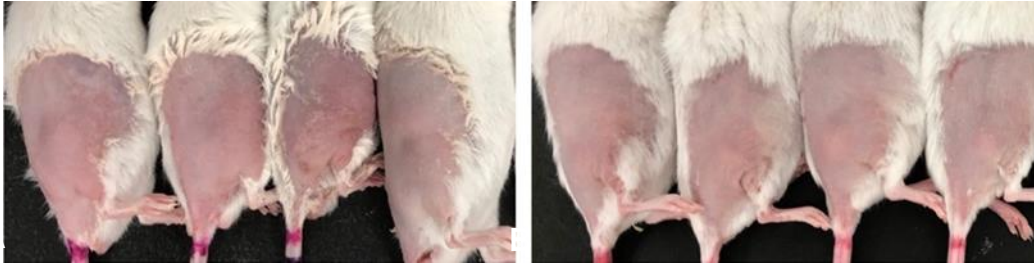


Figura 17. Áreas de inoculación después de la inyección intramuscular del ácido láurico (A) y mirístico (B) a una concentración de 200 μ M sin *P. aeruginosa* PA14.

Dicho lo anterior, para comprobar que el efecto de estimulación de la virulencia *in vivo* en presencia de los ácidos láurico y mirístico está relacionado con vías de señalización de los SPQ y SST3 y no con algún otro mecanismo no evaluado en los ensayos, se analizó el efecto de los SAFA de estudio en las cepas mutantes $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y $\Delta pscC$.

Cuadro 11. Efecto de ácido láurico y ácido mirístico (μM) en el modelo de infección cutánea.

Cepa + tratamiento	Area de absceso (media + E.E mm ²)	Area de dermonecrosis (media+E.E. mm ²)	log of UFC/g de lesión infectada	log of UFC/g de hígado infectado	Supervivencia (%)
PA14 WT	171.9 ± 1.14	10.1 ± 3.6	7.0 ± 1.3	0.7 ± 0.3	71.4
$\Delta lasR/\Delta rhIR$	120.4 ± 25.7*	5.3 ± 2.8	4.5 ± 1.2	0.6 ± 0.3	81
$\Delta pscC$	42.7 ± 15.1**	0 ± 0**	0 ± 0**	0.3 ± 0.3	100
Láurico 40	182.2 ± 9.3	17.3 ± 6.3	7.8 ± 0.8	2.2 ± 0.9	50
Láurico 200	149.3 ± 17.5	26.6 ± 8.3	7.3 ± 0.9	1.7 ± 0.7	90
Láurico 1000	201.3 ± 17.7	45.9 ± 17.4*	7.0 ± 1.8	0.3 ± 0.3	50
Mirístico 40	191.6 ± 39.8	11.5 ± 4.8	7.5 ± 0.4	1.6 ± 1.0	50
Mirístico 200	178.9 ± 22.5	31.1 ± 4.5*	8.0 ± 0.3	3.3 ± 0.6**	70
Mirístico 1000	230.4 ± 21.2*	28.8 ± 7.0	8.5 ± 0.1	2.9 ± 0.6**	60

Los asteriscos indican el nivel de significancia de los tratamientos dado por la prueba no paramétrica U Mann-Whitney ($^*\alpha < 0.05$, $^{**}\alpha < 0.01$). El área el absceso se determinó a las 24 hrs mientras que el resto de los parámetros a las 48 hrs post-inoculación. Los resultados mostrados son las medias de al menos dos repeticiones con cinco ratones por grupo. *P. aeruginosa* PA14 con SPQ bloqueado ($\Delta lasR/\Delta rhIR$) y SST3 ($\Delta pscC$) fueron usadas como control negativo.

Efecto del ácido láurico y mirístico sobre la patogenicidad de P. aeruginosa $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y $\Delta pscC$

Para evaluar si en el efecto de estimulación de la virulencia del ácido láurico y mirístico registrada en el ensayo *in vivo* participa el SPQ o el SST3, se evaluó el efecto de estos ácidos grasos en la activación de virulencia de las cepas $\Delta lasR/\Delta rhIR$ y $\Delta pscC$.

En este ensayo, la inoculación intramuscular (10^7 UFC) de *P. aeruginosa* PA14 indujo un absceso con un área promedio de 22.4 mm² a las 24 horas. En un periodo de 96 horas, se desarrolló un área de necrosis promedio de 6.4 mm², un establecimiento promedio de *log* 4.5 UFC/g en la zona de infección, una dispersión sistémica de *log* 0.8 UFC/g y una reducción en la supervivencia del 50 % (Cuadro 10). Mientras que, con las cepas mutantes, como se esperaba, se registró una disminución en la virulencia y el daño causado en los animales. La cepa mutante $\Delta lasR/\Delta rhIR$, indujo la formación de absceso promedio de 9.6 mm², así como un área necrótica promedio de 0.2 mm², pero no se registró el establecimiento en el área de infección ($\alpha < 0.05$) ni dispersión sistémica, además de que hubo un 100 % de supervivencia (Cuadro 12). Para el caso de la cepa mutante $\Delta pscC$, indujo la formación de absceso en un área promedio de 5.9 mm² ($\alpha < 0.05$) y una dispersión sistémica promedio de *log* 0.7 UFC/g de hígado, además de obtener una supervivencia del 100 % (Cuadro 12).

Para el caso de las cepas mutantes tratadas con 200 μ M de ácido láurico y mirístico, no se registró un aumento significativo de la virulencia (Cuadro 12), lo que nos indica que la estimulación observada en la cepa silvestre (Cuadro 11), por estos ácidos grasos, están involucrados tanto el SPQ como el SST3.

Cabe señalar que cuando el SST3 está activo ($\Delta lasR/\Delta rhIR$) se registró un ligero aumento en la virulencia en presencia de ácido láurico a 200 μ M, con un área necrótica promedio de 0.7 mm² y el establecimiento en el área de infección de *log* 1.1 UFC/g, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Cuadro 12). Del mismo modo, en presencia de ácido mirístico a 200 μ M, la mutante $lasR/\Delta rhIR$ presentó un área necrótica promedio de 0.8 mm², un establecimiento en el área de infección promedio de *log* 3.3 UFC/g, una dispersión sistémica de *log* 0.6 UFC/g y una supervivencia del 83.3 %. De igual manera, este ligero aumento en la virulencia no fue

estadísticamente significativa en comparación al grupo infectado con la cepa mutante sin ácido graso (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto de ácidos grasos (μM) en el modelo de infección cutánea con cepas mutantes.

Cepa + tratamiento	Area de absceso (media \pm E.E mm ²)	Area de dermonecrosis (media \pm E.E mm ²)	log of UFC/g de lesion infectada	log of UFC/g de hígado infectado	Supervivencia (%)
PA14 WT	22.4 \pm 22.4	6.4 \pm 5.6	4.5 \pm 2.4	0.8 \pm 0.8	50
$\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$	9.6 \pm 9.6	0.2 \pm 0.2	0 \pm 0*	0 \pm 0	100
$\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ láurico 200	1.4 \pm 1.4*	0.7 \pm 0.7	1.1 \pm 1.1	0 \pm 0	100
$\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ mirístico 200	0 \pm 0*	0.8 \pm 0.4	3.3 \pm 1.3	0.6 \pm 0.6	83.3
ΔpscC	5.9 \pm 5.9*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0.7 \pm 0.7	100
ΔpscC láurico 200	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0	100
ΔpscC mirístico 200	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0	100

P. aeruginosa PA14 con SPQ bloqueado ($\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$) y SST3 (ΔpscC), fueron usadas como control negativo. El área el absceso de determinó a las 24 hrs mientras que el resto de los parámetros a las 48 hrs post-inoculación. Los asteriscos indican el nivel de significancia de los tratamientos dado por la prueba no paramétrica U Mann-Whitney (* $\alpha < 0.05$, ** $\alpha < 0.01$). Los resultados mostrados son las medias de seis ratones por grupo

El CDA reduce el daño causado por P. aeruginosa in vivo

Para conocer si se produce un efecto similar al de los SAFA evaluados en la cepa PA14, se realizó un ensayo *in vivo* en presencia de CDA. La inoculación intramuscular de la bacteria indujo un absceso de tamaño promedio de 332.4 mm² en un periodo de 24 horas y un área necrótica de 11.5 mm² en 96 horas. Se registró un establecimiento de *log* 5.8 UFC/g en la zona de infección y una reducción en la supervivencia de 66.7 % (Cuadro 13).

En presencia de la molécula CDA se registró que a una concentración de 500 µM la supervivencia fue del 100 % ($\alpha = 0.08$), no presentó absceso (Figura 18), tuvo un área necrótica de 0.4 mm² correspondiente a una reducción del 96.5 % ($\alpha < 0.01$) respecto a PA14 en un periodo de 96 horas, no presentó UFC en la zona de infección ($\alpha < 0.01$) y tuvo una dispersión de *log* 0.9 UFC/g (Cuadro 13). Es importante mencionar que, de acuerdo con el conteo bacteriano inicial, la presencia de CDA a mayor concentración tuvo un ligero efecto en la reducción del crecimiento de PA14, aunque no fue estadísticamente significativo.

La inoculación de *P. aeruginosa* con CDA a una concentración de 3.1 µM registró una supervivencia del 75 %, un área de absceso de 253.6 mm², un área de necrosis de 7.8 mm², un *log* 4.5 UFC/g en el establecimiento de la infección y no presentó dispersión de la bacteria. Aunque hubo una ligera disminución, los datos no son estadísticamente significativos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Influencia del CDA sobre la patogenicidad de PA14 en un modelo de infección cutánea.

Tratamiento	Absceso (mm ² , media ± E.E.)	Necrosis (mm ² , media ± E.E.)	log de UFC/g		Supervivencia (%)
			Lesión	Hígado	
PA14 WT	332.4 ± 59	11.5 ± 5.3	5.8 ± 1.2	0 ± 0	66.7
PA14 + CDA (μM)					
3.1	253.6 ± 39.8	7.8 ± 3.1	4.5 ± 1.4	0 ± 0	75
500	0 ± 0**	0.4 ± 0.2**	0 ± 0**	0.9 ± 0.9	100

El área de absceso fue determinada a las 24 h y el área necrótica a las 48 h. Los tejidos infectados y el hígado fueron recolectados y homogeneizados después de 96 h de infección para obtener log UFC/g del tejido. Los asteriscos indican el nivel de significancia de los tratamientos dado por la prueba no paramétrica U Mann-Whitney (* $\alpha < 0.05$, ** $\alpha < 0.01$). Los resultados mostrados son las medias de ocho ratones por grupo.

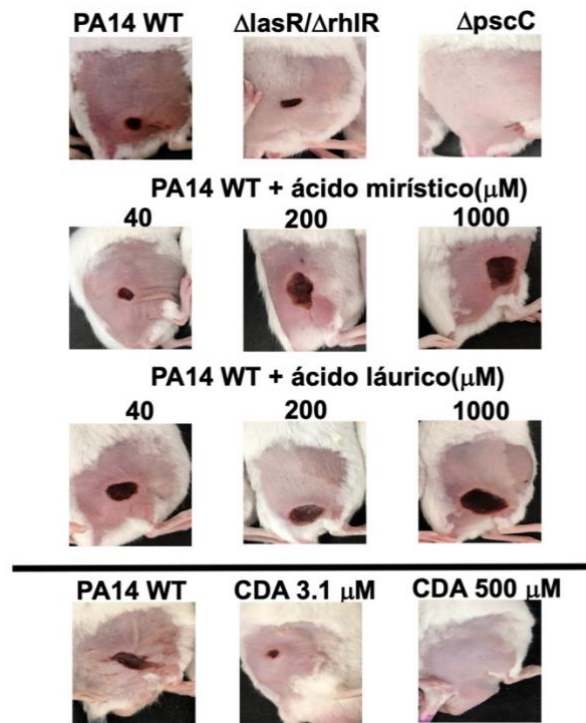


Figura 18. Imágenes representativas del efecto del ácido láurico, ácido mirístico y CDA en un modelo de infección cutánea. *P. aeruginosa* PA14 y cepas mutantes de SPQ ($\Delta lasR/\Delta rhIR$) y de SST3 ($\Delta pscC$).

Efecto en la virulencia de SAFA en combinación con inhibidores de PQ y SST3

Los resultados indican que los SAFA tienen un papel importante en la expresión de la virulencia en *P. aeruginosa* que aún no ha sido comprendido en su totalidad. La evidencia previa (Inoue et al. 2008; Davies y Marques, 2009; Abd-Alla et al. 2011; Rahmani-Badi et al. 2015) y los resultados obtenidos en esta investigación, nos indican un efecto de los SAFA en la reducción de virulencia en los ensayos *in vitro*; sin embargo, este es el primer estudio que reporta un efecto antagónico en un modelo *in vivo*, en el que el ácido láurico y el mirístico favorecen el establecimiento y el daño en los animales.

Ante esta disyuntiva, nos interesamos en investigar cómo pueden interferir los SAFA en la eficiencia de algunas moléculas antivirulencia como son inhibidores de SPQ y SST3. Para esta parte de la investigación, seleccionamos un derivado sintético de la fenoxiacetamida denominada MBX1641, que de acuerdo con reportes previos tienen la capacidad de inhibir el SST3 de *P. aeruginosa* (Aiello et al. 2010), así como un producto natural inhibidor de PQ la curcumina, compuesto fenólico extraído de la curcuma (Rudrappa y Bias, 2008).

Efecto de la combinación de SAFA con curcumina y MBX 1641 en el crecimiento de P. aeruginosa

Para evaluar el efecto en el crecimiento de las distintas combinaciones se realizaron curvas de crecimiento con los distintos tratamientos de forma individual (curcumina (0.068 μ M, 0.34 μ M, 1.7 μ M), MBX 1641 (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M), ácido láurico y ácido mirístico (40 μ M, 200 μ M, 1000 μ M) y sus correspondientes combinaciones.

En el caso de curcumina (Figura 19 A y B), se observó un ligero retraso en el crecimiento, sobre todo de forma individual a una concentración de 0.068 μ M, sin embargo al final de la fase logarítmica, este comportamiento se regulariza con el de los otros tratamientos; en cuanto a su combinación con los SAFA, es evidente que el efecto sobre el crecimiento es menor con el uso del ácido mirístico (Figura 19B) en cualquier

concentración, que con el ácido láurico (Figura 19A) que retrasó ligeramente el desarrollo en cualquier concentración con la curcumina a 0.34 μM .

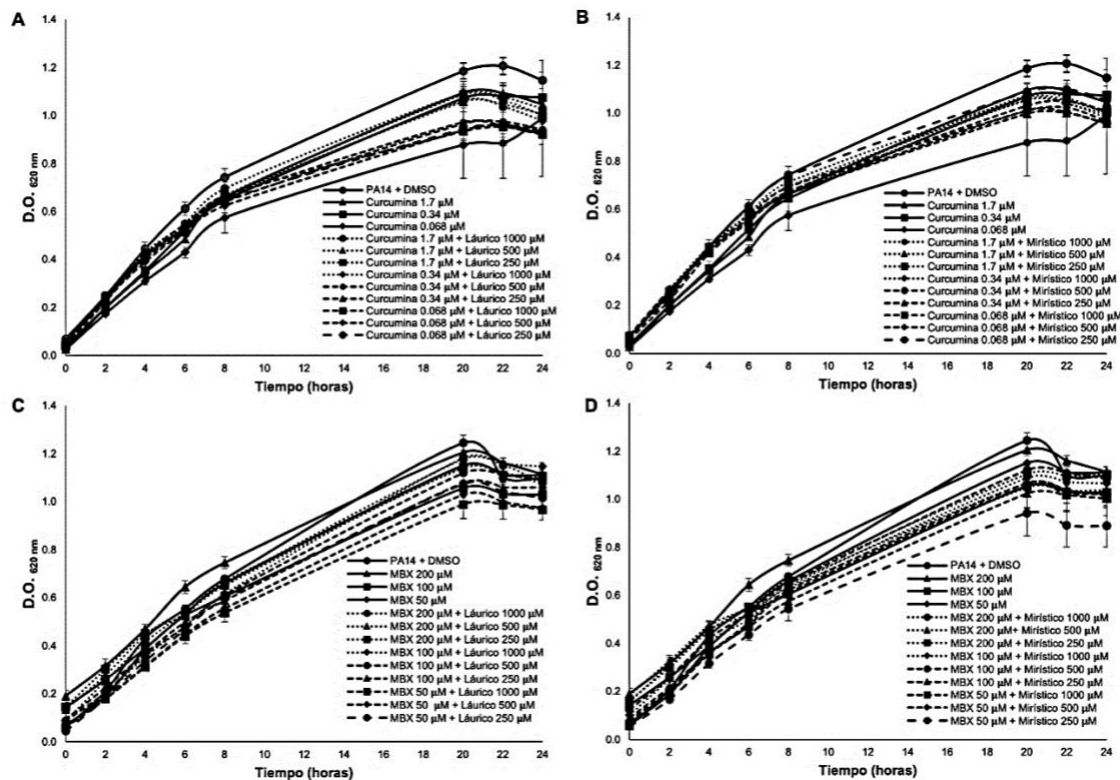


Figura 19. Efecto en el crecimiento de las distintas combinaciones con inhibidores de virulencia y SAFA. **A)** ácido láurico con curcumina, **B)** ácido mirístico con curcumina, **C)** ácido láurico con MBX 1641 y **D)** ácido mirístico con MBX1641.

La combinación de las moléculas de SAFA con MBX 1641, tienen un menor retraso en el crecimiento que el observado con curcumina; sin embargo, en todos los casos mencionados, estos cambios no fueron significativamente diferentes al observado en *P. aeruginosa* PA14. Por consiguiente, se evaluó el efecto de la curcumina y los ácidos láurico y mirístico a diferentes concentraciones subinhibitorias y en combinación con la molécula MBX 1641, en la producción de factores de virulencia regulados por PQ como son plicianina, elastasa y proteasa.

Efecto de la combinación de MBX 1641 con curcumina y SAFA en la producción de piocianina in vitro

Hasta el momento no se había investigado el efecto de la combinación de distintas moléculas antivirulencia en la reducción de factores implicados en el establecimiento y el daño de *P. aeruginosa*. En estos ensayos se analizaron el efecto de la combinación de un inhibidor de SST3 (MBX 1641) con inhibidores de PQ (curcumina y SAFA) en la producción de distintos factores de virulencia.

Cabe señalar, que únicamente se registraron efectos sinérgicos en la inhibición de piocianina, mientras que con la actividad hemolítica y proteolítica no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (Apéndice 3 y 4).

En la combinación de curcumina con MBX 1641 se observó un efecto hormético, debido a que a dosis bajas (0.068 μM /2 μM) se inhibió la producción de piocianina en 52.6 % ($\alpha < 0.01$) (Figura 20C), lo que equivale a un aumento del 40 % (Figura 20D) en relación con su efecto de forma individual (Figura 20A y B).

De manera contraria, la combinación a concentraciones intermedias (MBX 1641 10 μM /curcumina 0.34 μM) inhibió en menor grado la producción de la piocianina en un promedio de 10.7 % ($\alpha < 0.01$) (Figura 20C). Esto equivale a un 37.5 % (Figura 20D) menos que su efecto mostrado de manera individual, con ello mostrando un efecto antagónico (Figura 20A y B).

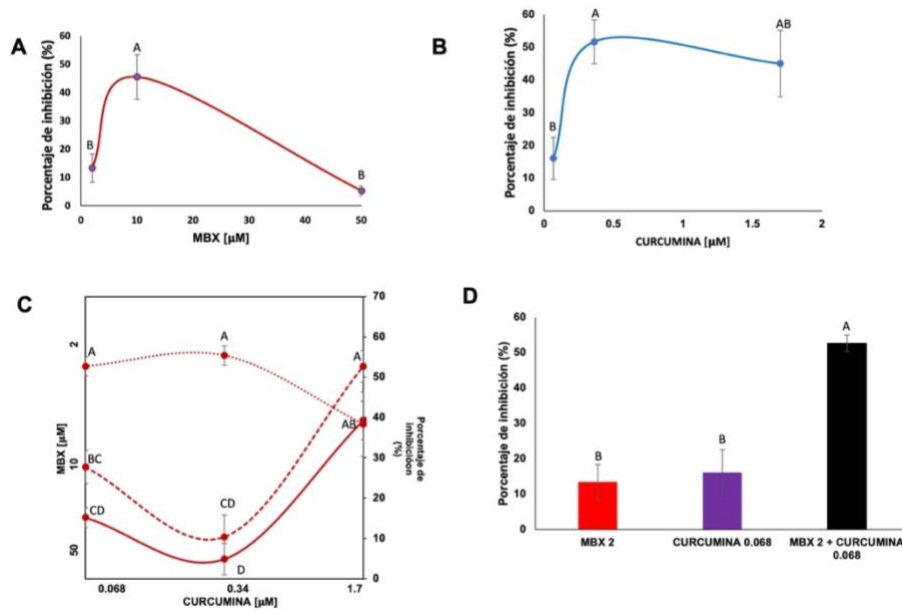


Figura 20. Efecto de MBX 1641 y curcumina en la producción de piocianina de PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX1641 (A), curcumina (B), la actividad de las distintas combinaciones (C) y diagrama de barras que ejemplifica combinaciones con mayor sinergia (D). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$).

La combinación de ácido mirístico con MBX 1641 tuvo efectos sinérgicos en la mayoría de los tratamientos sobre la inhibición de la piocianina. La combinación registrada con MBX1641 a una concentración de 4 μM y cualquier concentración utilizada de ácido mirístico tuvieron los mayores efectos sinérgicos (Figura 21C). Destaca la combinación con ácido mirístico a 1000 μM y 40 μM que potencializaron el efecto en un promedio de 56.7 % y 52.7 % ($\alpha < 0.01$) respectivamente (Figura 21C y D) y en comparación con su actividad individual (Figura 21A y B).

Por otro lado, cuando la concentración de MBX1641 aumentó, la actividad inhibitoria disminuyó, incluso mostrando efectos antagónicos, como el observado en la combinación de 20 μM de MBX 1641 y 200 μM de ácido mirístico (13.57 %) reduciendo su efecto un promedio de 15.18 % en comparación con sus tratamientos individuales (Figura 21C).

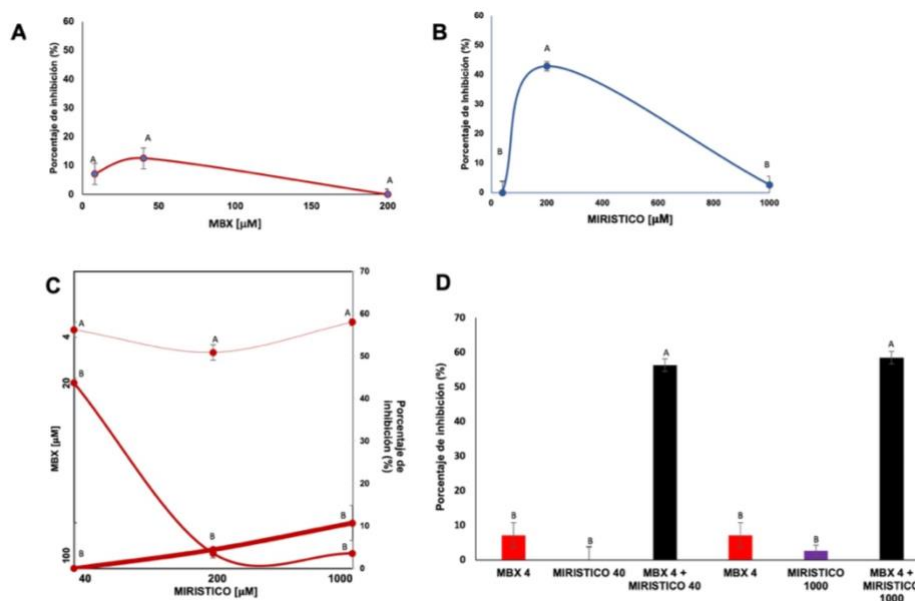


Figura 21. Efecto de MBX 1641 y ácido mirístico en la producción de piocianina de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (A), ácido mirístico (B), la actividad de las distintas combinaciones (C) y diagrama de barras que ejemplifica combinaciones con mayor sinergia (D). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$)

La combinación de ácido láurico con MBX tuvo una inhibición promedio máxima de piocianina del 45.53 % a una concentración de ácido láurico de 200 μM y de MBX de 20 μM ($\alpha = 0.01$) (Figura 22C, D), aumentando en promedio un 36 % con respecto a sus tratamientos individuales (Figura 22A y B). Es importante mencionar que cuando se aumentó o redujo la concentración tanto de MBX 1641 como de ácido láurico, el efecto inhibitorio se perdió, además resulta menor que el observado en los tratamientos individuales.

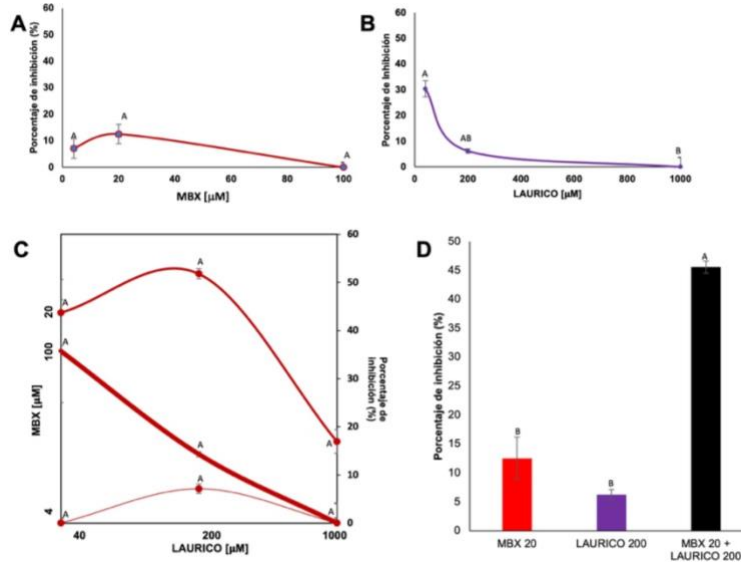


Figura 22. Efecto de MBX 1641 y ácido láurico en la producción de piocianina de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (A), ácido láurico (B), la actividad de las distintas combinaciones (C) y diagrama de barras que ejemplifica combinaciones con mayor sinergia (D). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha < 0.01$).

Efecto de la combinación de ácido láurico y MBX 1641 en un modelo de infección en ratones

De acuerdo con los resultados obtenidos el efecto inhibitorio de la producción de algunos factores de virulencia *in vitro* se presentó a determinadas concentraciones y combinaciones. Mientras que en otras se reduce o incluso pueden presentarse efectos antagónicos. Haciendo un análisis de los efectos sinérgicos de las combinaciones sobre los distintos factores de virulencia estudiados (principalmente la inhibición de piocianina) los mejores tratamientos fueron el ácido láurico a 200 μM en presencia de MBX 1641 a 20 μM , ácido mirístico a 40 μM en presencia de MBX 1641 a 20 μM y ácido mirístico a 1000 μM en presencia de MBX 1641 a 4 μM (Ver información de apéndices 3 en adelante).

Es importante mencionar que, aunque los efectos sinérgicos encontrados en algunos tratamientos en presencia de curcumina fueron benéficos, se encontró que dicha molécula pertenece al tipo de químicos conocidos como moléculas PAINS (pan assay

interference compounds) que son conocidos por tener inestabilidad en modelos biológicos y obtener falsos positivos a nivel *in vitro* (Baell, Ferrins, Falk, & Nikolakopoulos, 2013; Nelson et al., 2017), por lo que se descartó del estudio.

Por ello, se decidió evaluar la combinación de 200 μ M de ácido láurico con 20 μ M de MBX 1641 en el modelo animal con ratones de la cepa CD1. Como se observa en la Figura 23 y contrario a lo esperado, la combinación de ácido láurico y MBX 1641 registró una disminución en la supervivencia del 80 % ($\alpha = 0.01$) (Figura 23B). También, aumentó la formación de absceso en un 1458 % ($\alpha < 0.01$) (Figura 24A) y la necrosis en un 2828 %, aunque esta última no resultó significativa debido a que solo sobrevivió un animal al final del ensayo (Figura 23A y B).

En el mismo contexto, la presencia de la bacteria tanto en la zona de establecimiento como en la zona de dispersión aumentó 3.35 log UFC/g y 3.38 log UFC/g respectivamente (Figura 24C y D). Los tratamientos individuales de MBX 1641 y ácido láurico presentaron un ligero estímulo con respecto a la cepa PA14. No obstante, ninguno de estos tratamientos fue estadísticamente significativo.

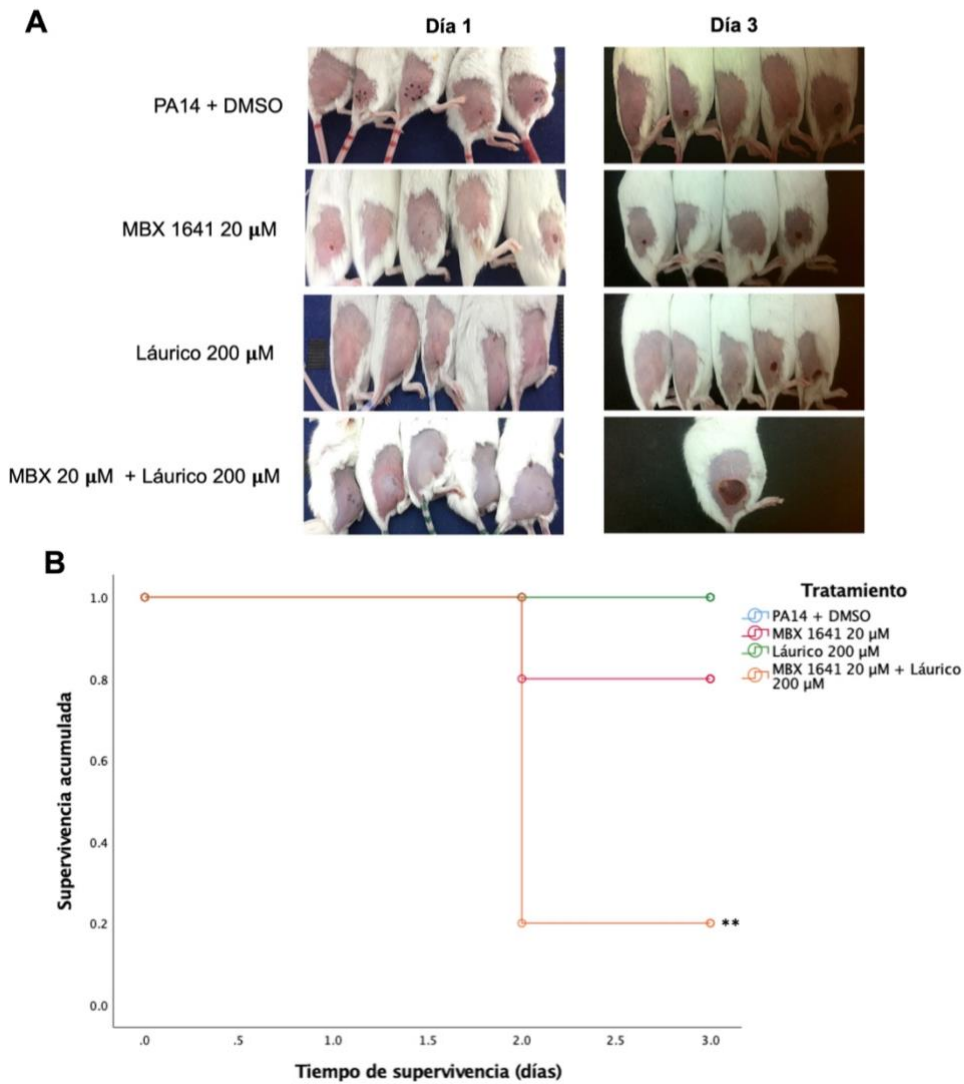


Figura 23. Efecto de ácido láurico (200 μ M) y MBX 1641 (20 μ M) de forma individual y en combinación sobre un modelo con ratones de la cepa CD1. A: Efecto visual registrado en el día 1 y día 3, B: Gráfica Kaplan-Meier de la supervivencia de cada tratamiento (** α = 0.01).

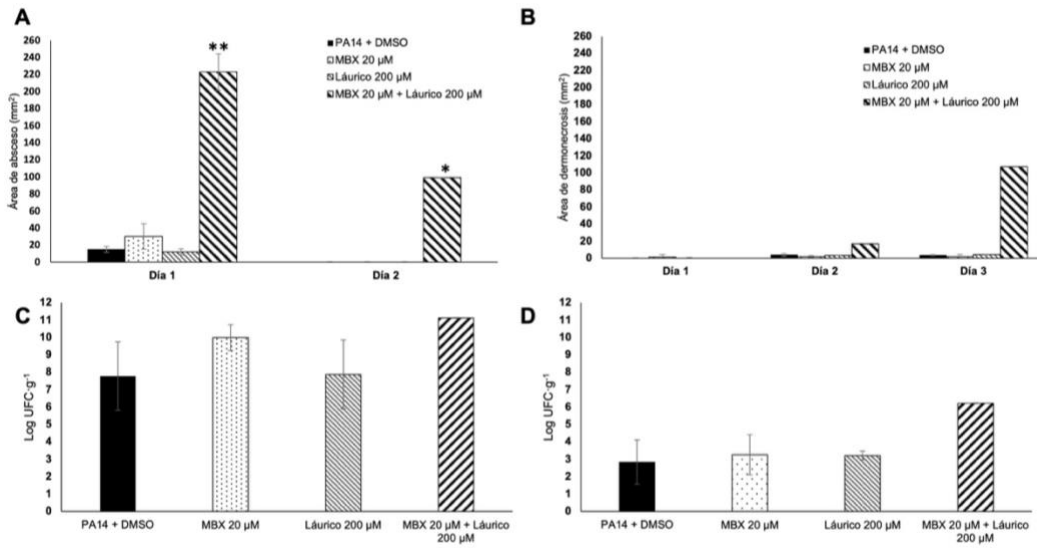


Figura 24. Efecto de ácido láurico (200 μM) y MBX1641 (20 μM) de forma individual y en combinación sobre un modelo de infección cutánea con ratones de la cepa CD1 sobre las variables de estudio. **A:** área de absceso, **B:** área necrótica, **C:** log UFC·g⁻¹ en el área de lesión para evaluar el establecimiento de *P. aeruginosa* PA14, **D:** log UFC·g⁻¹ en el área de lesión para evaluar la dispersión de *P. aeruginosa* PA14. (U Mann-Whitney, * $\alpha < 0.05$, ** $\alpha < 0.01$).

IX. DISCUSIÓN

En los últimos años se han descrito AI de tipo AG que participan de forma activa en la regulación de la virulencia de microorganismos como *P. aeruginosa*, conocidos como la familia de DSF (factor de señal difusible). La familia DSF son un grupo de autoinductores e inductores que fueron descritos inicialmente en bacterias fitopatógenas, pero que posteriormente se encontraron en bacterias patógenas de animales (*B. cenocepaea*, *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*) (Ryan et al. 2015).

El mecanismo de activación de los DSF como SPQ en *P. aeruginosa* aún no es completamente entendido, y se desarrolla mediante dos vías, una es a través del sensor quinasa PA1396 (relacionado con la activación de proteínas mediante un estímulo estresante) que induce su activación por DSF externos (no autoinducción) y el empleado por CDA sintetizado por la enzima Dspl, donde aún no se ha identificado la proteína receptora o el factor de transcripción con el que interacciona. No obstante, hay evidencia contundente sobre el efecto que tienen los DSF sobre la regulación de la virulencia de *P. aeruginosa*, por lo que entender su funcionamiento es importante para el desarrollo de terapias que la inhiban de forma eficiente.

Para poder definir el papel de los ácidos láurico y mirístico en la virulencia de *P. aeruginosa* se comparó su efecto con el del AI CDA. Los resultados obtenidos son comparables con estudios previos que señalan que el ácido mirístico inhibe la producción de piocianina (Abd-Alla & Bashandy, 2012), pero en este estudio el efecto también es registrado por el ácido láurico y CDA (Figura 13). La piocianina es un factor de virulencia regulado por PQ y el SST2 (Moradali et al., 2017) y se encuentra involucrado en procesos asociados con el establecimiento de la bacteria debido a su facilidad de entrada a través de las membranas citoplasmáticas (Hall et al., 2016) lo que da paso al aumento de las especies reactivas de oxígeno, la promoción de la formación de biopelícula, la apoptosis en células del sistema inmune como los neutrófilos y daños en el sistema respiratorio predominantemente por los radicales libres (Hall et al., 2016; Moradali et al., 2017); en su presencia también aumenta la supervivencia de la bacteria en condiciones de anaerobiosis e induce resistencia hacia los metales tóxicos (Castañeda-Tamez et al., 2018).

La actividad proteolítica y hemolítica (Figura 12) no mostraron diferencias significativas en presencia del ácido láurico y ácido mirístico, esto contrastando con lo reportado por Abd-Alla & Bashandy (2012) quienes demostraron que el ácido mirístico tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad proteolítica y lo reportado por Liaw, Lai & Wang (2004) que determinaron que los SAFA: C12-C16 tienen la capacidad de inhibir la actividad hemolítica en *P. mirabilis*. Es importante mencionar que los experimentos realizados para los factores de virulencia mencionados probablemente tuvieron una menor sensibilidad a las que muestran otras pruebas reportadas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, es probable que la inhibición registrada de la piocianina se regule por una vía de inhibición independiente de los sistemas Las y Rhl (Miller et al., 2015). La interrupción de la PQ por diversas moléculas a menudo no impide la expresión de todos los factores de virulencia evaluados, esto se atribuye a que dichas moléculas son reguladas por más de una vía (PQ, SST2, RpoS) (Son, 2013; Moradali et al., 2017) y diferentes FT (Hausel et al., 2019).

La motilidad tipo swarming y la formación de biopelículas son atribuidos a un comportamiento social bacteriano, regulados positivamente por los sistemas Las y Rhl (Chrzanowski et al. 2012). En esta investigación se registraron efectos antagónicos entre los SAFA y el CDA sobre estos fenotipos. Los ácidos láurico y mirístico inhibieron fuertemente el “swarming” (Figura 14), pero no redujeron significativamente la formación de la biopelícula (Figura 15). Esto está acorde con trabajos previos en los que se reportan la reducción del “swarming” por el ácido mirístico en *P. aeruginosa* PAO1 (Inoue, Shingaki & Fukui, 2008). Por otro lado, el CDA mostró una actividad opuesta a la observada por los AG, ya que redujo la formación de biopelícula y no afectó el “swarming” de forma significativa, comportamiento similar a lo reportado por Liu et al. (2018) y Rahmani-Badi et al. (2015). Es importante considerar que de acuerdo con Desbois & Smith (2010) los ácidos grasos afectan el swarming ya sea por PQ, modificando la fluidez de la membrana de *P. aeruginosa* o por la inhibición del pili tipo IV.

Los DSF presentan características importantes a las que se atribuye su actividad autoinductora, como es el enlace tipo *cis* en el carbono 2, la presencia de metilaciones y cadenas alifáticas de C10–C16 (Deng et al., 2011). En *P. aeruginosa* la enzima Dspl forma la doble ligadura de tipo *cis* en el carbono 2 del SAFA que se transforma en CDA

(C10:1_{Δ2}), lo cual puede ser una diferencia importante en la respuesta emitida por *P. aeruginosa* en presencia de los ácidos láurico y mirístico a nivel *in vitro*, debido a que estos no presentan insaturaciones aunado a que tienen un mayor largo de cadena.

Por otro lado, el SST3 libera cuatro efectores que tienen influencia en el establecimiento de *P. aeruginosa*, de los cuales ExoU resulta ser el más tóxico, debido a su actividad fosfolipasa A₂ que rompe los enlaces éster de los lípidos (a excepción de los triacilglicéridos), para generar un microambiente enriquecido en SAFAs libres que son utilizados como fuentes de carbono (Foulkes et al., 2019). ExoU causa una lisis celular rápida de las membranas de las células epiteliales lo cual permite una rápida distribución y establecimiento en el hospedero, provocando sepsis y se ha observado que genera lesiones agudas en pulmón de pacientes con FQ.

En esta investigación se registró la actividad inhibitoria sobre la secreción de ExoU por los SAFA: C12-C18, siendo el ácido láurico el que presentó mayor actividad (Figura 15). Al respecto, un efecto similar se reportó con la adición externa de AG no esterificados (oleato, miristato, y palmitato) en *S. enterica* serovar Typhimurium, los cuales tienen una alta afinidad con *hilD*, gen que activa la producción de la enzima HilD, parte del complejo RtsA-HilC-HilD el cual activa la expresión de *hilA*, gen encargado de codificar el activador transcripcional de los genes estructurales de SST3 (Golubeva et al., 2016). Deng et al. (2013) demostró que el ácido *cis*-2-dodecenoico (BDSF, Figura 7F) producido por *B. cenocepacia* (Boon et al., 2008) inhibe la producción de factores de virulencia, la formación de biopelículas y la expresión de genes del SST3 (Deng, Boon, Chen, Lim, & Zhang, 2013). Esto coincide con la actividad registrada por CDA (Figura 16C) que a partir de una concentración de 50 μM abate completamente la presencia del efector ExoU.

La actividad de anti-ExoU de los SAFA: C12-18 y moléculas relacionadas, es relevante debido a que ExoU juega un papel importante en el establecimiento y la dispersión de *P. aeruginosa* en sus células hospederas (Sawa, 2014), considerando que dicho objetivo es potencial en las terapias antivirulencia (Foulkes et al., 2019)

Se reporta que en los modelos animales no todos los factores relacionados con la virulencia juegan un papel significativo en el daño causado por *P. aeruginosa* de forma individual, y que la virulencia es la respuesta multifactorial de la combinación e interacción de varios factores de virulencia (Feinbaum et al., 2012). Por ejemplo, se ha

visto que el SST3 no tienen un papel en la muerte del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en contraste con modelos de mamíferos e insectos (Feinbaum et al., 2012), sin embargo, se ha visto que es necesaria la presencia de la sintasa Dspl para inducir la muerte del nemátodo (Liu et al., 2018). Dspl se encuentra relacionado con la expresión de pioverdina, la formación de biopelícula y el swarming (Liu et al., 2018), comportamiento comprobado a través de un modelo de infección de pulmón en ratones, donde se observó que ante la delección del gen *dspl* hay una reducción en la dispersión sistémica de la bacteria, y a nivel *in vitro*, una reducción de la motilidad tipo swarming, la formación de biopelícula y la producción de pioverdina (Liu et al., 2018).

En un modelo de infección cutánea en ratón se ha sugerido que los efectores ExoU y ExoS son necesarios para la virulencia de *P. aeruginosa* PA99 y específicamente el efector ExoU es suficiente para mediar la formación de absceso (Berube et al., 2017). En el modelo de infección implementado en esta investigación, los ácidos láurico y mirístico favorecieron el daño y el establecimiento de la bacteria en los ratones (Cuadro 11, Figura 18). Aún más interesante, el CDA a concentraciones de 3.1 μM no estimuló el daño y a 500 μM la redujo notablemente sin afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* (Cuadro 13, Figura 18). Los resultados antagónicos entre los estudios *in vitro* y el modelo murino, indican lo importante que es el microambiente en el que se desarrolla la infección por *P. aeruginosa*.

Para el efecto de CDA, se pueden considerar dos posibles causas:

La activación temprana por CDA puede generar un efecto no benéfico para la supervivencia de la bacteria, ya que activar la dispersión antes de tiempo puede ser contraproducente para el establecimiento y desarrollo inicial de la infección.

Aunque la activación temprana *in vivo* por parte del CDA es probable, se considera que en condiciones biológicas sería difícil alcanzar niveles de 500 μM de CDA en el medio, de hecho se estima que la concentración de los DSF en el esputo de pacientes con FQ es de alrededor de 250 nM (Twomey et al., 2012).

Otra posible explicación es que al existir un excedente de CDA en el medio (500 μM) es posible que la enzima Dspl a través de un mecanismo no descrito, cense la cantidad de DSF en el medio y por tanto inactive el gen *dspl*, con lo cual se vería afectada

la virulencia de la bacteria relacionada con este SPQ, como es la dispersión de *P. aeruginosa*.

Es factible que la concentración de SAFA en el microambiente esté en concentraciones mayores que el CDA producido por *P. aeruginosa*, para lo cual las lipasas tienen un papel fundamental (Gallo & Nakatsuji, 2011). En la infección de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ, la principal fuente de AG es el surfactante pulmonar constituido por un 90 % de lípidos, de los cuales el 80 % es la fosfatidilcolina (FC) (Son et al., 2007). Las lipasas degradan la FC liberando principalmente ácido mirístico (10-20 %) y palmítico (50-60 %) (Son et al., 2007). En los resultados obtenidos a nivel *in vitro*, los ácidos láurico y mirístico redujeron la secreción de la fosfolipasa ExoU (Figura 16), no obstante, en el modelo animal se prevé que hubo una estimulación al presentar mayor área de tejido necrótico en presencia de los AG y reducción en la supervivencia (Figura 18). Foulkes et al., (2019) menciona que para que haya una liberación del efector ExoU es necesaria la interacción con la proteína ubiquitina, la cual se encuentra presente en el citosol de las células eucariotas, y una vez que ExoU es liberado hay una catálisis de AG en un amplio rango de fosfolípidos y lisofosfolípidos, lo que permite la destrucción de la membrana citoplasmática del hospedero provocando muerte celular y una alta dispersión sistémica del patógeno. Este detalle es relevante, ya que en los ensayos a nivel *in vitro* no se toma en cuenta la interacción con el ambiente del hospedero y aunque en apariencia los resultados muestran inhibición de factores de virulencia, puede ser que los AG actúen como: a.- coadyuvantes, estimulando la virulencia de *P. aeruginosa* por SST3 con la presencia de la ubiquitina o por PQ mediante el estímulo de la degradación de los ácidos grasos en el patógeno. b.- por algún mecanismo que anteceda a las rutas mencionadas.

Cabe señalar que ExoU no es la única fosfolipasa liberada por *P. aeruginosa* ya que produce otras exoenzimas que no fueron analizadas en este estudio como son la TPLE (fosfolipasa A₁), PlcH (hemolitifosfolipasa C), PlcN (fosfolipasa C no hemolítica), PldA y PldB (fosfolipasas D) (Foulkes et al., 2019). La presencia de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) en el microambiente se señala como la principal fuente de carbono para la bacteria en pacientes con FQ (Son et al., 2007), no obstante, en los ensayos *in vitro* no registramos estimulación de crecimiento por los SAFA (Figura 11).

Aunque aún hay pocos estudios al respecto, se ha demostrado que algunos factores del hospedero interfieren en la regulación de los SPQ y viceversa, lo que puede modular el resultado de la invasión de la bacteria (Mukherjee & Bassler, 2019). Al respecto se menciona que las hormonas secretadas por el hospedero como el estriol y estradiol pueden reducir la virulencia de *P. aeruginosa* (Neuman, Debelius, Knight, & Koren, 2015).

De acuerdo con la literatura consultada, es posible que tanto los SAFA como el CDA actúen a un nivel transcripcional y jueguen un papel importante en la regulación de los genes que aportan la virulencia de *P. aeruginosa*, ya sea a través de los factores sigma, los factores transcripcionales (FT) o el regulador transcripcional PsrA (Pseudomonas sigma regulator A).

En *P. aeruginosa* se han descrito varios FT que regulan la PQ en respuesta a los cambios en el microambiente como son ExsA, PhoB, GbdR, PchR, SphR, SoxR y BfmR, VqsR, VqsM, AlgR, CdpR y RsaL (Huang et al., 2019). Todos estos elementos junto con los factores sigma AlgU, FliA, RpoH, RpoN, RpoS, PvdS, Fpvi, Fecl, SigX y Fecl2 forman una red de regulación muy compleja (Schulz et al., 2015). Un estudio reciente analizó mediante un perfil de transcriptoma como se lleva a cabo las redes de regulación de estos sistemas en *P. aeruginosa* (Huang et al., 2019).

Uno de los blancos posibles donde podrían estar actuando el ácido láurico y el mirístico es sobre ExsA, el cual que tiene una función importante en la activación de transcripción de la mayoría de los genes de SST3, como son los que codifican la jeringa nanoproteica y las proteínas efectoras (Sawa, 2014). También, regula positivamente *fabG* que participa en la biosíntesis de AG bacterianos (Huang et al., 2019), mientras que lo hace negativamente sobre la producción de AI PQS a través de PhrS (RNA pequeño) el cual se asocia con la disponibilidad de hierro (Sonnleitner et al., 2011). De igual manera, regula negativamente *ccoN2* el cual es determinante en la colonización de la bacteria (Huang et al., 2019).

Sin embargo, de acuerdo con la evidencia en la literatura consultada, sugerimos que los SAFA están actuando sobre el regulador transcripcional PsrA. Aunque se ha catalogado principalmente como un represor genético en la vía Fad, también se ha identificado que regula de manera positiva genes de virulencia ya sea directa o

indirectamente, e influye en la expresión de proteínas hipotéticas de las cuales aún se desconoce su función (Kang et al., 2009).

P. aeruginosa tiene una alta plasticidad para adaptarse a diversos ambientes y utilizar diversas fuentes de carbono (Stover et al., 2000), así como degradar AG de cadena corta, mediana (C4-C10) y larga (\geq C12) (Stover et al., 2000; Son et al., 2007). En este contexto, se ha identificado que PsrA reprime algunos operones de la β -oxidación como son *fadBA5* (Kang et al., 2008) operón relacionado con la degradación de la AG como fuente de carbono en los pulmones del hospedero y *PA0506* (Son et al., 2007; Wells et al., 2017), este último encargado de regular la expresión de FadE, enzima clave en el inicio del ciclo de la β -oxidación al convertir AG-acil-CoA a enoil-CoA (Jimenez-Díaz et al., 2019).

La degradación de AG de cadena larga puede llevarse a cabo por otras vías de β -oxidación (operones *fadAB1* y *fadAB4*) (Son et al., 2007, 2008; datos no publicados), pero la única que se relaciona con la adaptación de la bacteria a la fase estacionaria es la realizada por *fadBA5* que particularmente se ha encontrado tanto en citoplasma como en las vesículas de la membrana externa, a diferencia de las otras (Kang et al., 2008).

Se ha reportado que la represión del operón *PA0506* por PsrA induce la síntesis de PQS (Wells et al., 2017) debido a la inhibición de la enzima FadE, lo que provoca la acumulación de AG-acil-CoA que favorece la síntesis de octanoil-CoA, el precursor de PQS (Wells et al., 2017).

Asimismo, se ha identificado que PsrA tiene una función como sensor de AG de cadena larga (LCFA \geq C12 carbonos), con el cual forma un complejo PsrA-LCFA que favorece la activación de *fadBA5* y *PA0506*, estimulando enzimas de la β -oxidación y deteniendo la producción de PQS (Kang et al, 2008, Wells et al., 2017). Específicamente mediante Ensayos de Cambio en la Corrida Electroforética (EMSA) se identificó la formación del complejo con 50 μ M de ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y oleico (C18:1 Δ 9) (Kang et al, 2008, Wells et al., 2017), además se reportó que la expresión de *fadBA5* se da únicamente de la fase exponencial media a la estacionaria, la cual está relacionada con la presencia de LCFA en el medio (Kang et al., 2009). Mientras que la presencia de glucosa y de AG de cadena corta (C4-C10) como únicas fuentes de carbono reprimen fuertemente la expresión de *fadBA5* (Kang et al., 2009). La

interacción de los LCFA con PsrA se confirmó con la cristalización de la proteína y por mutagénesis dirigida al sitio de los residuos de aminoácidos del canal hidrofóbico, en la cual cepas Δ PsrA no se lleva a cabo la unión con LCFA y no se presenta la activación de *rpoS* y *exsC* (Kang et al., 2009).

Se ha observado la expresión tanto de *psrA* y *fadBA5* en pacientes con FQ (Son et al., 2007), lo que sugiere que las bacterias detectan a través de PsrA los AG libres en el pulmón, lo que genera la regulación de la β -oxidación bacteriana ya sea activándola para la degradación de la fosfatidilcolina o reprimiéndola ante la presencia de altas concentraciones de AG en el medio.

Por otra parte, las bacterias constantemente perciben y responden a diversos estímulos ambientales (Kojic, Aguilar, & Venturi, 2002). En *Pseudomonas* y otros géneros de Gram negativas, la percepción y las modificaciones de expresión de genes posteriores a cambios ambientales en la fase estacionaria se realiza por el factor sigma RpoS (Suh et al., 1999). Se ha identificado que RpoS es un regulador negativo de la sintasa RhII y de las proteínas receptoras LasR y RhIR lo que evita la activación temprana de dichos sistemas (Schuster, Hawkins, Harwood, & Greenberg, 2004); aunque hay que señalar que en esta compleja red de regulación también se han identificado otros reguladores negativos de sistemas de PQ como son RsmA y QscR (Jakobsen et al., 2017).

En *Pseudomonas* la percepción y las modificaciones de expresión de genes posteriores a cambios ambientales en la fase estacionaria se realiza por el factor sigma RpoS (Potvin & Levesque, 2008). PsrA regula positivamente la transcripción de *rpoS*, por lo que en fases de crecimiento anteriores a la estacionaria (o logarítmica tardía) se encuentra activa su expresión y por lo tanto reprimida la de varios factores de virulencia (Schuster et al., 2004). También, PsrA se autorregula negativamente mediante la unión a su propia región promotora *psrA*, pero también controla la concentración de RpoS por su unión a la región promotora *rpoS* (Kojic et al., 2002). Finalmente, PsrA regula positivamente el operón *exsCEBA* por la afinidad a la región promotora *exsC* que transcribe los genes para la formación del SST3 (Kang et al., 2009). De tal manera, que con la información consultada y los resultados obtenidos en esta investigación

proponemos un modelo integrado de cómo pueden estar actuando el ácido láurico y mirístico en la regulación de virulencia (Figura 25).

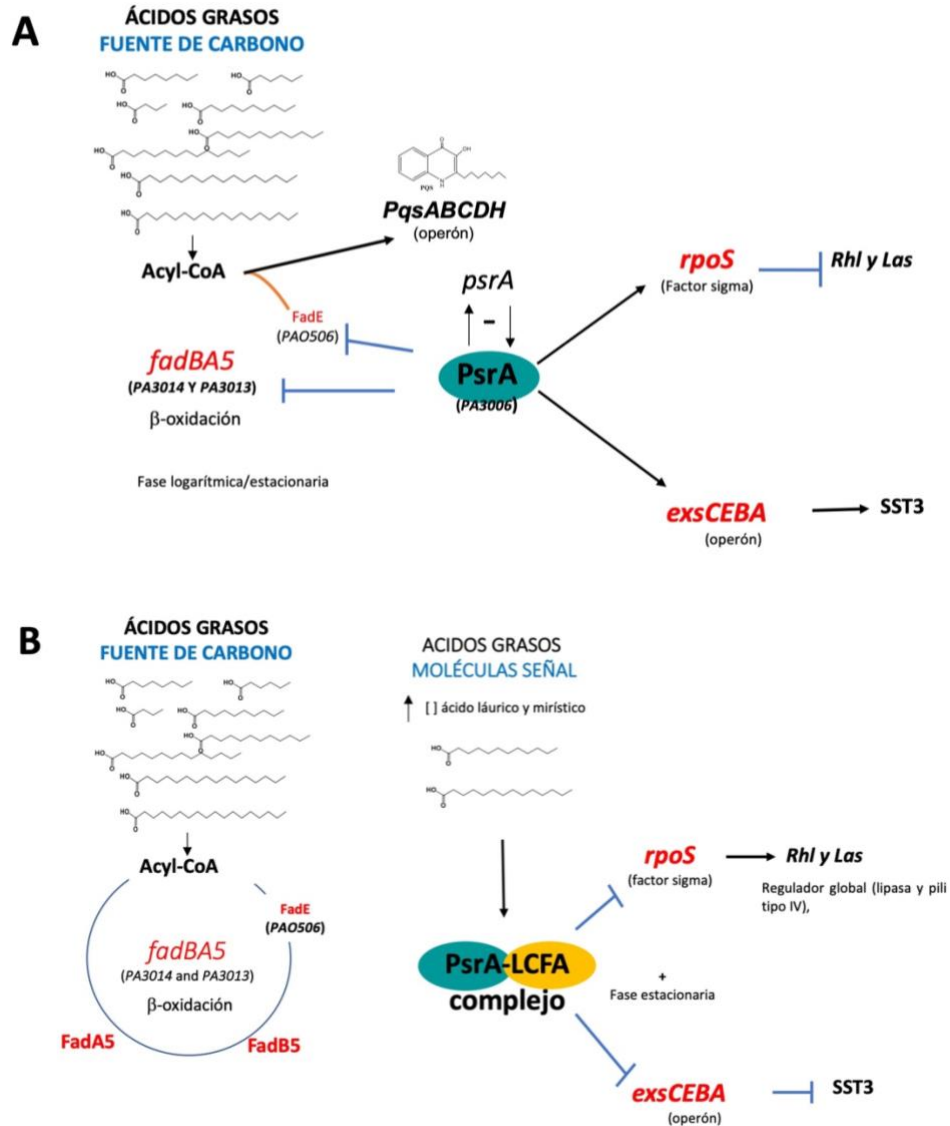


Figura 25. Modelo propuesto del papel de los SAFA: C12/C14 y PsrA en un nivel de regulación superior de la patogenicidad en *P. aeruginosa*. **A:** En la fase de crecimiento logarítmica tardía PsrA se une a los promotores de *fadBA5* y *PA056* reprimiendo la β-oxidación por la vía *fadBA5* (Kang et al., 2008; Kojic, Jovcic, Vindigni, Odreman, & Venturi, 2005; Son et al., 2007) estimulando la síntesis de PQS al bloquear la expresión de *FadE* (Wells et al., 2017) y favoreciendo la desregulación de la reacción inmune del huésped (Lin, Cheng, Wang, & Shen, 2018). Del mismo modo PsrA mantiene una autorregulación negativa sobre su región promotora *psrA* (Kojic et al., 2002), así como regula positivamente la transcripción de *rpoS* el cual evita la activación temprana de *Rhl*

y Las (Pearson, 2002; Schuster et al., 2004). En este escenario PsaA mantiene una regulación positiva del operón *exsCEBA* por el pegado a la región promotora *exsC* que transcribe los genes para la formación del SST3 (Kang et al., 2009) y posiblemente la secreción de ExoU, una lipasa que favorecerá el aumento de la concentración de ácido láurico y mirístico en el microambiente al liberarlos de los lípidos saponificables del hospedero (Foulkes et al., 2019). **B** sugerimos que un aumento en la concentración de ácido láurico y mirístico (moléculas señal) en la fase estacionaria favorecería la formación del complejo PsaA-LCFA que quita la represión de las regiones promotoras *fadBA5* (Kang et al., 2009, 2008), *PA056* (Wells et al., 2017), así como en *rpoS* (Kang et al., 2009), activando la β -oxidación por la vía *fadBA5* y la producción de factores de virulencia regulados por los sistemas Rhl y Las (Pearson, 2002; Schuster et al., 2004). Mientras que la formación del complejo evita la unión con la región promotora de *exsCEBA* deteniendo la formación del SST3 (Kang et al., 2009).

De tal manera, que en esta investigación sugerimos dos posibles explicaciones a la estimulación de virulencia por los SAFA: C12-14:

1.-Al preincubar y coadministrar con los ácidos láurico y mirístico con PA14, se induce la formación del complejo PsaA-ácido láurico/mirístico favoreciendo la activación temprana de los SPQ y pirocianina (Suh et al., 1999), así como de otros factores de virulencia no regulados por PQ, lo que generó un mayor daño en los animales (Cuadro 11, Figura 18).

2.- Es factible que por la diversidad que presentan los AG al encontrarse en una plétora de ambientes por formar parte estructural de las células, al inyectarse en el ratón, la concentración inicial del inóculo se pierda en el tejido del huésped, desviándose a diferentes rutas metabólicas ya sea la β -oxidación de las células huésped, la formación de la barrera de piel o a las células del sistema inmune. Con lo que el complejo con PsaA probablemente se forme, pero al ser inferior la concentración de LGAC en el medio, no haya el suficiente para unirse con el PsaA que se autorregula por dicho complejo, por lo que se activaría RpoS, dejando una alta concentración de las enzimas relacionadas con PQ en el medio activándose de forma temprana, el SST3 liberando ExoU, lo que explicaría la presencia de mayor tejido necrótico en los ratones y mayor muerte por la rápida dispersión de la bacteria, además de la producción de PQS, que de acuerdo a Lin, et al., 2018, tienen la capacidad de regular las células del sistema inmune del hospedero, con lo que se permite un mejor establecimiento de la bacteria.

Se ha demostrado que en el desarrollo de infecciones crónicas de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ participan los DSF, AI que pueden influir en la eficacia de los tratamientos bactericidas y antivirulencia (Twomey et al., 2012). Del mismo modo, la mayor parte de los estudios de moléculas antivirulencia contra *P. aeruginosa* se han centrado en el efecto sobre los tres sistemas de PQ mejor entendidos y se ha explorado muy poco el papel que juegan los FA en la regulación de la virulencia, así como su importancia en ambientes complejos como en sistemas *in vivo*. En este sentido, es importante entender el papel de los AG como molécula señal en la regulación de virulencia (PQ y SST3) y cómo su consumo en la dieta puede influenciar el desarrollo de las infecciones bacterianas.

Dicho lo anterior, en los resultados de las combinaciones se apreció que en las concentraciones más pequeñas de MBX1641 en combinación con los SAFA y curcumina, hay un mejor efecto en inhibir algunos factores de virulencia como es la piocianina. Este fenómeno es conocido como hormesis, el cual se refiere que a concentraciones muy bajas se estimula la inhibición de la variable evaluada, pero a altas dosis se inhibe dicho efecto (Zou, Lin, Deng, & Yin, 2013).

El efecto hormético se observó en la combinación de curcumina con MBX 1641 (0.068 μM /2 μM) que inhibió la producción de piocianina y al aumentar la concentración de ambos compuestos (0.34 μM / 10 μM) se observó un menor efecto inhibitorio (Figura 20). En la combinación de ácido mirístico con MBX 1641, se observó que el efecto hormético es influenciado por MBX 1641, ya que a una concentración de 4 μM con cualquier concentración utilizada de ácido mirístico se observaron efectos positivos, resaltando la combinación con 40 μM y 1000 μM (Figura 21). El ácido láurico con MBX1641 tuvo un efecto inhibitorio de la piocianina a una concentración específica (200 μM / 20 μM) y cuando se aumentó o disminuyó la concentración en cualquiera de sus componentes se perdió el efecto inhibitorio (Figura 22C), incluso a niveles menores de la actividad individual (Figura 22D).

Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de dicha combinación en el modelo animal, se registró un mayor establecimiento de la bacteria, se estimuló la dispersión sistémica y se redujo la supervivencia, en comparación con el grupo control inoculados con PA14 sin tratamiento (Figura 23 y 24). De tal manera, que estos resultados nos

confirman la influencia que tienen los SAFA en particular el ácido láurico para modificar la eficacia de las moléculas antivirulencia y que *in vivo* el principal efecto es contrario a eliminar la infección y reducir el daño. Sin embargo, reducir el consumo o su presencia de SAFA en el microambiente puede llegar a favorecer la actividad de las terapias antivirulencia.

Entender estos mecanismos, pueden ayudar a desarrollar terapias de combinación antivirulencia más exitosas en el que la administración de inhibidores de lipasas, con inhibidores de SST3 o de PQ pueden ser una opción. También, es importante conocer los posibles factores del hospedero involucrados en inducir un efecto antagónico de los SAFA para desarrollar estrategias para su inactivación.

Finalmente, el expandir la cobertura y bloquear completamente los SPQ y el SST3 puede ayudar a eliminar a la bacteria en condiciones complejas como es en un sistema *in vivo* (Fong et al., 2018). De igual forma, el papel de los AG como moléculas de señalización en sistemas de regulación de virulencia y durante las infecciones *in vivo* es poco conocido; de tal manera que este es el primer reporte que informa el efecto de SAFA como regulador de virulencia y su participación en el desarrollo de la infección en un modelo murino.

X. CONCLUSIONES

Los SAFA: C12-18 y el CDA tienen un papel importante en la regulación de la virulencia de *P. aeruginosa*, pero el resultado final relacionado con su inhibición o activación es diferente en un ambiente complejo, como es *in vivo*.

El autoinductor putativo CDA producido por *P. aeruginosa* exhibe comportamientos antivirulencia *in vitro*, que se correlaciona con la disminución del daño en el modelo murino.

Aunque los ácidos láurico y mirístico exhiben propiedades antivirulencia *in vitro*, su papel *in vivo* parece estar más relacionado con ser una señal ambiental para la activación de factores de virulencia en puntos específicos del crecimiento.

Sugerimos que los ácidos láurico y mirístico en el microambiente funcionan como moléculas señal en la regulación global de genes de virulencia en la fase estacionaria mediante la interacción con PsrA.

El ácido láurico interfiere con la efectividad de compuestos antivirulencia como es el MBX1641 (inhibidor de SST3), por lo cual sugerimos la presencia de AG reguladores de virulencia (DSF, SAFA) en los microambientes, puede ser determinante para el desarrollo de las infecciones, así como en la eficacia de los compuestos antivirulencia.

XI. LITERATURA CITADA

Abd-Alla, M. H., & Bashandy, S. R. (2012). Production of Quorum Sensing Inhibitors in Growing Onion Bulbs Infected with *Pseudomonas aeruginosa* E (HQ324110). ISRN Microbiology, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/161890>

Aiello, D., Williams, J. D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N. P., Huang, J., & Moir, D. T. (2010). Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(5), 1988–1999. <https://doi.org/10.1128/AAC.01598-09>

Aldinger, K. A., Sokoloff, G., Rosenberg, D. M., Palmer, A. A., & Kathleen, J. (2009). Genetic Variation and Population Substructure in Outbred CD-1 Mice: Implications for Genome-Wide Association Studies. PLoS ONE, 4(3), 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004729>

Amari, D. T., Marques, C. N. H., & Davies, D. G. (2013). The putative enoyl-coenzyme a hydratase Dspl is required for production of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion autoinducer cis-2-decenoic acid. Journal of Bacteriology, 195(20), 4600–4610. <https://doi.org/10.1128/JB.00707-13>

Anantharajah, A., Mingeot-Leclercq, M. P., & Van Bambeke, F. (2016). Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. Trends in Pharmacological Sciences, 37(9), 734–749. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.011>

Baell, J. B., Ferrins, E. L., Falk, A. H., & Nikolakopoulos, G. (2013). PAINS: Relevance to Tool Compound Discovery and Fragment-Based Screening. Australian Journal of Chemistry, 66, 1483–1494.

Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. The Journal of Antibiotics, 58(1), 1–26.

Berube, B. J., Murphy, K. R., Torhan, M. C., Bowlin, N. O., Williams, J. D., Bowlin, T. L., & Hauser, R. (2017). Impact of Type III Secretion Effectors and of Phenoxyacetamide Inhibitors of Type III Secretion on Abscess Formation in a Mouse

Model of *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), 1–15.

Bjarnsholt, T., Gennip, M. Van, Jakobsen, T. H., Christensen, L. D., Jensen, P. Ø., & Givskov, M. (2010). In vitro screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.205>

Boon, C., Deng, Y., Wang, L. H., He, Y., Xu, J. L., Fan, Y., & Zhang, L. H. (2008). A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *ISME Journal*, 2(1), 27–36. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.76>

Bowlin, N. O., Williams, J. D., Knoten, C. A., Torhan, M. C., Tashjian, T. F., Li, B., & Moir, D. T. (2014). Mutations in the *Pseudomonas aeruginosa* needle protein gene pscF confer resistance to phenoxyacetamide inhibitors of the type III secretion system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2211–2220. <https://doi.org/10.1128/AAC.02795-13>

Brekke, T. D., Steele, K. A., & Mulley, J. F. (2018). Inbred or Outbred? Genetic Diversity in Laboratory Rodent Colonies. 8(February), 679–686. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300495>

Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., Brady, K. M., & Yahr, T. L. (2008). Characterization of ExsA and of ExsA-dependent promoters required for expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Molecular Microbiology*, 68(3), 657–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06179.x>

Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., & Yahr, T. L. (2010). ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA binding activity. *Journal of Bacteriology*, 192(6), 1479–1486. <https://doi.org/10.1128/JB.01457-09>

Castañeda-Tamez, P., Ramírez-Peris, J., Pérez-Velázquez, J., Jiménez-Cortés, J. G., Maeda, T., González, Y., & García-Contreras, R. (2018). Pyocyanin Restricts Social

Cheating in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1348), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01348>

Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E. A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S. J., & García-Contreras, R. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World Journal of Clinical Cases*, 3(7), 575–598.
<https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575>

Christensen, L. D., Moser, C., Jensen, P. Ø., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Kjelleberg, S., & Bjarnsholt, T. (2007). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an *in vivo* intraperitoneal foreign-body infection model. *Microbiology*, 153, 2312–2320. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006122-0>

Coopersmith, C. M., Li, D. M. A., Stromberg, P. E., Dunne, W. M., Davis, C. G., Osborne, D. F., & Buchman, T. G. (2003). Antibiotics improve survival and alter the inflammatory profile in a murine model of sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *SHOCK*, 19(5), 408–414.
<https://doi.org/10.1097/01.shk.0000054370.24363.ee>

Cortes-López, H., Juárez-Rodríguez, M., García-Contreras, R., Soto-Hernández, M., & Castillo-Juárez, I. (2020). Old Acquaintances in a New Role: Regulation of Bacterial Communication Systems by Fatty Acids. In V. R. Rai & J. A. Bai (Eds.), *Trends in Quorum Sensing and Quorum Quenching* (CRC Press, pp. 47–58).

Davies, D. G., & Marques, C. N. H. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1393–1403.
<https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>

Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in Microbiology*, 26(4), 313–328.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>

Deng, Y., Boon, C., Chen, S., Lim, A., & Zhang, L. H. (2013). Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through interference with

quorum sensing systems and T3SS. *BMC Microbiology*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-231>

Deng, Y., Lim, A., Lee, J., Chen, S., An, S., Dong, Y.-H., & Zhang, L. H. (2014). Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. *BMC Microbiology*, 14(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-51>

Deng, Y., Wu, J., Tao, F., & Zhang, L. H. (2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chemical Reviews*, 111(1), 160–179. <https://doi.org/10.1021/cr100354f>

Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

Díaz-Pascual, F., Ortíz-Severín, J., Varas, M. A., Allende, M. L., & Chávez, F. P. (2017). *In vivo* Host-Pathogen Interaction as Revealed by Global Proteomic Profiling of Zebrafish Larvae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(334), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00334>

Dow, J. M. (2017). Diffusible signal factor-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/jam.13307>

Dunn, L., Prosser, H. C. G., Tan, J. T. M., Vanags, L. Z., Ng, M. K. C., & Bursill, C. A. (2013). Murine model of wound healing. *Journal of Visualized Experiments*, 2013(75), 1–6. <https://doi.org/10.3791/50265>

Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2005). HilD , HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 57(3), 691–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04737.x>

Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., & Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas*

aeruginosa: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 884–900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>

Fasciano, A. C., Shaban, L., & Mecsas, J. (2019). Promises and Challenges of the Type Three Secretion System Injectisome as an Antivirulence Target. In M. Sandkvist, E. Cascales, & P. J. Christie (Eds.), *Protein Secretion in Bacteria* (1st ed., pp. 261–276). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0032-2018>

Feinbaum, R. L., Urbach, J. M., Liberati, N. T., Djonovic, S., Adonizio, A., Carvunis, A., & Ausubel, F. M. (2012). Genome-Wide Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence-Related Genes Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. *PLoS Pathogens*, 8(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002813>

Filloux, A. (2011). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An essay on diversity, evolution, and function. *Frontiers in Microbiology*, 2(155), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00155>

Fleitas-Martínez, O., Henrique-Cardoso, M., Meira-Ribeiro, S., & Luiz-Franco, O. (2019). Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains , Toxin Neutralization , Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(74), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>

Fong, J., Zhang, C., Yang, R., Boo, Z. Z., Tan, S. K., Nielsen, T. E., & Yang, L. (2018). Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19504-w>

Foulkes, D. M., Mclean, K., Haneef, A. S., Fernig, D. G., Winstanley, C., Berry, N., & Kaye, S. B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms*, 7(707), 1–17.

Frederix, M., & Downie, J. A. (2011). Quorum Sensing : Regulating the Regulators. In *Advances in Microbial Physiology* (1st ed., Vol. 58). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381043-4.00002-7>

Gallo, R. L., & Nakatsuji, T. (2011). Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 1974–1980. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.182>

Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Chubiz, J. E. C., & Slauch, J. M. (2016). Intestinal long-chain fatty acids act as a direct signal to modulate expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *MBio*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02170-15>

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., & Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>

Huang, H., Shao, X., Xie, Y., Wang, T., Zhang, Y., Wand, X., & Deng, X. (2019). An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 10(2931), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10778-w>

Inoue, T., Shingaki, R., & Fukui, K. (2008). Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1), 81–86. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01089.x>

Jakobsen, T. H., Warming, A. N., Vejborg, R. M., Moscoso, J. A., Stegger, M., Lorenzen, F., & Givskov, M. (2017). A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09886-8>

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

Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G., & Jin, Q. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host and Microbe*, 15(5), 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.010>

Jimenez-Díaz, L., Caballero, A., & Segura, A. (2019). Regulation of fatty acid degradation in Bacteria. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids* (pp. 751–771). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50418-6>

Johnson, D. I. (2017). Bacterial pathogens and their virulence factors. In *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7>

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., Nguyen, D. T., Son, M. S., & Hoang, T. T. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* β -oxidation operon. *Microbiology*, 154(6), 1584–1598. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018135-0>

Kirienko, N. V., Rahme, L., & Cho, Y. H. (2019). Editorial: Beyond Antimicrobials: Non-traditional Approaches to Combating Multidrug-Resistant Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00343>

Kojic, M., & Venturi, V. (2001). Regulation of *rpoS* Gene Expression in *Pseudomonas*: Involvement of a TetR Family Regulator. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3712–3720. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3712>

Kojic, M., Aguilar, C., & Venturi, V. (2002). TetR Family Member PsrA Directly Binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* Promoters. *Journal of Bacteriology*, 184(8), 2324–2330. <https://doi.org/10.1128/JB.184.8.2324>

Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F., & Venturi, V. (2005). Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.003>

Kollaran, A. M., Joge, S., Kotian, H. S., Badal, D., Prakash, D., Mishra, A., & Singh, V. (2019). Context-Specific Requirement of Forty-Four Two-Component Loci in *Pseudomonas aeruginosa* Swarming. *iScience*, 13, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.028>

Kumar, P., Lee, J. H., Beyenal, H., & Lee, J. (2020). Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. *Trends in Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.014>

Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., & Zhang, L. H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 339–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>

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>

Liaw, S. J., Lai, H. C., & Wang, W. B. (2004). Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*, 72(12), 6836–6845. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6836-6845.2004>

Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., & Shen, X. (2018). The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(230), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00230>

Liu, L., Li, T., Cheng, X. J., Peng, C. T., Li, C. C., He, L. H., & Bao, R. (2018). Structural and functional studies on *Pseudomonas aeruginosa* Dspl: Implications for its role in DSF biosynthesis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22300-1>

Liu, Y. C., Chan, K. G., & Chang, C. Y. (2015). Modulation of host biology by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules: Messengers or traitors. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01226>

Lombardi, C., Tolchard, J., Bouillot, S., Signor, L., Gebus, C., Liebl, D., & Job, V. (2019). Structural and functional characterization of the type three secretion system (T3SS) needle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00573>

Malgaonkar, A., & Nair, M. (2019). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36488-9>

Martínez-Antonio, A. y Soberón-Chávez, G. (2002). El complejo lenguaje de las bacterias. *Ciencia*, 60–67.

McLean, R. J. C., Pierson, L. S., & Fuqua, C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods*, 58(3), 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.016>

Michalska, M., & Wolf, P. (2015). *Pseudomonas* Exotoxin A: Optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*, 6(963), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>

Miller, L. C., Loughlin, C. T. O., Zhang, Z., Siryaporn, A., Silpe, J. E., Bassler, B. L., & Semmelhack, M. F. (2015). Development of Potent Inhibitors of Pyocyanin Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 1298–1306. <https://doi.org/10.1021/jm5015082>

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle : A Paradigm for Adaptation , Survival , and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1–29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>

Moura, A., Nicolau, A., Hooton, T., & Azeredo, J. (2009). Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1779–1791. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04115.x>

Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>

Muñoz-Cazares, N., García-Contreras, R., Pérez-López, M., & Castillo-Juárez, I. (2017). Phenolic Compounds with Anti-virulence Properties. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. <https://doi.org/10.5772/66367>

Muñoz-Cazares, N. R. (2018). Interrupción de percepción de quórum por fitoquímicos y moléculas sintéticas halogenadas. *Colegio de Postgraduados*.

Muthamil, S., Balasubramaniam, B., & Balamurugan, K. (2018). Synergistic Effect of Quinic Acid Derived From *Syzygium cumini* and Undecanoic Acid Against *Candida* spp. Biofilm and Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02835>

Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>

Neuman, H., Debelius, J. W., Knight, R., & Koren, O. (2015). Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 509–521. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu010>

Nickerson, C. A., & Schurr, M. J. (2006). Molecular paradigms of infectious disease. A bacterial perspective (1st ed.; C. A. Nickerson & M. J. Schurr, Eds.). New York: Springer Science + Business Media.

Nilles, M. L., Jessen, D. L., Editors, C., & Walker, J. M. (2017). Type 3 Secretion Systems BOOK (Vol. 1531). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6649-3>

Nunes-Silva, L., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., & Trentin, D. S. (2016). Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews*, 116(16), 9162–9236. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>

O'Toole, G. A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 10–11. <https://doi.org/10.3791/2437>

Opoku-Temeng, C., Naclerio, G. A., Mohammad, H., Dayal, N., Abutaleb, N. S., Seleem, M. N., & Sintim, H. O. (2018). N-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamide analogs, bacteriostatic agents against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.023>

Orozco, L., Chávez, M., Saldaña, Y., Velazquez, R., Carnevale, A., González-del Ángel, A., & Jiménez, S. (2006). Fibrosis quística: La frontera del conocimiento molecular y sus aplicaciones clínicas. *Revista de Investigacion Clinica*, 58(2), 139–152.

Panayidou, S., & Apidianakis, Y. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*. In D. Liu (Ed.), *Laboratory Models for Foodborne Infections* (pp. 373–389). <https://doi.org/10.1201/9781315120089-25>

Pearson, J. P. (2002). Early Activation of Quorum Sensing. *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2569–2571. <https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2569>

Pérez-López, M., García-Contreras, R., Soto-Hernández, M., Rodríguez-Zavala, J. S., Martínez-Vázquez, M., Prado-Galbarro, F. J., & Castillo-Juárez, I. (2017). Antiquorum Sensing Activity of Seed Oils from Oleaginous Plants and Protective Effect During Challenge with *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Medicinal Food*, 21(4), 356–363. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0080>

Petrovic, S., & Arsic, A. (2015). Fatty Acids: Fatty Acids. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00277-4>

Pineda-Castellanos, M. L., Rodríguez-Segura, Z., Villalobos, F. J., Hernández, L., Lina, L., & Eugenia Nuñez-Valdez, M. (2015). Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* towards larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). *Pathogens*, 4(2), 210–228. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020210>

Planet, P. J. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (Fifth Edit). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00155-9>

Pletzer, D., Mansour, S. C., Wuerth, K., Rahanjam, N., & Hancock, R. E. W. (2017). New mouse model for chronic infections by Gram-negative bacteria enabling the study of anti-infective efficacy and host-microbe interactions. *MBio*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00140-17>

Potvin, E., & Levesque, R. C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x>

Quin, C., & Gibson, D. L. (2019). Dietary Fatty Acids and Host – Microbial Crosstalk in Neonatal Enteric Infection. *Nutrients*, 11, 1–20.

Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Fallahi, H., & Heidari-Keshel, S. (2015). Dissection of the cis-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique. *Frontiers in Microbiology*, 6(383), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00383>

Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., & Daudé, D. (2018). Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 9(203). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>

Rowe, G. E., & Welch, R. A. (1994). Assays of Hemolytic Toxins. In *Methods in Enzymology* (Academic P, Vol. 235, pp. 657–667). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35179-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35179-1)

Rumbaugh, K., Griswold, J. A., Iglewski, B. H., & Hamood, A. N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infection and Immunity*, 67(11), 5854–5862.

Ryan, R. P., An, S. qi, Allan, J. H., McCarthy, Y., & Dow, J. M. (2015). The DSF Family of Cell–Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators. *PLoS Pathogens*, 11(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004986>

Salini, R., Santhakumari, S., & Veera, A. (2019). Synergistic antibiofilm efficacy of undecanoic acid and auxins against quorum sensing mediated biofilm formation of

luminescent *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 498, 162–170.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.038>

Sawa, T. (2014). The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *Journal of Intensive Care*, 2(10), 1–11.

Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., & Häussler, S. (2015). Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Modular Architecture with Limited. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004744>

Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S., & Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 51(4), 973–985. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03886.x>

Schütz, C., & Empting, M. (2018). Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14, 2627–2645. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.241>

Schweizer, H. P., & Choi, K. H. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Archives of Microbiology*, 193(3), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0665-6>

Scoffone, V. C., Trespidi, G., Chiarelli, L. R., Barbieri, G., & Buroni, S. (2019). Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1–38.

Shen, D. K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B., & Toussaint, B. (2006). PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 74(2), 1121–1129.
<https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1121-1129.2006>

Son, M. S., Matthews, W. J., Kang, Y., Nguyen, D. T., Hoang, T. T., Al, S. O., & Mmun, I. N. I. (2007). *In Vivo* Evidence of *Pseudomonas aeruginosa* Nutrient Acquisition

and Pathogenesis in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *Infection and Immunity*, 75(11), 5313–5324. <https://doi.org/10.1128/IAI.01807-06>

Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A. S., Backofen, R., & Bläsi, U. (2011). The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Molecular Microbiology*, 80(4), 868–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07620.x>

Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Merino, E., Castillo-Juárez, I., Cortés-López, H., González-Pedrajo, B., & Soberón-Chávez, G. (2019). Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhlR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology (Reading, England)*, 165(4), 425–432. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000778>

Suh, S., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E. H., & Ohman, D. E. (1999). Effect of rpoS Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(13), 3890–3897.

Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479–506. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.2.479-506.1999>

Thompson, C. M. A., & Malone, J. G. (2020). Nucleotide second messengers in bacterial decision making. *Current Opinion in Microbiology*, 55, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.006>

Toska, J., Sun, Y., Carbonell, D. A., Foster, A. N., Jacobs, M. R., Pearlman, E., & Rietsch, A. (2014). Diversity of Virulence Phenotypes among Type III Secretion Negative *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *PLoS ONE*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086829>

Trastoy-Pena, R., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernández-García, L., López, M., & Tomás, M. (2019). Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(1100). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01100>

Twomey, K. B., O'Connell, O. J., McCarthy, Y., Dow, J. M., O'Toole, G. A., Plant, B. J., & Ryan, R. P. (2012). Bacterial cis-2-unsaturated fatty acids found in the cystic fibrosis airway modulate virulence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME Journal*, 6(5), 939–950. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.167>

Vandamme, T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(1), 2–9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.124301>

Waldron, E. J., Snyder, D., Fernandez, N. L., Sileo, E., Inoyama, D., Freundlich, J. S., & Neiditch, M. B. (2019). Structural basis of DSF recognition by its receptor RpfR and its regulatory interaction with the DSF synthase RpfF. In *PLoS Biology* (Vol. 17). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000123>

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>

Wells, G., Palethorpe, S., & Pesci, E. C. (2017). PsaA controls the synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal via repression of the FadE homolog, PA0506. *PLoS ONE*, 12(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189331>

Welsh, M. A., & Blackwell, H. E. (2016). Chemical Genetics Reveals Environment-Specific Roles for Quorum Sensing Circuits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Chemical Biology*, 23(3), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.006>

Widmer, K. W., Soni, K. A., Hume, M. E., Beier, R. C., Jesudhasan, P., & Pillai, S. D. (2007). Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing signal inhibitors to autoinducer-2 (AI-2). *Journal of Food Science*, 72(9), 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00527.x>

Wright, G. D. (2016). Antibiotic Adjuvants : Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology*, 24(11), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.009>

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vol. 2–3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>

Zhou, L., Zhang, L. H., Cámara, M., & He, Y. W. (2017). The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends in Microbiology*, 25(4), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.013>

Zou, X., Lin, Z., Deng, Z., & Yin, D. (2013). Chemosphere Novel approach to predicting hormetic effects of antibiotic mixtures on *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 90(7), 2070–2076. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.042>

APENDICES

1. Referencia de cepas utilizadas para este estudio.

Cepas	Características	Referencia
PA14 WT	Cepa de referencia aislada originalmente de un paciente con quemaduras.	Liberati, Urbach & Miyata, <i>et al.</i> , 2006.
$\Delta lasR/\Delta rhIR$	Cepa mutante de PA14 con los sistemas Las and Rhl interrumpidos.	Dekimpe & Dèziel, 2009.
$\Delta pscC$	Cepa mutante de PA14 con SST3 interrumpido.	Liberati, Urbach & Miyata, <i>et al.</i> , 2006.

2.- Preparación del medio M9 para evaluación de “swarming”.

Compuesto	Concentración
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	1mM
Cloruro de Sodio (NaCl)	8.6 mM
Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	20 mM
Fosfato de potasio dihidrogenado (KH ₂ PO ₄)	22mM
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	1mM
Fosfato de hidrogeno disodico (Na ₂ HPO ₄)	12 mM
D-Glucosa	0.2 %
Casaminoácidos	0.5 %

Tomado de Kollaran et al., 2019.

3.- Efecto de la combinación de SAFA y MBX 1641 en la actividad hemolítica in vitro

La combinación de curcumina (0.068 μ M, 0.34 μ M y 1.7 μ M) con MBX 1641 (2 μ M, 10 μ M y 50 μ M) registró efectos en su mayoría sinérgicos sobre la actividad hemolítica de *P. aeruginosa* (Figura 26), como el estudiado con la combinación de curcumina a 0.068 μ M y MBX 1641 a 50 μ M (37.7 %) teniendo un aumento promedio del 20 % en la inhibición de la hemólisis, y la combinación de curcumina a concentración de 0.34 μ M y

MBX 1641 a 2 μM (35.6 %), donde se observó un aumento promedio del 19 % (Figura 26C) con respecto al efectuado por sus tratamientos individuales (Figura 26A y B). Sin embargo, aunque los efectos de las combinaciones fueron en su mayoría benéficos, es importante destacar que ninguno de estos valores fue significativo con respecto al observado en *P. aeruginosa* PA14.

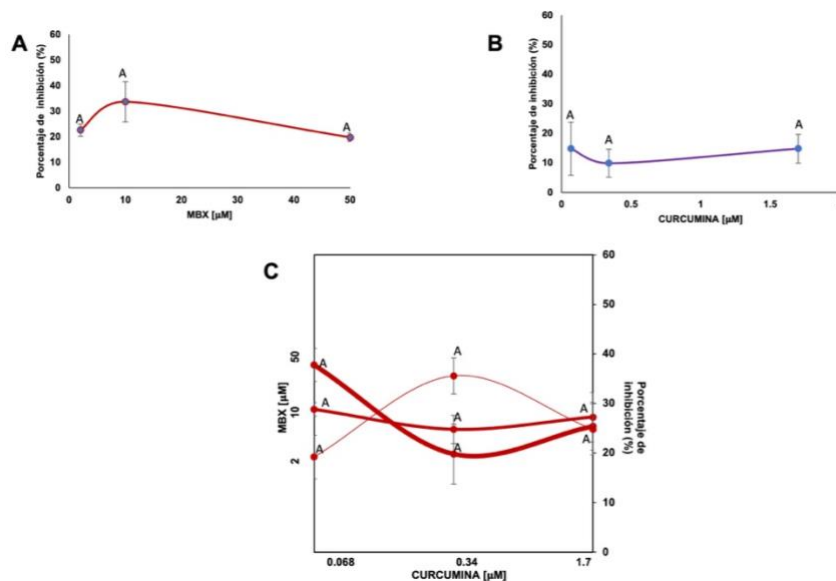


Figura 26. Efecto de MBX 1641 y curcumina en la actividad hemolítica de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (A), curcumina (B) y la actividad de las distintas combinaciones (C). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$).

En la combinación de ácido mirístico con MBX 1641 (Figura 27), se observó un efecto de sinergia máximo de un 34.3 % en concentraciones de 40 μM de ácido mirístico y 20 μM de MBX 1641 (Figura 27C), potenciándose su efecto inhibitorio con un aumento promedio de 15 %. A pesar de ello, las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto a la actividad hemolítica presentada por *P. aeruginosa* PA14.

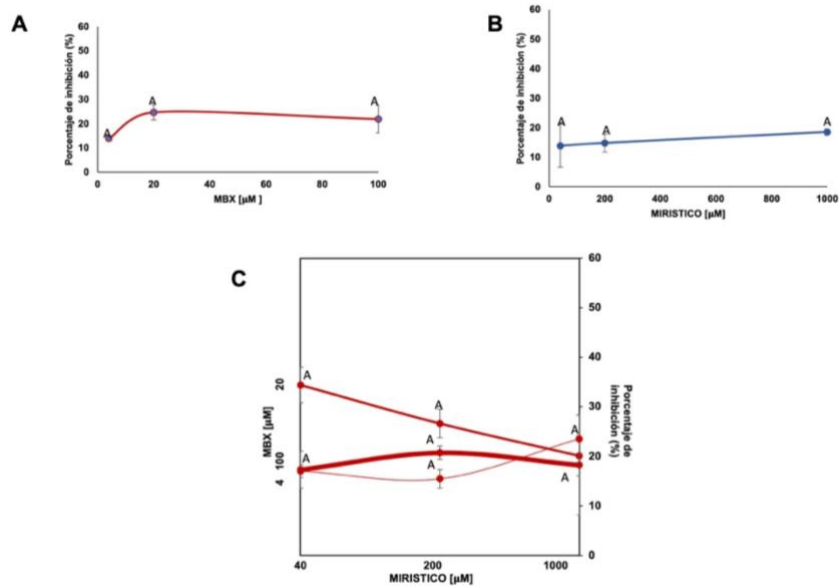


Figura 27. Efecto de MBX 1641 y ácido mirístico en la actividad hemolítica de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (**A**), ácido mirístico (**B**) y la actividad de las distintas combinaciones (**C**). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$).

La combinación de ácido láurico con MBX 1641 (Figura 28) mostró una efectividad aparente a una concentración de 4 μM de MBX 1641 en cualquier concentración de ácido láurico empleada en este estudio, sobre todo en presencia de 200 μM de ácido láurico con una inhibición del 32.5 %, aumentando su efecto en promedio 18 % con respecto a sus tratamientos individuales, seguido de la concentración de 40 μM de ácido láurico con una inhibición del 26.3 %, potenciando el efecto promedio un 11.6 % respecto a sus tratamientos individuales. El efecto inhibitorio también se potencializó en presencia de 200 μM de ácido láurico y 20 μM de MBX 1641 con un 28.1 %, aumentando un promedio de 8.3 %. A pesar de los resultados registrados, los tratamientos no fueron estadísticamente significativos.

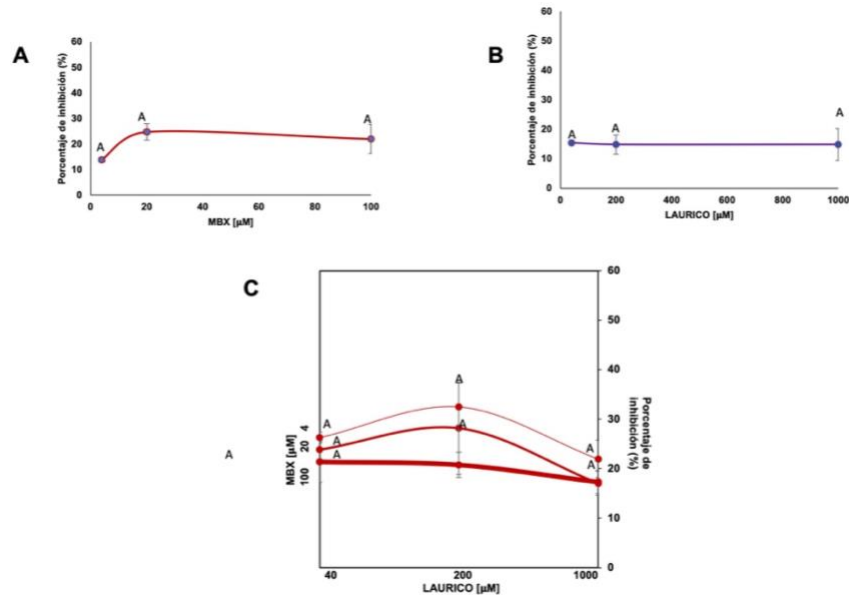


Figura 28. Efecto de MBX 1641 y ácido láurico en la actividad hemolítica de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (A), ácido láurico (B) y la actividad de las distintas combinaciones (C). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$).

4.- Efecto de la combinación de SAFA y MBX1641 en la actividad proteolítica in vitro.

La combinación de curcumina con MBX 1641 mostró efectos tanto antagónicos como sinérgicos en la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* PA14 (Figura 29). La actividad sinérgica se registró con la combinación de curcumina a 1.7 μM y MBX 1641 a 10 μM, aumentando la inhibición un 6.96 % en promedio, seguido de la combinación de curcumina a 1.7 μM y MBX 1641 a 2 μM en un 4.32 %. No obstante, algunos tratamientos presentaron efectos antagónicos, como la combinación de MBX 1641 a 10 μM con las de curcumina a 0.34 μM y 0.068 μM, disminuyendo su actividad inhibitoria promedio en un 4.6 % y 7.2 % respectivamente. El mayor porcentaje de inhibición de actividad proteolítica registrado tanto de forma individual como en combinación fue en promedio de 15.1 % en presencia de 1.7 μM de curcumina y 10 μM de MBX 1641, el cual no fue estadísticamente significativo.

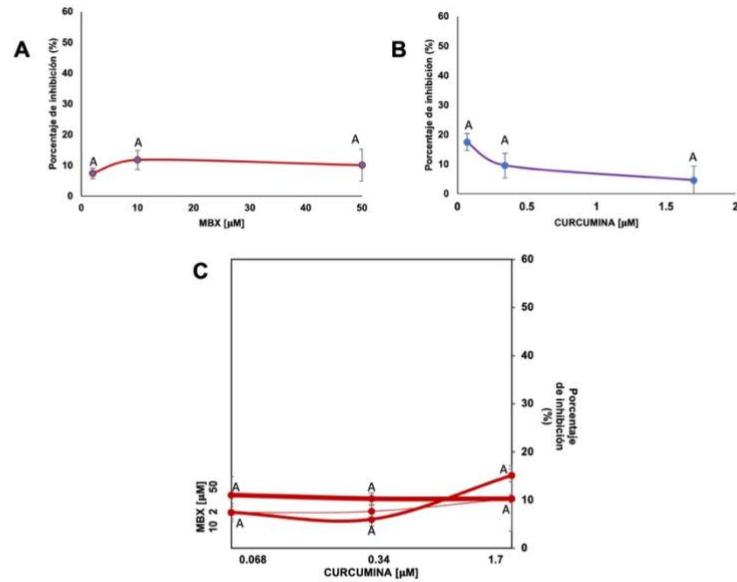


Figura 29. Efecto de MBX 1641 y curcumina en la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (**A**), curcumina (**B**) y la actividad de las distintas combinaciones (**C**). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$).

La actividad proteolítica en presencia de ácido mirístico y MBX 1641 mermó un 17.5 % con concentraciones de 40 μM y 20 μM respectivamente (Figura 30C), y su efecto se vio potenciado, aumentando su porcentaje de inhibición un 12 % en comparación a sus tratamientos individuales (Figura 30A y B). Al igual que la combinación de curcumina con MBX 1641, los efectos no fueron estadísticamente significativos.

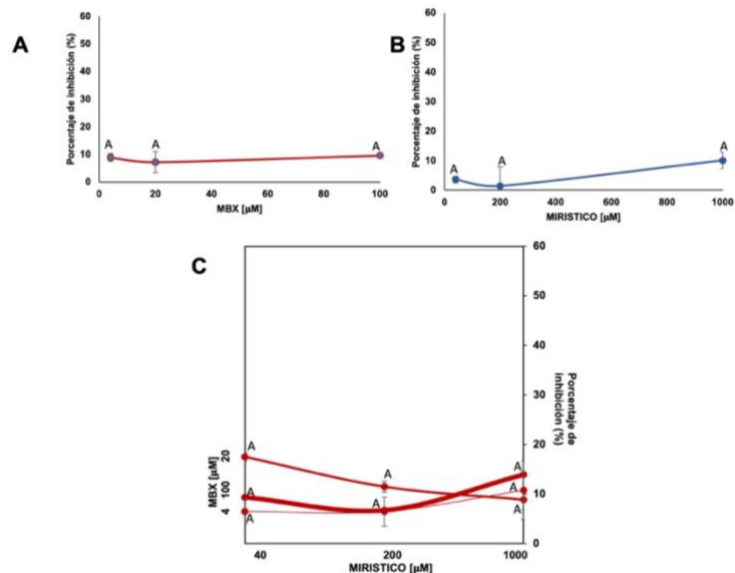


Figura 30. Efecto de MBX 1641 y ácido mirístico en la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (**A**), ácido mirístico (**B**) y la actividad de las distintas combinaciones (**C**). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$).

En la combinación de ácido láurico y MBX 1641 (Figura 31), tres tratamientos destacaron con un aparente efecto sinérgico, los cuales fueron ácido láurico a 1000 µM y MBX 1641 a 100 µM con un porcentaje de inhibición del 17.9 % de actividad proteolítica, aumentando su efecto promedio un 8.2 % respecto a sus tratamientos individuales; ácido láurico a 1000 µM y MBX1641 a 20 µM con un efecto inhibitorio del 14.6%, aumentado su efecto promedio un 6.1 %, y ácido láurico 200 µM con 20 µM de MBX 1641 con un porcentaje promedio de inhibición del 8.1 %, aumentando su efecto un promedio de 2 %. Al igual que en las otras combinaciones estudiadas, la actividad inhibitoria sobre la proteólisis fue estadísticamente no significativa.

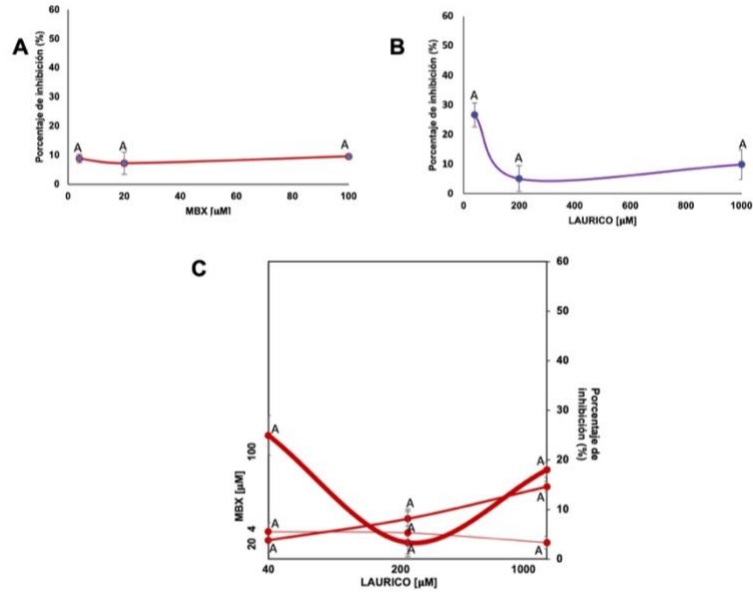
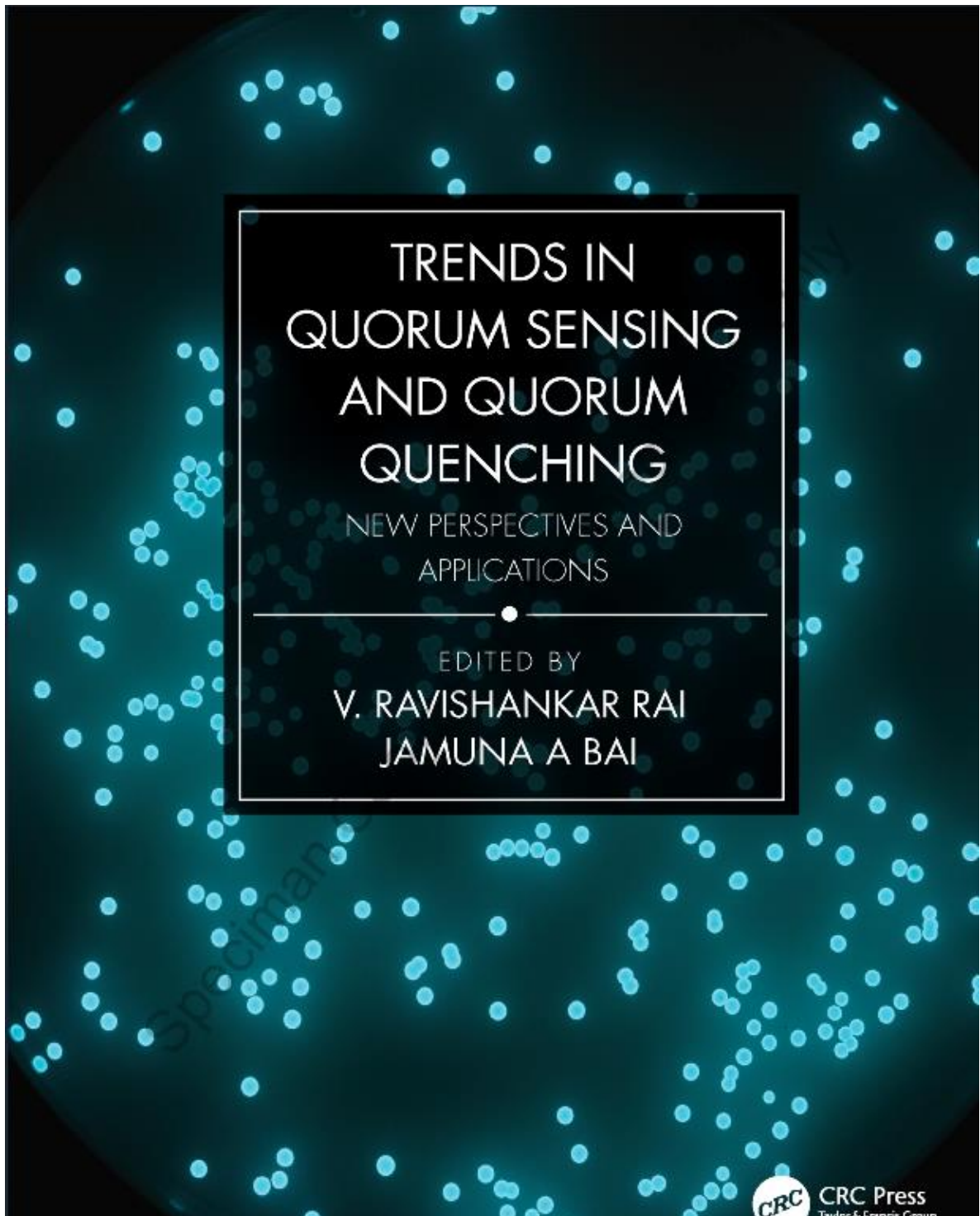


Figura 31. Efecto de MBX 1641 y ácido láurico en la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* PA14 a concentraciones subinhibitorias. Diluciones seriales 1/5. Actividad de los compuestos de manera individual: MBX 1641 (**A**), ácido láurico (**B**) y la actividad de las distintas combinaciones (**C**). ANOVA con prueba de Tukey ($\alpha > 0.05$).

PRODUCTOS



4

Old Acquaintances in a New Role: Regulation of Bacterial Communication Systems by Fatty Acids

Humberto Cortes-López, Martha Juárez-Rodríguez, Rodolfo García-Contreras, Marcos Soto-Hernández, and Israel Castillo-Juárez

CONTENTS

4.1	Introduction	47
4.2	Bacterial Language Based on Fatty Acids	48
4.2.1	DSF Group I	48
4.2.2	DSF Group II	49
4.2.3	DSF Group III	49
4.3	Quenching Bacterial Communication by Fatty Acids	49
4.3.1	QQ-Saturated Fatty Acids	49
4.3.2	QQ-Unsaturated Fatty Acids	52
4.3.3	Other Fatty Acids with QQ Properties	52
4.3.4	QQ-Fatty Acid in Vivo Studies	53
4.4	Fatty Acids-Autoinducer, Beyond Intra-Species Bacterial Communication	53
4.5	Implications of Fatty-Acid-Rich Diets in Bacterial Communication and Health Human	54
4.6	Concluding Remarks	55
	Acknowledgments	55
	References	55

4.1 Introduction

Lipids are one of the essential molecules for life, and for this reason, their chemical diversity and biological functions have been widely studied. Specifically, fatty acids (FA) are lipids that form a structural part of cells, perform energy storage functions, and can also act as signal transduction molecules (Soto, Calatrava-Morales and López-Lara 2019). FA are classified according to the presence and number of double bonds in their carbon chain. Saturated fatty acids (SAFA) contain no double bonds, monounsaturated fatty acids (MUFA) contain one, and polyunsaturated fatty acids (PUFA) contain more than one double bond. For PUFA, the position of the double bonds is also important; for this reason, they are also classified as omega 6 and omega 3 according to the position of the terminal double bond, counting from the last aliphatic carbon (omega carbon). In addition, PUFA can be classified as *cis* or *trans*, depending on whether hydrogen is bound to the same or is on the opposite side of the double bond (Garrett and Grisham 2010). The property of FA as signaling molecules has been studied in eukaryotic cells, but their role as communication molecules in prokaryotes has only recently been explored, and we are currently in the process of elucidating its role in various biological and ecological phenomena.

FA are one of the most ubiquitous components of cell membranes and are common compounds in terrestrial and aquatic

organisms. Approximately 3,700 million years ago, microorganisms dominated all the environments of the Earth and determined the development of multicellular organisms (Nutman et al. 2016). Although they have existed during all this time, it is only now, barely 300 years after their discovery by A.V. Leeuwenhoek, that we have begun to know them and to discover their diversity and complexity, as well as their participation in different ecological processes.

Initially, the main interest for studying microorganisms was to obtain industrial products and to understand their role as causes of diseases. It was believed that, compared with eukaryotes, they used unsophisticated mechanisms to perform their biological functions. However, this perspective has been changing because of growing knowledge of how they regulate their cell-cell communication and how they determine the general state of multicellular organisms.

In the 1970s, a striking phenomenon that aroused the curiosity of scientists was production of bioluminescence by some bacterial species of the genus *Vibrio*. Even more interesting was that these bacteria produced light only when there was an agglomeration of a certain number of bacterial cells (Zavilgelsky and Shakulov 2018). How unicellular microorganisms perceive that their numbers are sufficient (microbial quorum) to activate the genes and produce homogeneous bioluminescence? This is possible because bacteria and archaea are social microorganisms that communicate to perform various functions and exhibit

47