

**METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL INHIBIDORES DE
QUÓRUM SENSING EN *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE
BIOFILMS.**

LINA LUZ FUENTES QUIROZ

Estudiante del Programa de Química Farmacéutica



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS PROGRAMA
DE QUÍMICA FARMACÉUTICA CARTAGENA DE INDIAS D.T
Y C.**

**2021.
METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL INHIBIDORES DE
QUÓRUM SENSING EN *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE
BIOFILMS.**

LINA LUZ FUENTES QUIROZ

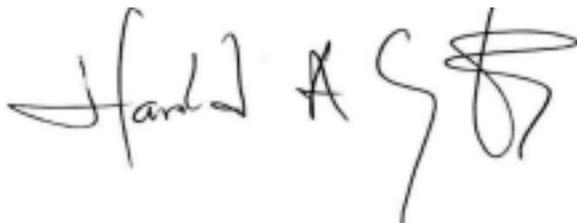
**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Químico
Farmacéutico**



LEONOR CERVANTES CEBALLOS Microbiol. M.Sc.

Director del Trabajo

HAROLD ALBERTO GOMEZ ESTRADA Q.F., PhD.



Co- Director



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CARTAGENA DE INDIAS D.T Y C.**

2021

Nota de Aprobación del Jurado.

Presidente del Jurado.

Jurado.

Jurado.

CARTAGENA DE INDIAS, 2021

i

La Universidad de Cartagena ni el jurado examinador, se hacen responsable de los conceptos emitidos en el presente trabajo.

CARTAGENA DE INDIAS, 2021

ii

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas van dirigidas a expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda contribuyeron en la realización del presente trabajo y mi formación profesional; en especial a la Dra. Leonor Cervantes y el Dr. Harold Gómez Estrada, Director y Co-Director de mi trabajo de grado.

Gracias a la Universidad de Cartagena, a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y a cada uno de los docentes del plantel educativo por su orientación, seguimiento y supervisión continua; pero sobre todo por la motivación y el acompañamiento recibido durante estos cinco años de formación académica.

Gracias a Dios y mi familia; mi madre Alina Quiroz Gómez la persona más importante en mi vida, mi amiga, confidente y mi modelo a seguir; mis hermanos María José Fuentes Quiroz y Luis Fernando Fuentes Quiroz; mis sobrinos Michell, Valeria, Luisa, Luis y Juliana.

Hago extensa mi gratitud a mis compañeros y futuros colegas por su apoyo, tolerancia, perseverancia y amistad; especialmente a Manuel Montes, Kevin Ballestas, Diana Sanjuan y Laura Prada con quienes tuve la oportunidad de compartir más tiempo durante estos años y que hicieron más ameno este camino.

Para todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y colaboración les estoy muy agradecida; sin embargo, si me coloco a mencionar cada uno de sus nombres la lista sería infinita, no tengo palabras para describir todo lo que hicieron por mí en este arduo pero maravilloso camino.

A todos y cada uno de ustedes,

¡MUCHAS GRACIAS!

iii

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	V	
LISTA DE ABREVIATURAS , SIMBOLOS Y SIGLAS.....	VI	
1. RESUMEN.		
1	2.	INTRODUCCIÓN
.....	2	3.

DESARROLLO.....	4
3.1. Característica Generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
3.1.1. Taxonomía.....	5
3.1.2. Distribución.....	6
3.1.3. Epidemiología	7
3.1.4. Inmunopatogenicidad.....	9
3.1.5. Factores de Virulencia.....	11
3.1.5.1. Factores de Patogenicidad Asociados a la Célula Bacteriana	12
3.1.5.1.1. Pili y Flagelo.....	12
Proteínas de Membrana	14
Asociados a la Formación de Biopelículas	15
Secreción de Toxinas	16
Sensing.....	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Asociados a la Patogenicidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Potencial Inhibición del Quórum Sensing en <i>P. aeruginosa</i>	22
Producción de la Señal	22
de la Molécula Señal en su Unión al Receptor.....	23
de la Señal AHL.....	23
la Señal AHL	23
CONCLUSIÓN	27
RECOMENDACIONES	28
BIBLIOGRAFIA	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
--	---

Figura 2. Microfotografía de colonias de aislamientos hospitalarios de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , en agar Mueller Hinton..	5
Figura 3. Taxonomía de <i>Pseudomonas</i>	6
Figura 4. Entornos abióticos y bióticos que ha llevado a la evolución de diferentes rasgos y estilos de vida de las diferentes especies de <i>Pseudomonas</i>	7
Figura 5. Respuesta del huésped a la infección de las vías respiratorias por <i>Pseudomonas</i>	10
Figura 6. Estructura y biología de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con respecto a las interacciones con el hospedador	11
Figura 7. Esquema representando uno de los tipos de movilidad que puede realizar <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre superficies.	13
Figura 8. Esquema de la estructura química general del LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
Figura 9. Proceso de formación de biopelícula en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	15
Figura 10. Estructura del sistema de secreción tipo 3 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> junto con las proteínas efectoras.	16
Figura 11. Quorum sensing (QS).	18
Figura 12. Sistemas de detección de quorum sensing descritos en <i>P. aeruginosa</i> (Sistemas basados en AHL, en quinolonas e IQS)	19
Figura 13. Ciclo de vida de la biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 14. Biosíntesis AHL.	22
Figura 15. Moléculas inhibitoras del QS aisladas del rábano picante y ajo.	23

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios resistente a los antibióticos.....	9
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Tabla 3. Blancos moleculares de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y sus inhibidores	21
Tabla 4. Extractos naturales y sus mecanismos moleculares Anti-biofilm.....	24
Tabla 5. Agentes anti-biofilm naturales y sus mecanismos moleculares	25

aGM1 Glicoesfingolípido asialo M1
AHL Acilhomoserina Lactona
AI Autoindicadores
ATP Adenosín Trifosfato
C4 HSL N-butanoil Homoserina lactona
ECM Matriz Extracelular
IAAS Infecciones Asociadas a la Atención en Salud
IL-10 IL-6 6
IL-8 Interleuquina
IL-23 8
Interleuquina Interleuquina
10 23
Interleuquina
INS Instituto Nacional de Salud IQS Sistema
Quorum Sensing Integrado Lec A Lectina A
Lec B Lectina B
LPS Lipopolisacárido
PQS Señal de *Pseudomonas* Quinolona OMS
Organización Mundial de la Salud SST2
Sistema de Secreción Tipo 2 SST2 Sistema
de Secreción Tipo 3 SST3 Sistema de
Secreción Tipo 5 QS Quórum Sensing

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud declara que más de 1,4 millones de pacientes en todo el mundo tratados en centros hospitalarios, ambulatorios o de consulta externa, se ven afectados por las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud; gran parte de esta problemática es atribuida a *Pseudomonas aeruginosa*, considerado como un agente patógeno oportunista, capaz de hospedarse en el organismo de pacientes en estado de inmunodepresión.

Esta bacteria es capaz de colonizar el cuerpo humano gracias a que posee mecanismos mediados por la expresión de genes autoinductores, Lactonas de N-acilhomoserina (AHL) como señal química para comunicarse entre ellas y a su vez permitir el incremento de la densidad celular. Este proceso de comunicación es denominado Quorum Sensing y contribuye a la variación del material genético, intercambio de genes de una especie bacteriana a otra, modificación del blanco molecular, formación de biofilms y multirresistencia. Estos y otros mecanismos de patogenicidad han generado la resistencia a los antibióticos y a complicar el régimen farmacoterapéutico de los pacientes. Por ello que se hace necesaria la búsqueda de alternativas más eficaces y de menor costo que posibiliten la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas.

En este trabajo se realizó la búsqueda bibliográfica para identificar aquellos compuestos naturales de origen vegetal como fuentes importantes para el descubrimiento de fármacos antimicrobiano y potenciales inhibidores de Quorum sensing en *P. aeruginosa*. La información tomada como base para el desarrollo de esta monografía indica la importancia de los mecanismos de actividad Antibiofilm de las moléculas derivadas de productos naturales, que actúan como agentes inhibitorios del Quórum sensing dependiente de autoindicadores (AHLs). Gran parte de estos metabolitos secundarios (Terpenos, Fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides, lactonas y compuestos azufrados) evidencian efectos directos sobre los genes y proteínas relacionadas con la comunicación celular (LasI, LasR). La estabilidad y resistencia a la degradación por parte del metabolismo del huésped y su fácil transporte a través de las células hasta su lugar de acción, los hacen los candidatos ideales para futuros desarrollos.

Palabras claves: AHL, Autoinductores, Biofilms, *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum Sensing.

2. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno gramnegativo que causa infecciones agudas y crónicas en pacientes inmunodeprimidos (Allegretta *et al.*, 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de 1,4 millones de pacientes en todo el mundo tratados en centros hospitalarios, ambulatorios o de consulta externa se ven afectados por las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), siendo el riesgo de infección de 2 a 20 veces mayor en los países en vía de desarrollo (OMS, 2019; OMS, 2015; CLSI, 2010). En Colombia se notificaron en el 2019, 333 casos relacionados con brotes de IAAS, el 27% fueron asociados a *P. aeruginosa* (INS, 2020). Esta bacteria posee mecanismos mediados por la expresión de genes autoinductores Lactonas de N acilhomoserina (AHL) como señal química para comunicarse entre ellas, desempeñando un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos (Holban *et al.*, 2013), a la expresión de genes asociados al crecimiento de biofilms y a la bomba de eflujos (Ghosh, 2019; Abbas *et al.*, 2016).

La formación de biofilms es uno de los mecanismos adaptativos de ciertas bacterias Gram negativa y positivas asociadas a la expresión de nanomoléculas y genes autoindicadores (AI) cuya concentración extracelular aumenta en función del incremento de la densidad celular, permitiendo la comunicación célula- célula; denominado “Quórum Sensing” (QS) (Gallardo M, 2009). El Quórum Sensing contribuye a la variación del material genético, intercambio de genes de una especie bacteriana a otra, transformaciones enzimáticas, genes asociados a factores de virulencia de ciertas bacterias oportunistas resistentes (Greenberg, 2003; Rasmussen *et al.*, 2006), modificación del blanco molecular, expulsión del fármaco desde el interior de la célula, prevención de la entrada del fármaco, formación de biofilms y multiresistencia (Ditu *et al.*, 2011; Malmström *et al.*, 2012; Cantón *et al.*, 2011; Donlan, 2002; Thomson, 2010).

La Organización Mundial de la Salud considera que los productos derivados de las plantas juegan un papel importante para la prevención de algunas enfermedades infecciosas, debido a su disponibilidad y menor costo a través de la estrategia de medicina tradicional y complementaria 2014-2023, estimando que un 80% de la población mundial usa fitomedicina para tratar enfermedades infecciosas y no infecciosas (OMS, 2013). Cabe resaltar que las poblaciones de la región norte de Colombia, utilizan el conocimiento ancestral y tradicional de las plantas medicinales para el tratamiento de sus principales problemas de salud (Gómez *et al.*, 2011).

Los productos naturales de origen vegetal son fuentes importantes para el descubrimiento de fármacos antimicrobianos (Naveed *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2019). Se ha encontrado que algunos flavonoides, catequinas, terpenos y compuesto azufrados aislados de plantas, actúan como inhibidores de quorum sensing; gracias a la similitud en su estructura química con las señales (AHL) y a su capacidad para degradar e inhibir los receptores LuxR / LasR, generando una menor expresión de los factores de virulencia y alterando la morfología de los biofilms (Pejing, 2015; D'Almeida, 2017; Vandeputte *et al.*, 2010).

Por consiguiente, este estudio permitirá la búsqueda de metabolitos secundarios de origen vegetal inhibidores de Quorum sensing en *P. aeruginosa*, mediante herramientas bibliográfica en bases de datos con publicaciones de documentos primarios y secundarios que evidencian estas investigaciones. A su vez, esta revisión sistemática generará información útil a la comunidad académica- científica y la comunidad en general sobre el potencial farmacológico de las plantas como línea base para estudios experimentales y alternativa terapéutica de nuevos compuestos de origen vegetal para tratamiento de enfermedades asociadas a las IAAS.

3. DESARROLLO

3.1. Características Generales de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa, considerada como un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm en diámetro y de 1,5-5 μm de largo. Es un microorganismo aerobio facultativo con motilidad unipolar, aunque algunas veces se ha aislado con dos o tres flagelos y muchas fimbrias o pilis en la superficie celular (Figura 1) (Whitman *et al.*, 2016).

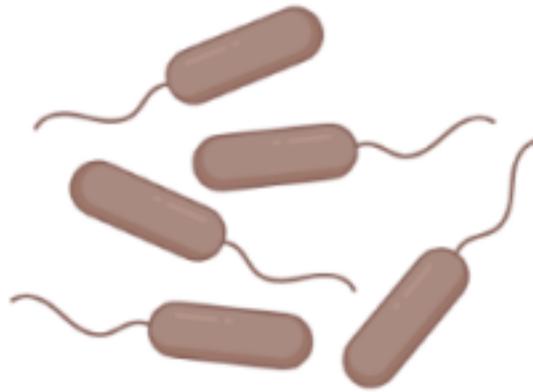


Figura 1. Morfología *Pseudomonas aeruginosa*.

Las colonias propias de este microorganismo son alargadas y planas con el centro elevado, brillo metálico, aspecto gelatinoso y viscoso; especialmente en zonas de mayor crecimiento. Sin embargo, existen numerosas variaciones, cuando crecen formando biofilms; después de que hayan estado expuestas a estrés medioambiental, por la

presencia de antibióticos o durante infecciones crónicas de las vías respiratorias. Exhiben un característico color verde brillante, gracias a la producción de los pigmentos piocianina, de color azul y pioverdina, de color amarillo fluorescente (Figura 2). *P. aeruginosa* se distingue por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la facultad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Walker *et al.*, 2004).

4

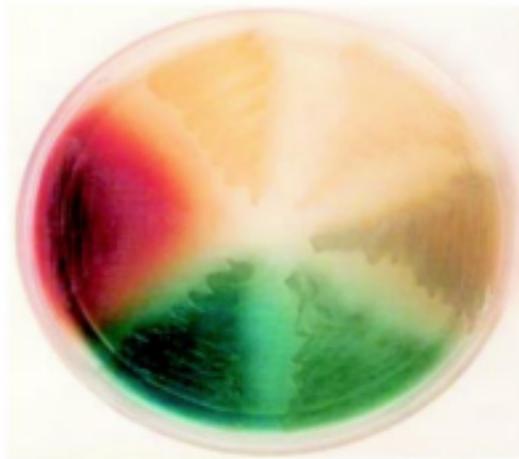


Figura 2. Microfotografía de colonias de aislamientos hospitalarios de *P. aeruginosa*. En agar Mueller Hinton, 48 horas de incubación a 28 °C. Tomado Merino, 2007.

3.1.1. Taxonomía

El estudio taxonómico del género *Pseudomonas* ha presentado diferentes variaciones desde su descubrimiento hasta un reajuste de especies en los últimos años. En un comienzo, las bacterias fueron asociadas con base en su morfología por Ferdinand Cohn. Sin embargo, con el transcurso de los años, esta clasificación fue modificada a rasgos más fisiológicos y factores de patogenicidad; todo ello con la finalidad de obtener una clasificación más precisa. Fue así, que Stainer propuso una nueva clasificación taxonómica del género basándose en el perfil metabólico de 267 especies sobre 146 metabolitos, lo que sumado con los ensayos de identificación mediante ADN y la hibridación ADN-ADN ayudo a dilucidar la clasificación fenotípica. Finalmente, Palleroni en 1973 reporta la clasificación genotípica y división del

género *Pseudomonas* apoyado en la secuenciación de la subunidad 16S del ARNr (Palleroni, 1981).

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia Pseudomonadaceae que incluye otros géneros como *Azomonas*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Flavimonas* y *Rugamonas*. La familia se encuentra a su vez en el orden Pseudomonadales, en clase Gammaproteobacteria, siendo del filo Proteobacteria y dominio Bacteria (Peix et al., 2009).

5

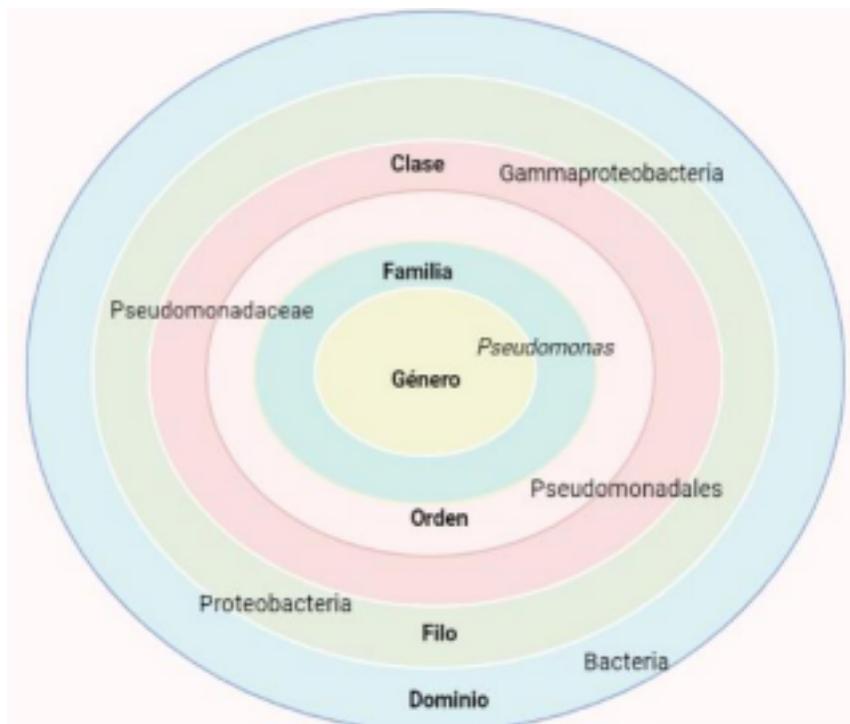


Figura 3. Taxonomía de *Pseudomonas*.

3.1.2. Distribución

Los miembros del género *Pseudomonas* muestran una notable variabilidad metabólica y fisiológica, lo cual contribuye a la colonización de diversos hábitats terrestres y acuáticos; puede llegar a mantenerse de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y soportando diversos medios físicos; además de crecer

con temperaturas que oscilan entre los 20 y 43° C. Son de gran interés por su importancia en las enfermedades de las plantas y los seres humanos, además de su potencial de crecimiento en aplicaciones biotecnológicas (Figura 4) (Palleroni, 1992; Mark *et al.*, 2011).

6

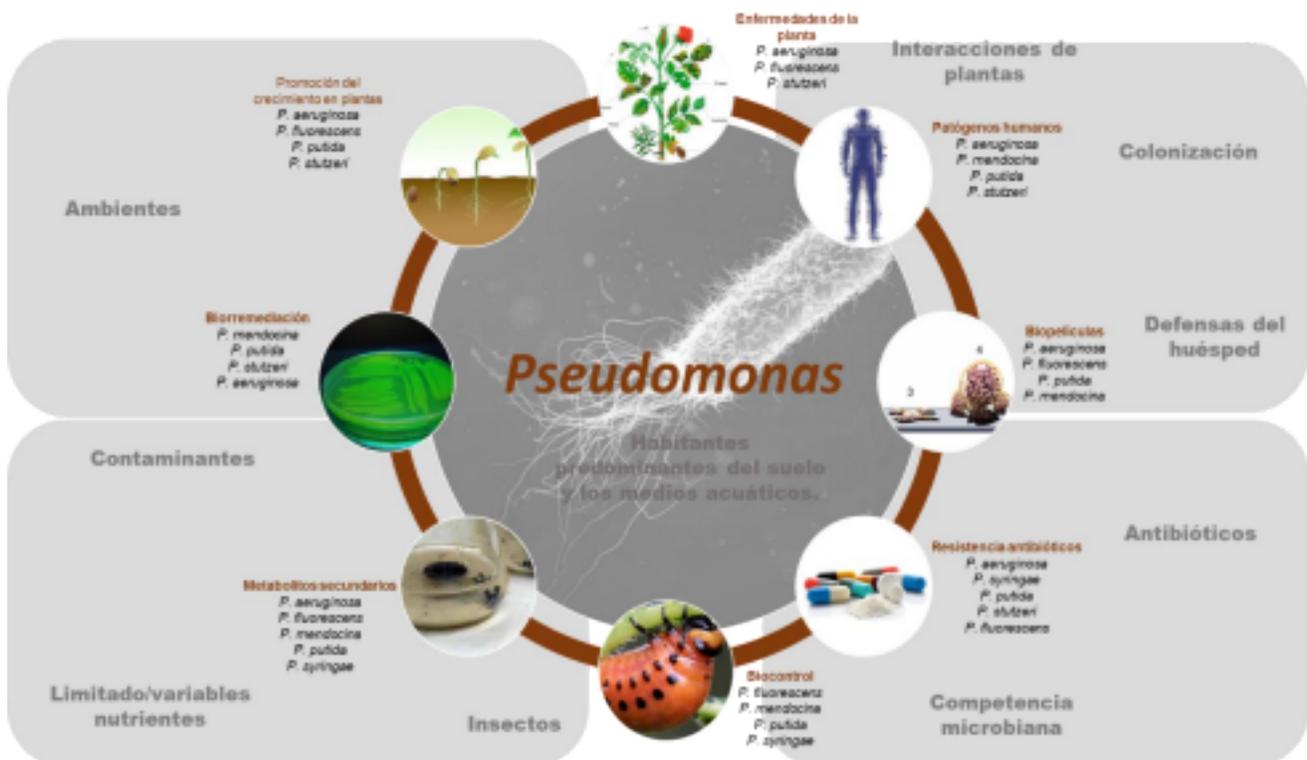


Figura 4. Entornos abióticos y bióticos que ha llevado a la evolución de diferentes rasgos y estilos de vida de las diferentes especies de *Pseudomonas*. Adaptado Mark *et al.*, 2011.

3.1.3. Epidemiología

Pseudomonas aeruginosa constituye uno de los patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos; es reconocida como uno de los grandes problemas de salud a nivel mundial, siendo responsable aproximadamente del 10 al 15% de las infecciones nosocomiales o IAAS (Gellatly,

2013). Las principales variaciones de *Pseudomonas* están relacionadas con el tipo de hospital, área geográfica, servicio, tipo de pacientes, patrón de uso de antibióticos o dependiendo de la epidemiología de cada hospital. De igual modo, su mortalidad oscila entre 35%-70%, según la localización de las infecciones y pronóstico de la enfermedad. (Hernández *et al.*, 2018).

Según la OMS, cada año ciento de millones de pacientes en todo el mundo, tratados en centros hospitalarios, ambulatorios o de consulta externa se ven afectados por las IAAS;

7

Estas infecciones se atribuyen principalmente a la adquisición del microorganismo en pacientes sometidos a ventilación mecánica, tratamiento antibiótico, quimioterapia o cirugía. No obstante, existe una pequeña proporción de individuos que albergan *P. aeruginosa* desde la comunidad y pueden servir como fuente de infección grave. Hasta un 7% de individuos sanos pueden ser portadores; en la garganta, mucosa nasal, piel y hasta un 24% en las heces (Berthelot *et al.*, 2001).

Pseudomonas aeruginosa es considerada la segunda causa de neumonía (17%), la tercera de infección de tracto urinario (7%), la cuarta de infección de herida quirúrgica (8%) y el quinto patógeno más frecuente en muestras de cualquier procedencia (9%) (Solh, 2019). Las causas de estos brotes son diversas, han sido relacionadas con transmisión cruzada por debilidades en los procesos de limpieza, desinfección, aislamiento hospitalario y por último contaminación de medicamentos, desinfectantes o dispositivos (INS, 2020).

Para el año 2018 en Estados Unidos la prevalencia de *P. aeruginosa* multirresistente como causa de IAAS estuvo asociada a 32.600 casos de personas hospitalizados, de los cuales se estima la muerte de 2.700 pacientes. Según datos de US Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2019).

En el caso de Centroamérica en el año 2019 se reportaron los casos de brotes por infecciones de herida quirúrgica causada por *Pseudomonas* resistente a antibióticos carbapenémicos, productora de una metalo-beta-lactamasa en 20 pacientes provenientes de Estados Unidos (OMS, 2019).

Entre el periodo de 2016 al 2019 en Colombia se ha visto un fortalecimiento en más del 60% de la notificación de brotes de infecciones y alta frecuencia de multirresistencia de este microorganismo; entre ellos un total de 333 casos relacionado; de los cuales el 27% fueron asociados a *P. aeruginosa* (92 casos), seguido de *C. auris* (56 casos), y *A. baumannii* (47 casos). Estos microorganismos han sido los de mayor reporte en años anteriores (INS, 2020).

Actualmente la OMS reportó su primera lista de “Patógenos prioritario” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana (Tabla 1), (OMS, 2017). En esta lista se hace especial énfasis en la importancia de las resistencias desarrolladas por bacterias Gram negativas, entre las que se destaca *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, incluida en la categoría de “prioridad crítica”.

Tabla 1. Lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos.

	vancomicina.		
	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a metilina y/o vancomicina.		
	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a claritromicina.		
<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a carbapenemes.			penicilinas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente			
<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , resistente a		
a carbapenemes.	<i>Enterobacteriaceae</i> , resistente a carbapenemes y/o	cefalosporinas de 3° generación.	resistente a fluoroquinolonas.
		<i>Campylobacter spp</i> ,	<i>Salmonellas spp</i> ,

resistentes a
fluoroquinolonas.

Neisseria
gonorrhoeae,

resistente a
cefalosporina de 3^o
generación y/o
fluoroquinolonas.

Haemophilus influenzae, a
resistente a
ampicilina. fluoroquinolonas.
(OMS, 2017)

Shigella spp, resistente

3.1.4. Inmunopatogenicidad

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo predominante en el entorno hospitalario, la mayoría de las infecciones son atribuidas con las defensas del huésped que se encuentran comprometidas; se incluyen pacientes con quemaduras graves, diabetes, cáncer, trasplantes de órganos o inmunodeficiencias adicionales. Este microorganismo es capaz de colonizar de manera oportunista a pacientes con fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Collen *et al.*, 2018).

En el caso del desarrollo de una infección bacteriana pulmonar, *P. aeruginosa* primero debe superar las respuestas de defensa innatas del huésped. Las células caliciformes, ciliadas, basales y neuroendocrinas recubren el epitelio de la mucosa de las vías respiratorias superiores y ayudan a una extensa escalera mucociliar para defenderse de las partículas y los organismos. Las mucinas protegen el epitelio con las inmunoglobulinas secretadas por células plasmáticas, que opsonizan las materias

extrañas. Las enzimas P₄₅₀ desintoxican los xenobióticos en todo el pulmón. En la luz alveolar, los macrófagos se encargan de limpiar regularmente los desechos, el surfactante y los microorganismos para mantener la distensibilidad pulmonar y proteger el epitelio (Figura 5) (Esser and Rannug, 2015).

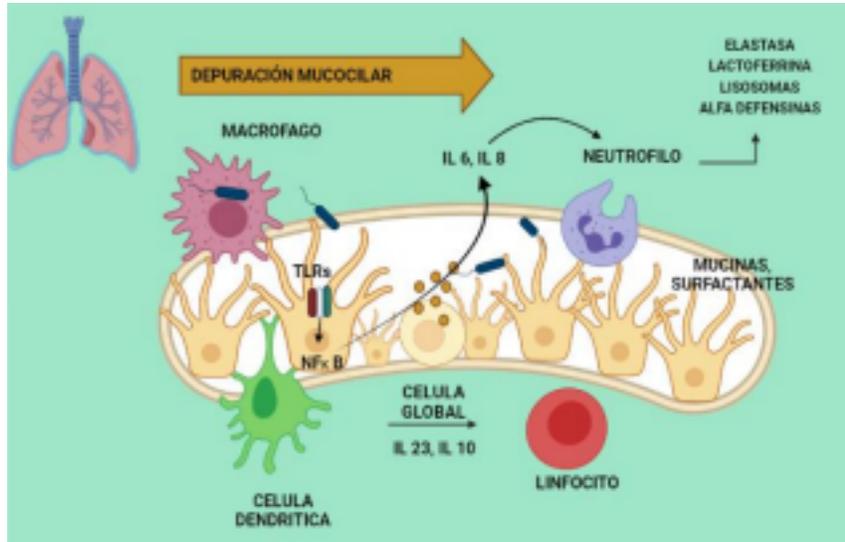


Figura 5. Respuesta del huésped a la infección de las vías respiratorias por *Pseudomonas*.
Adaptado Gellatly and Hancock, 2013.

10

Durante el proceso de infección, *P. aeruginosa* usa 3-oxo-C₁₂-HSL para modular el estado de activación de las células mieloides. Los factores de virulencia elastasa y proteasa alcalina degradan las opsoninas. ExoA y piocianina inducen apoptosis, además de afectar la ingestión de células apoptóticas por macrófagos; este mecanismo de respuesta del microorganismo es provocado por macrófagos, neutrófilos, anticuerpos y el surfactante proteína-A frente al proceso infeccioso (Collen *et al.*, 2018).

En el caso de la respuesta inmune adaptativa los antígenos de *P. aeruginosa* en el pulmón son captados, procesados y presentados a subconjuntos de células T principalmente por las CD. Estas células presentadoras de antígenos, como las células B y los macrófagos, también pueden realizar esta función. Las células epiteliales atípicas llamadas células de micropliegue (M) y las ILC3 también pueden presentar antígeno e interactuar con subconjuntos de células T. La activación de las células T ocurre principalmente en los ganglios linfáticos, pero también puede ocurrir en el BALT, donde se generan distintos subconjuntos (células T auxiliares tipo Th22, Th17, reguladoras T. Los estudios en animales demuestran el efecto de las citocinas Th1, como el IFN-γ y la

Estos factores se encuentran asociados en dos grupos: Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana y factores de patogenicidad secretados (Tabla 2) (Paz *et al.*, 2019).

Tabla 2. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Adaptado Zarza *et al.*, 2019.

FACTORES GENES O PROTEÍNAS INVOLUCRADAS

Asociados a la célula bacteriana

Flagelo FliC, FliD

Pili (Tipo IV) PilA, PilB, PilT, PilU

Proteínas de membrana LecA, LecB, LPS

Secretados

Asociados a la formación de biopelícula PelA-PelG, Psl, Alginato *Efectores SST2*

*LasA, LasB

Efectores SST3 *ExoA, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY

Efectores SST5 *EstA

Pigmentos Píocianina

Efectores quorum sensing LasIR, RhlIR, rhlAb, hcnABC, chic

*SST2, sistema de secreción tipo 2; SST3, sistema de secreción tipo 3; SST5, sistema de secreción tipo 5.

12

3.1.5.1. Factores de Patogenicidad Asociados a la Célula Bacteriana

3.1.5.1.1. Pili y Flagelo

Son unas de las principales adhesinas que están involucrada en la unión a las células del huésped. El Pili es una estructura que le proporciona motilidad, adherencia a superficies celulares y formación de biopelícula. A nivel genómico se han identificado cinco alelos PIL A (grupo I-V), el más conocido es el perteneciente al tipo IV que le otorga la capacidad de adherirse y tener otro tipo de movilidad denominado “Swarming” (Figura 7). El pili tipo IV incluye a las proteínas PilA, PilB, PilT y PilU; Las últimas dos actúan como proteínas motoras, así como para la transducción de energía química ATP en mecánica, a través de la polimerización y despolimerización de PilA (Yang *et al.*, 2017). Este pili IV en conjunto

con dos lectinas solubles, LecA y LecB presentes en la membrana exterior de la bacteria

intervienen en la adhesión hacia las células del hospedero, provocando daño y diseminación del patógeno, participando de su supervivencia y la formación de biopelícula (Al-Wrafy *et al.*, 2016; Persat *et al.*, 2015).

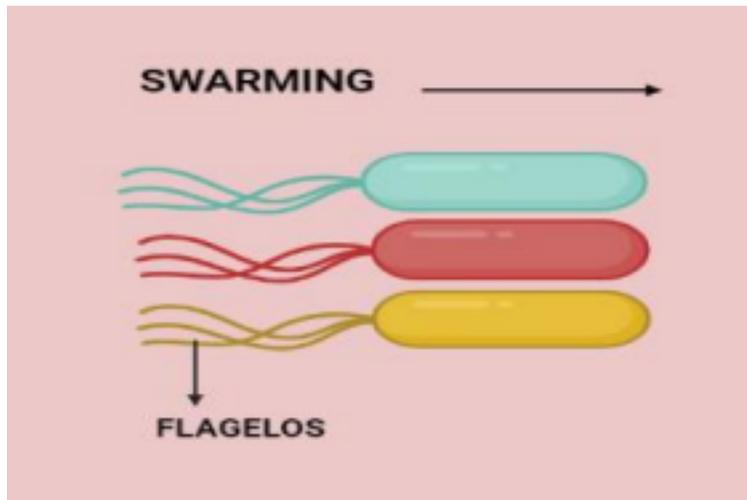


Figura 7. Esquema representando uno de los tipos de movilidad que puede realizar las *P. aeruginosa* sobre superficies. *Swarming* es el movimiento multicelular de bacterias sobre una superficie y está impulsado por el flagelo rotando helicoidalmente. Adaptado Pallaval *et al.*, 2019.

El flagelo de *P. aeruginosa* incluye la proteína flagelar FliD, que le otorga a la bacteria la habilidad de adherirse o fijarse en la mucosa de las vías respiratorias. Así mismo, es probable que esta proteína esté involucrada en la mediación inicial de la interacción con la superficie de la vía aérea uniéndose con el glicoesfingolípidio asialo M1 (aGM1) de las células epiteliales. Esta bacteria también cuenta con la proteína flagelar FliC, factor fundamental que desencadena la secreción de péptidos antimicrobianos por el sistema inmune, liberación de trampas extracelulares mediadas por neutrófilos (NET's) (Rada, 2017).

Recientemente se ha evidenciado que el flagelo también está implicado en la resistencia frente a la acción lítica de las proteínas surfactantes del pulmón. La carencia de un flagelo estructuralmente completo podría afectar la integridad de la membrana externa siendo el microorganismo más susceptible a las proteínas surfactantes (Zhang *et al.*, 2007).

3.1.5.1.2. Proteínas de Membrana

El componente principal de la membrana externa de *P. aeruginosa* es el Lipopolisacárido (LPS), el cual contribuye a mantener la integridad celular de la misma. Este componente está formado del lípido A, el núcleo o Core y el antígeno O (Figura 8); siendo este último esencial para la virulencia del microorganismo, además de permitir que *P. aeruginosa* pueda diseminarse de forma sistémica y actuar como receptor de bacteriófagos (Chaturongakul and Ounjai, 2014). El LPS contribuye a la patogénesis de las infecciones por *P. aeruginosa* y está involucrado en la interacción con receptores celulares o componentes humorales del huésped.

El peptidoglicano, otro componente de la estructura de la membrana, se encuentra ubicado justo debajo de ella. Este copolímero está formado por muropéptidos que activan el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos del receptor inmune innato intracelular (NOD) -2 (55). NOD-1; sin embargo, responde principalmente a un muropéptido único que se encuentra en bacterias gramnegativas, debido a que TLR-4 y NOD-1 son específicos de las bacterias gramnegativas e inducen señales celulares sinérgicas (Collen *et al.*, 2018).

14

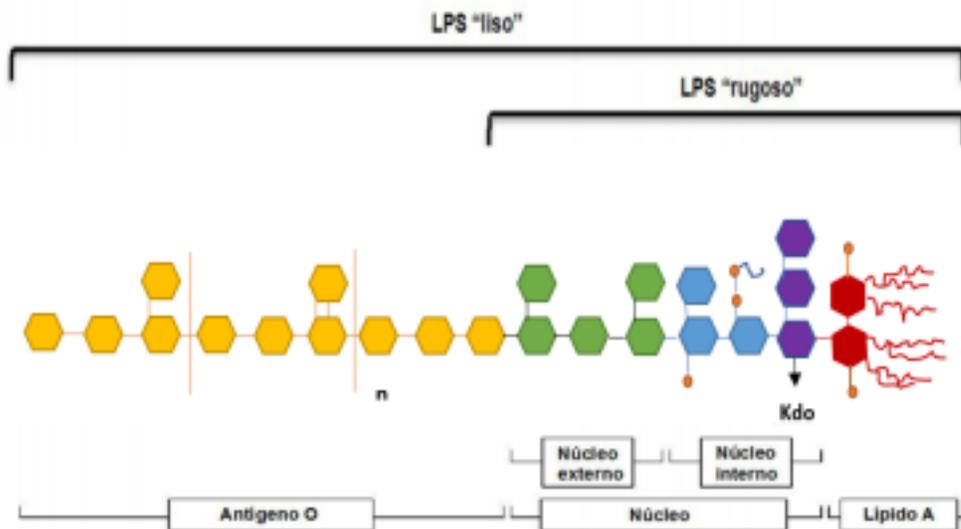


Figura 8.

Esquema de la estructura química general del LPS de *P. aeruginosa*. Los LPS “rugosos” solamente

presentan lípido A y núcleo, mientras que los LPS “lisos” presentan los tres componentes típicos: lípido A, núcleo y antígeno O. Los pentágonos representan monosacáridos, los círculos y las cadenas rojas representan grupos fosfato y cadenas de ácidos grasos, respectivamente. Adaptado Martínez, 2014.

3.1.5.2. Factores Asociados a la Formación de Biopelículas

De los factores de virulencia secretados, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de producir una cápsula extracelular de alginato, un polímero lineal de ácido manurónico y ácido glucurónico. Este microorganismo tiene la habilidad de formar dos tipos de biopelícula; “plana o inicial” y “estructurada o madura”. La primera se caracteriza por presentar una mezcla uniforme de bacterias en la superficie, se inicia cuando el microorganismo se adhiere a la superficie tisular y genera la formación de microcolonias; la segunda presenta agregados celulares inmersos en la matriz de la biopelícula, separada por canales o espacios (Kirisit *et al.*, 2006).

La biopelícula presenta una característica importante; su matriz está formada por diferentes factores secretados, entre ellos: los polisacáridos Pel y Psl, quienes actúan como “pegamento molecular”, formando uniones célula-célula y célula-superficie. Además de jugar un papel fundamental en la etapa inicial de formación del biofilm y en el mantenimiento del mismo (Ma *et al.*, 2006).

Por otro lado, el alginato, ADN extracelular y distintas proteínas como las fimbrias reguladas por los grupos de genes: CupA, CupB y CupC, así como las proteínas de membrana LecA y LecB (Figura 9) (Kirisit *et al.*, 2006).

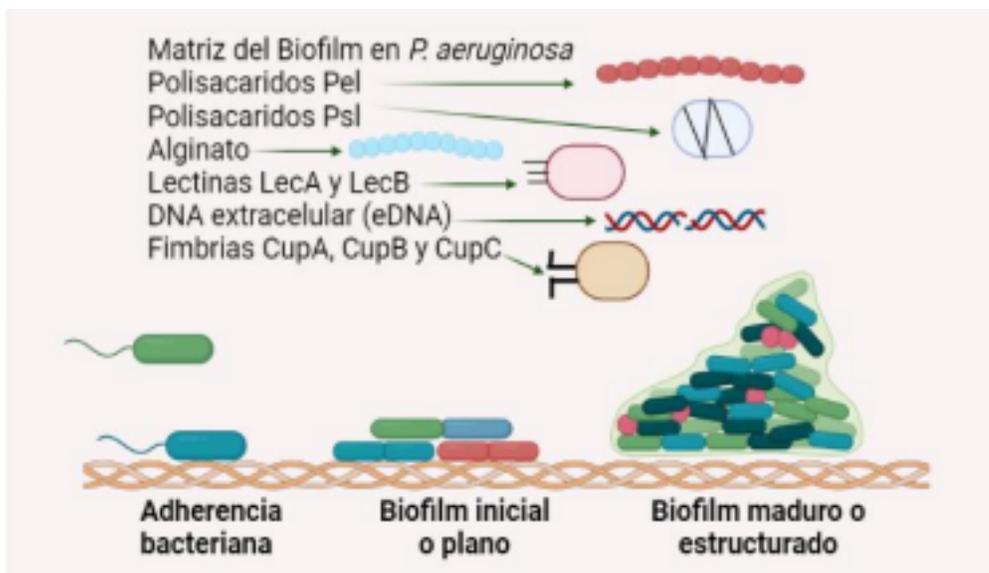


Figura 9. Proceso de formación de la biopelícula en *Pseudomonas aeruginosa*. La adhesión bacteriana permite la formación de la biopelícula plana. La biopelícula madura se establece cuando el agregado bacteriano genera la matriz mediante la producción de factores secretados. La producción de la matriz se basa en los polisacáridos Pel y Psl, la proteína alginato y lectinas como LecA y LecB. Adaptado Zarza *et al.*, 2019.

3.1.5.2.1 Sistema de Secreción de Toxinas

Como parte de los factores de virulencia secretados, la bacteria posee el sistema de secreción de toxinas (SST); entre ellos I, II, III, V y VI. El sistema de Moléculas de secreción tipo I (T1SS) es el responsable de liberar toxinas tipo proteasa alcalina en los espacios extracelulares, permitiendo la inhibición de la formación de fibrina. El sistema de moléculas de secreción tipo II (T1SS) tiene la función de segregar proteínas precursoras con efecto citotóxicos y mediar la inflamación como la fosfolipasa C, exotoxina A, proteasa tipo IV y elastasa; para esta última la producción de LasA y LasB están reguladas por el sistema de “Quorum sensing”. La elastasa LasB es capaz de degradar el colágeno y algunas proteínas ausentes de colágeno,

favoreciendo la propagación de la infección y a su vez destruyendo las barreras físicas; además de inhibir la quimiotaxis de los monocitos (Al-Wrafy *et al.*, 2016).

El tipo III (SST3) es el mecanismo principal de patogenicidad asociado a la secreción de toxinas que tiene *P. aeruginosa*; a través de este sistema se secretan toxinas importantes

como: ExoT, ExoS, ExoU y ExoY, las que pueden llegar a inducir apoptosis (Figura 10) (Benett *et al.*, 2014).

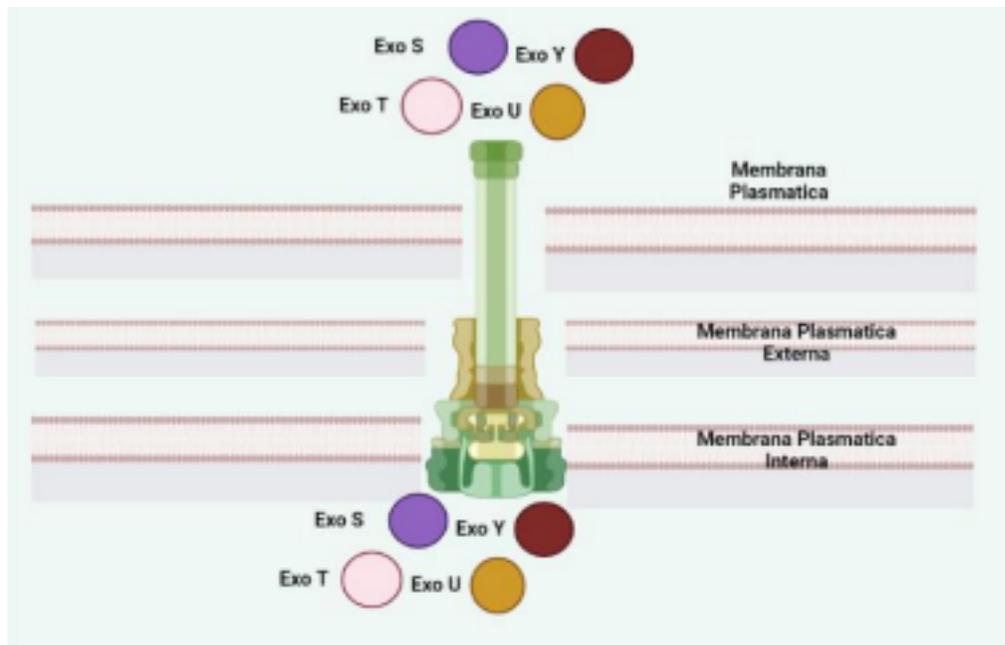


Figura 10.

Estructura del sistema de secreción tipo 3 en *P. aeruginosa*, junto con las proteínas efectoras (ExoU, ExoS, ExoT Y ExoY). Adaptado Naito *et al.*, 2017.

No obstante, para que se pueda realizar la segregación de estas proteínas efectoras se requiere de unas chaperonas que permitan su liberación en el citosol. SpcS es usada para la secreción de ExoS y ExoT; SpcU se responsabiliza del paso de ExoU y para ExoY no se ha demostrado chaperonas (Shen *et al.*, 2008).

La proteína efectora ExoU puede causar la muerte celular o provocar una lesión epitelial alveolar y necrosis en macrófagos. En el caso de ExoS evita que la bacteria no pueda internalizarse en algunas células en específico, confiriéndole un papel importante en la prevención de la fagocitosis; ExoT presenta funciones similares a ExoS. Por último, está la proteína efectora ExoY que puede generar la ruptura del citoesqueleto de actina de la célula y aumentar la permeabilidad endotelial (Sayner *et al.*, 2004).

El sistema de secreción tipo V (SST5) también denominado sistema auto transportador, es una maquinaria macromolecular presente en varios factores de virulencia que

provocan lisis de las células eucariotas y que tienen un rol en la producción de biopelícula y adherencia celular (Al-Wrafy *et al.*, 2016).

3.1.5.2.2. Quórum Sensing

Controla el comportamiento entre bacterias, a través de distintas vías de señalización, además de permitirle regular una gran variedad de procesos biológicos. Cada uno de estos procesos regulan la expresión de un conjunto de genes de virulencia, activados como respuesta a unas moléculas de señalización (autoindicadores) (Figura 11). En el caso de *P. aeruginosa* el QS desempeña un rol importante en su supervivencia y colonización, mediante la coordinación de mecanismo en la etapa de infección (Steven *et al.*, 2012).

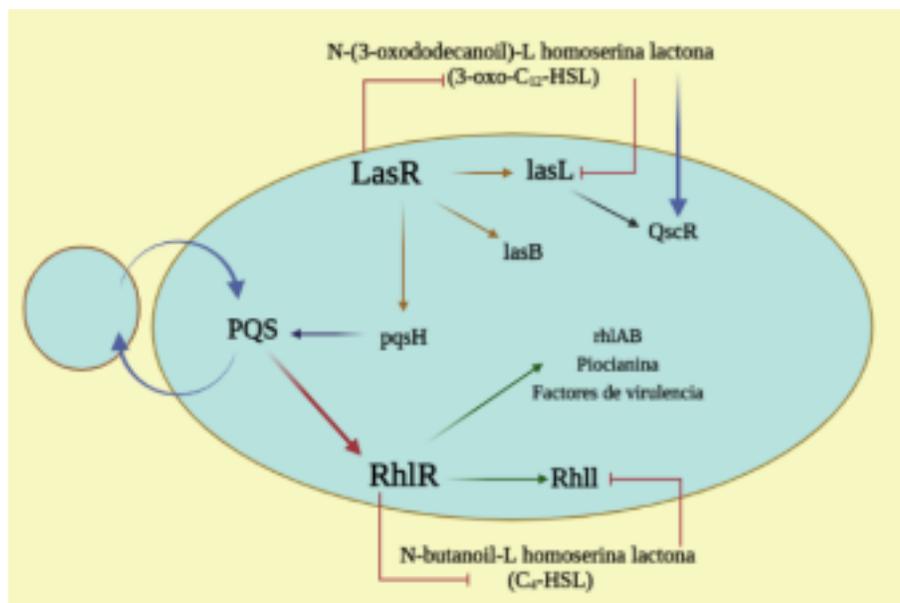


Figura 11. Quorum sensing (QS) en *P. aeruginosa*. La 3-OC₁₂-HSL producida por la sintasa LasI interactúa con el regulador transcripcional LasR que regula lasI, lasB, qscR y pqsH. 3-OC₁₂-HSL también interactúa con el regulador transcripcional huérfano huérfano QscR para reprimir la expresión de lasI. PqsH produce la señal de quinolona PQS que se transporta entre las células a través de vesículas de la membrana externa. PQS induce la expresión del gen RhlR, cuyo producto induce la expresión del gen RhlI sintasa, así como varios otros factores de virulencia cuando es inducido por la señal C₄-HSL. Adaptado Ramsey *et al.*, 2009.

P. aeruginosa presenta dos sistemas QS principales (LasI y RhII) que impulsan la producción y la detección de las moléculas de señalización autoinductoras N- (3-

oxododecanoyl) – L homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL) y N-butanoil-Lhomoserina lactona (C₄ HSL), respectivamente (Rasamiravaka and Jaziri, 2016).

En el sistema, la molécula difusible 3-oxo-C₁₂-HSL se activa e interactúa con los factores de transcripción LasR, cuando alcanzan una concentración umbral putativa en el entorno celular. Esta interacción conlleva al aumento de la expresión de LasI y genera la producción de factores de virulencia que incluyen elastasa LasB, proteasa LasB, proteasa alcalina Apr y exotoxina A (Figura 12). Simultáneamente, la interacción de C₄-HSL con factores de transcripción RhIR aumenta la expresión de RhII y mejora la producción de ramnolípidos, piocianina, elastasa LasB, cianuro de hidrógeno y lectinas citotóxicas. Un tercer sistema QS, basado en la liberación de una 2-heptil-hidroxi-4-quinolona, denominada señal de *Pseudomonas* quinolona (PQS), interaccionan con los sistemas de Acil-homoserina lactonas (AHL) de una manera compleja (Wilder *et al.*, 2011).

Este metabolito secundario de *P. aeruginosa* se integra a los sistemas de QS en momentos de estrés celular y actúa como enlace entre los sistemas QS Las y Rhl (Figura 12). Últimamente, se ha descubierto una cuarta señal de comunicación intercelular denominada "Sistema QS integrado" (IQS), el cual utiliza una nueva clase de moléculas de señal de detección de quórum (2- (2- hidroxifenil) -tiazol-4-carbaldehído). Asimismo, regula positivamente la producción de señales PQS y C₄-HSL, así como los factores de virulencia como piocianina, ramnolípidos y elastasa (Lee *et al.*, 2015).

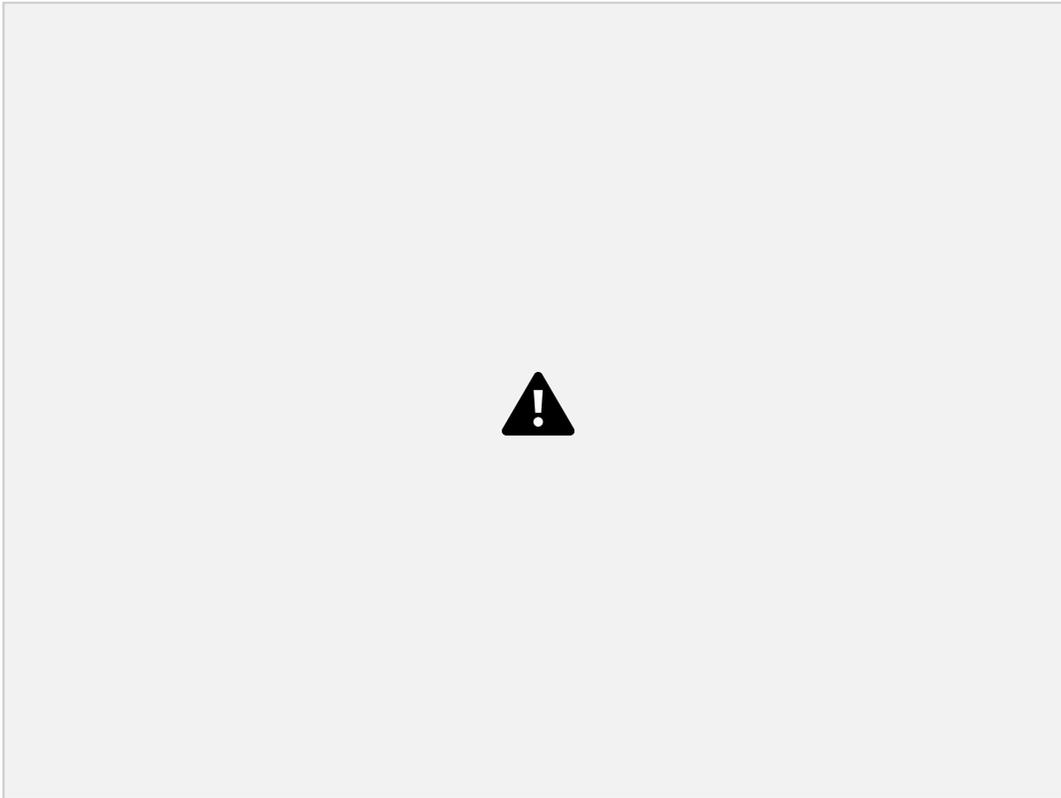


Figura 12. Sistemas de detección de quórum sensing descritos en *P. aeruginosa* (sistemas basados en AHL (las y rhl), sistema basado en quinolonas (PQS) y sistema IQS. Adaptado Rasamiravaka and Jaziri, 2016.

3.2. Formación de Biofilms en *Pseudomonas aeruginosa*

Son diversas las áreas y superficies donde se pueden generar colonización por el crecimiento de biopelículas bacterianas. Siendo las asociadas a la Atención en Salud una de las causas más concurrentes en la proliferación de este tipo de mecanismo que a nivel hospitalario comúnmente son aisladas de catéteres y stents intravenosos (Tacconelli, *et al.*, 2009).

Los microorganismos en las biopelículas son mantenidos unidos por una matriz de biopolímero autoproducida. Esta matriz contiene polisacáridos, proteínas y ADN propios del microorganismo; siendo de vital importancia debido a que proporciona estabilidad estructural y protección a la biopelícula (Costerton *et al.*, 2003).

El desarrollo de la biopelícula inicia con bacterias que se adhieren de forma reversible a una superficie, la cual puede estar cubierta por una capa por lo general de proteínas. En esta etapa, las bacterias siguen siendo susceptibles a los antibióticos; para el siguiente

paso se da la unión irreversible a la superficie, en las próximas horas y la multiplicación de las bacterias, quienes tienden a formar microcolonias en ella (Figura 13) (Tartakovsky and Guiot, 2004).

La biopelícula crece y en esta etapa, muestra una tolerancia máxima a los antibióticos. Posteriormente, sigue una etapa donde las áreas focales de la misma se disuelven y las células bacterianas liberadas se pueden propagar a otra ubicación donde se pueden formar otras biopelículas.

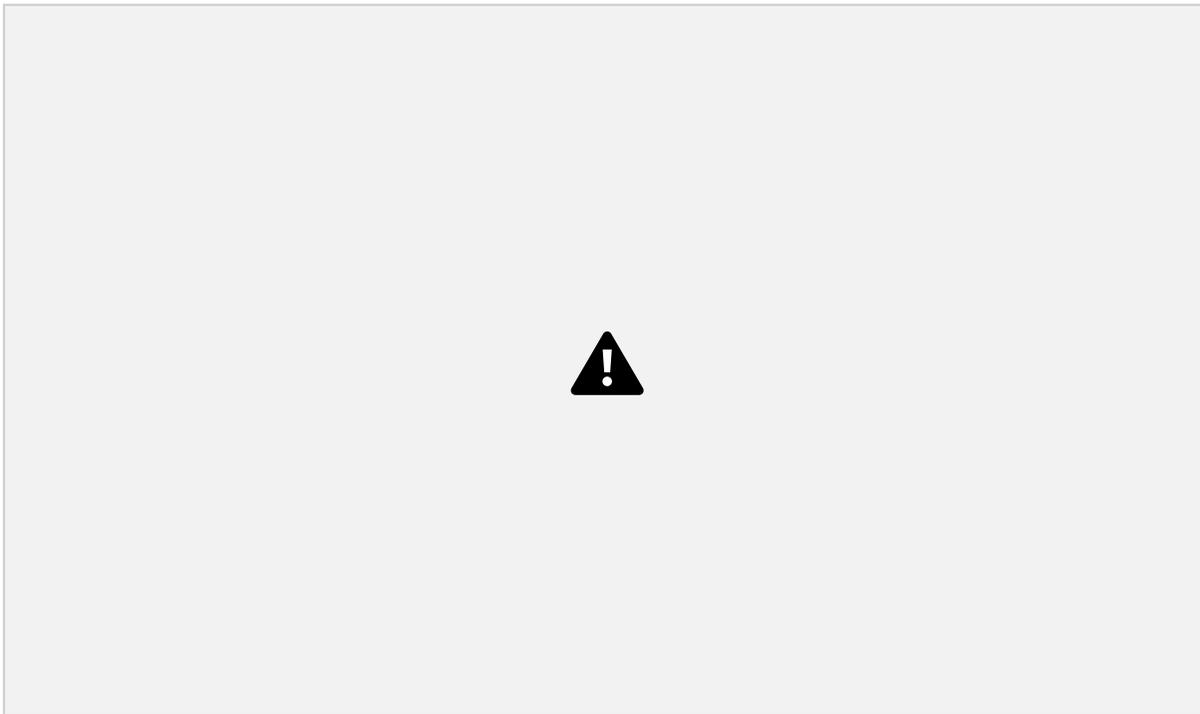


Figura 13. Ciclo de vida de la biopelícula de *P. aeruginosa*. En el estadio I, las bacterias planctónicas inician la unión a una superficie abiótica, que se vuelve irreversible en el estadio II. El estadio III corresponde a la formación de microcolonias. El estadio IV corresponde a la maduración de la biopelícula y el crecimiento de la comunidad tridimensional. La dispersión ocurre en el estadio V y las bacterias planctónicas que se liberan del biofilms para colonizar otros sitios. Adaptada Tartakovsky and Guiot, 2004.

3.3. Blancos Moleculares Asociados a la Patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*.

Actualmente se realizan estudios enfocados a las dianas o blancos moleculares de *P. aeruginosa* como estrategias de inhibición que puedan contribuir en el tratamiento de infecciones resistentes a este microorganismo (Tabla 3).

Tabla 3. Blancos moleculares de *P. aeruginosa* y sus inhibidores. Adaptado Mohd and Asad, 2018.

BLANCO	INHIBIDOR	FUENTE	DESCRIPCIÓN
			Rotura de la pared celular y fuga de proteínas.
Bacteriocina	Suan-tsai (repollo chino fermentado)		
Plantaricina DL3			Anti-biofilm
	<i>Rheum palmatum</i> L		Anti-biofilm
	<i>Rheum officinale</i> Baill		Anti-biofilm
	<i>Peucedanum decursivum</i> (Miq). Maxim		
Crisofanol	Lithospermum		Anti-biofilm
Nodaquenetina	erythrorhizon Sieb.		
	<i>Rheum palmatum</i> L	<i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	Anti-biofilm
Shikonin	<i>Carex pumita</i>		Anti-biofilm
Antibiofilm	Syntethic		Anti-biofilm
Emodina			Fuerte inhibición de la formación de biopelículas
Fraxin			
-Viniferina (dímero de resveratrol)			
(z) -5-octilidenotiazolidina-2,4 diona (TZD C8)	Sintético		Inhibe la producción de piocianina
	Metabolitos secundarios vegetales		Suprime la producción de factores de virulencia y la formación de biopelículas
Compuesto 4	Sintético		Inhibe la formación de biopelículas, regula negativamente los genes reguladores las y rhl
Flavonoides			QS y los genes rhlA y lasB
N- (2-30 pyrimidil) butanamida (C11)	Sintético		Inhibe la expresión de lasB y lacZ y rhlA-lacZ, la producción de piocianina, elastasa y ramnolípidos y la formación de biopelículas
	Producción bacteriana de moléculas bioactivas que afectan la activación del gen autoinductor de una célula vecina, la estructura o las interacciones de unión al receptor.		Reduce la expresión del gen QS
N-decanoil ciclopentilamida			Inhibe la señalización de alquilquinolonas (AQ)
QS Inhibidores Bombas de	Azitromicina		LasR y RhIR inhibidos parcialmente por mBTL, inhiben la producción de piocianina y la formación de biopelículas.
	3-NH2-7Cl-C9-OZN		
	Metabromotiolactona (mBTL)	Sintético	Reduce la formación de biopelículas y el factor de virulencia.
	o-glicerol	Aceite de jengibre Sintético	Inhibidor competitivo de MvfR
	Mθ	mediante la biosíntesis de AQ antagonizante, la expresión de genes de virulencia, la producción de piocianina y el desarrollo de biopelículas.	
	Antibiótico Sintético		
Eflujo	Phe-Arg-naftilamida (PAβN o MC-207)	Sintético	Inhibidor de la bomba de eflujo MDR (bomba de eflujo RND)
LasB	N-mercaptoacetyl-Phe-Tyr-amide	Sintético	Bloquea la acción de lasB, reduce el crecimiento de biopelículas.
funcionalizados con	Policarbonatos		Actividad antibacteriana contra varios patógenos, incluido <i>P. aeruginosa</i> .
Otros	Sideróforos (Hierro)		Marcaje de pioquelina o el galio, que interfiere con el pioverdina con un antibiótico o un metabolismo del hierro de <i>P. aeruginosa</i> .
guanidinio.	Sintético		ión metálico inactivo redox como <i>aeruginosa</i> .

3.3. Fitocompuestos con potencial inhibición del Quórum Sensing en *P. aeruginosa*

La búsqueda de metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos naturales se ha evidenciado por el interés creciente en la función biológica, los roles curativos y su papel en la regulación de las interacciones con microorganismos; Identificándose una variedad de moléculas derivadas de plantas o hierbas medicinales, así como los mecanismos subyacentes en la función de inhibición del QS. Hasta el momento se han descrito cuatro estrategias para llevar a cabo su control; Inhibición de la producción de la señal, antagonismo de la molécula señal en su unión al receptor de la familia LasR, degradación de las señales y captura de las señales (Lu *et al.*, 2019).

3.3.1. Inhibición de la producción de la señal

Las AHLs son obtenidas por proteínas tipo LasI, a partir de derivados de ácidos grasos conjugados con la proteína transportadora de grupo acilo (acil-ACP) y un anillo de homoserinalactona, que proviene de la S-adenosilmetionina (SAM). La obtención se origina con un ataque nucleofílico sobre el carbono carboxílico C-1 de la molécula acil-ACP por parte del grupo amino de SAM, seguido por la lactonización de SAM que resulta en la formación del anillo y la posterior liberación de la AHL (Figura 14); Entre los compuestos que presentan este mecanismo de acción se han identificado, la N- (heptilsulfanilacetil) -L-Homoserina Lactona del extracto de *Allium sativum*, flavonoide flavan-3-ol-catequina de *Combretum albifloram*, quercetina, hordenina y partenolidos como inhibidores de la regulación de genes LasI, LasR, RhII, RhIR y por ende de la expresión del auto inductor AHL (Lu *et al.*, 2019).



3.3.2. Antagonismo de la molécula señal en su unión al Receptor

Las AHLs actúan uniéndose directamente a los receptores LasR, de tal manera que el complejo así formado, LasR /AHL activa o reprime múltiples genes diana generando un circuito de autoinducción positiva (Vipin, 2015). Algunos metabolitos que actúan como antagonistas de la AHL, son compuestos azufrados; la Iberina (**1**) aislada de los extractos del rábano picante y el Ajoeno (**2**) del ajo (Figura 15). Estos productos naturales inhiben el sistema de QS de *Pseudomonas aeruginosa* en uno o en los dos sistemas Las y Rhl, compitiendo con las AHLs por la unión a LasR o RhlR (Jakobsen *et al.*, 2012).

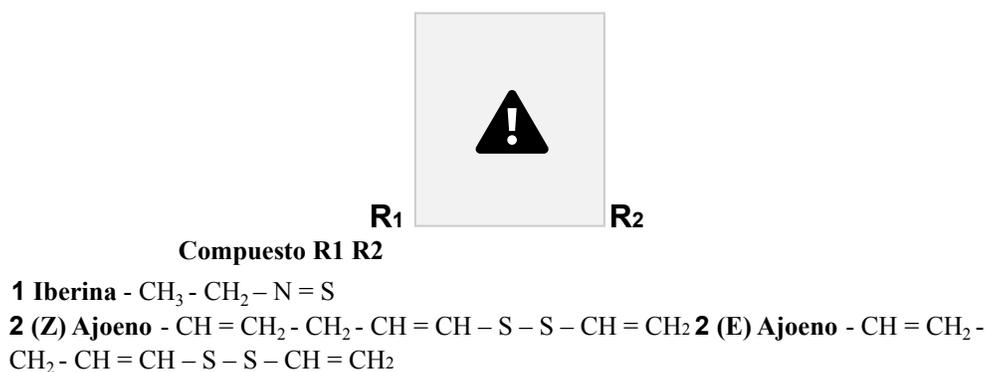


Figura 15. Moléculas inhibidoras del QS aisladas del rábano picante y ajo.

3.3.3. Degradación de la Señal AHL

Se ha evidenciado la existencia de plantas y microorganismos con capacidad de producir enzimas que permitan degradar la señal de AHL de *P. aeruginosa*; las lactonasas encargadas de abrir el anillo de lactona y las amidasas que cortan la AHLs en el enlace amida liberando la unidad de ácido graso (LaSarrea *et al.*, 2013).

3.3.4. Captura de la Señal AHL

Este mecanismo está basado en que la comunicación celular no se produce cuando se mantiene la concentración de la señal del autoindicador por debajo del umbral, es decir, que una molécula que pueda capturar la AHL generaría una inhibición del QS en *P. aeruginosa*.

Sin embargo, existe poca información de metabolitos secundarios que tengan la función de

capturar la molécula de señalización; No obstante, el empleo de estructuras macromoleculares como las ciclodextrinas, son consideradas potencial agente interceptor por su capacidad de formar complejos (Ikeda *et al.*, 2002)

En la Tabla 4 y 5 se describen e ilustran los compuestos o extractos de plantas estudiados con sus respectivos mecanismos moleculares en los efectos Anti-biofilm en *P. aeruginosa*.

Tabla 4. Extractos naturales y sus mecanismos moleculares Anti-biofilm. Adaptado Lu *et al.*, 2019.

EXTRACTOS DE PLANTAS	MECANISMO DE ACCIÓN EFECTO ANTI-BIOFILM ILUSTRACIÓN *
<p>biopelículas y reducción de la producción de exopolisacáridos.</p>	
<p><i>Extracto Herba patrinia</i> Genes asociados a la biopelícula Inhibición de la formación de</p>	
<p><i>Chamaemelum nobile</i> No investigado Extracto de flores de</p>	<p>Inhibición del Swarming y formación de biofilms.</p>
<p>Extracto etanólico de hoja de <i>P. betle</i> (PbLE)</p>	<p>Inhibición de la</p>
<p>Piocianina producción de piocianina y reducción</p>	<p>de la capacidad de Swarming, swimming y twitching.</p>
	

* Tomado de Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponible <https://tropicos.org/home>

Tabla 5. Agentes Anti-biofilm naturales y sus mecanismos moleculares.

Metabolitos	Mecanismo / objetivos moleculares	Efectos Anti-biofilm	Tipo de	Metabolito	Resultados del Estudio	Estructura	Química	Referencias
-------------	-----------------------------------	----------------------	---------	------------	------------------------	------------	---------	-------------

Los perfiles de AHL sintetizados por *Pseudomonas* en medio suplementado con las concentraciones de carvacrol se analizaron con un cromatógrafo de

2-methyl-5-propan-2- ylphenol (Carvacrol)

Timol

(*Thymus vulgare*) **HOJAS DETOMILLO**

Hordenina
(*Hordeum vulgare*)

CEBADA

Genes relacionados QS

Genes relacionados QS

Inhibición de la producción de autoinductores de detección de quórum (AHL), la motilidad, la expresión del gen del flagelo (*figA*) y la capacidad de formación de biofilms.

MIC (2.0 uL/ml)

Fenotipos bloqueados controlados por QS como la formación de biopelículas y factores de virulencia reducidos.

MIC (0,5 - 1,0 mg/mL)

Monoterpenoide Alcaloide

líquidos equipado con un detector DAD acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución y tiempo de vuelo (TOF) (Agilent 6224) con una fuente ESI.

El carvacrol y timol suprimieron significativamente la motilidad bacteriana y redujeron el nivel de ARNm del gen del flagelo. Los cambios en la expresión del gen *figA* relacionado con la AHL inhibieron significativamente la formación de biopelículas en superficies de acero inoxidable y sólo se presentaron células bacterianas individuales en las superficies.

Se evaluó la actividad inhibidora del QS de la hordenina contra el patógeno de origen alimentario *P. aeruginosa*, en concentraciones que van de 0,5 a 1,0 mg/mL inhibiendo los niveles de AHLs.

La interrupción de los biofilms preformados, evaluados mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido láser (CLSM).

Inhibición de la producción de factores de virulencia extracelulares relacionados con el QS de *P. aeruginosa* PAO1. Además, del análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real demostró que las expresiones de los genes relacionados con él QS, LasI, LasR, RhII y RhIR, se suprimieron significativamente.



(Myszka et al., 2016)



(Zhou et al., 2018)

26

Quercetina (*Centella asiática* L)

LasI, LasR, RhII y RhIR

Inhibición de la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia.

MIC (300mg/mL)

Expresión de genes relacionados con QS inhibidos que incluyen LasI / Flavonol

Se determinó el posible mecanismo de acción inhibitorio de QS sobre la actividad autoinductora, mediante la medición de AHLs utilizando el biosensor de *P. aeruginosa* PAO1.

El Extracto de *Centella asiática* redujo la producción de piciocianina de PAO1 en un 80% cuando se administró a una concentración de 300mg/mL, la producción de proteasa y formación de Biofilms a concentraciones de 100-400mg/mL.

En el estudio realizado observó una disminución significativa de los factores de virulencia y de la formación de biofilms cuando se trató con la concentración sub-MIC (1mM) de Partenólido.

Los estudios de regulación génica mostraron la regulación de la sintasa autoinductora (LasI, RhII), así como de sus receptores (LasR y RhIR), con una reducción de LasR en un 57% en comparación con el control. Los estudios de microscopía fluorescente asociados a la biopelícula tras la aplicación de Partenólido (Vasavi *et al.*, 2016)



Partenólido LasI, RhII, LasR, RhIR y

la sustancia polimérica extracelular

LasR y RhII / RhIR y sustancia polimérica extracelular regulada negativamente.

Sub-MIC (1mM)

Lactona

sesquiterpinica

La tinción con FITC-ConA y yoduro de propidio mostraron una reducción de la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la muerte de células bacterianas tras el tratamiento con Partenólido.

La inhibición del QS por el Partenólido se validó estudiando las interacciones moleculares entre el LasR y el Partenólido. El análisis de acoplamiento molecular in silico del Partenólido con la proteína reguladora del QS reveló que se une al dominio de unión al ligando (LBD) de LasR muy fuertemente cuando se compara en términos de energía de unión con el ligando nativo 3-oxo-C12 HSL.



(Kalia *et al.*, 2018)

27

Flavonoide
flavan-3-ol
catequina

**(*Combretum*
albifloram)**

(2E)-3-Phenylprop 2-enal
(Cinnamaldehido) **(*Cinnamomun sp*) CANELA**

2-Methoxy-4-(prop-2-en-1-yl) phenol
(Eugenol)

**(*Syzygium*
aromaticum)**

CLAVO

Regulación de genes *LasI*, *LasR*, *RhlI*, *RhlR*

La unión a receptor de tipo LuxR de tipo LuxR y/o interacción con la sintasa de tipo LuxI (LasI)

Unión a proteínas de tipo LuxR (LasR)

Regulación de los genes de las AHL sintasas (LasI y RhII); interacción con la sintasa de tipo LuxI.

Expresión de genes relacionados con QS inhibidos que incluyen LasI / LasR y RhII / RhIR.

Inhibición de los factores de virulencia regulados por QS (proteasa, elastasa, piocianina) y formación de biopelículas.

Inhibición de la biosíntesis de elastasa, proteasa, piocianina y pioverdina regulada por QS.

MIC (400 μ M)
Flavonoide

Fenilpropanoides Fenilpropanoides

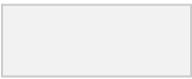
La catequina obtenida a partir del extracto de *C. albifloram* tiene un efecto negativo significativo sobre la producción de piocianina, elastasa y la formación de biofilms, así como sobre la expresión de los genes regulados por QS LasB y RhlA y de los genes reguladores clave de QS LasI, LasR, RhlI y RhlR. El uso de biosensores basados en RhlR y LasR indicó que la catequina podría interferir con la percepción de la señal QS N-butaniloil-L-homoserina lactona por RhlR, lo que conduce a una reducción de la producción de factores QS.

El trans-cinnamaldehído (CA) y el ácido salicílico (SA) inhiben significativamente la expresión de genes reguladores y de virulencia de QS en *P. aeruginosa PAO1* a niveles sub-inhibidores sin ningún efecto bactericida. CA redujo eficazmente los sistemas las y rhl, durante la fase de crecimiento estacionario. Factores de virulencia como la proteasa, elastasa y piocianina en un 65%, 22% y 32%, respectivamente, fueron inhibidas por el Cinnamaldehído.

El Eugenol a 400 μ M redujo significativamente la formación de biofilms en los catéteres urinarios y los factores de virulencia; incluidos los polisacáridos extracelulares, ramnolípidos, elastasa, proteasa, piocianina y pioverdina.

El estudio demostró un efecto marcado sobre la producción de señales de QS (AI) sin afectar su integridad química. En silico los estudios de docking demostraron una unión molecular estable entre el Eugenol y los receptores QS. (Vandeputte *et al.*, 2010)





(Rathinam *et al.*, 2017)

28

4. CONCLUSION

El tratamiento de infecciones asociadas a biofilms es actualmente un desafío complejo que requiere desarrollar nuevas estrategias antimicrobianas para superar los problemas de resistencia frente a los antibióticos; es por ello que este trabajo es una herramienta para futuras investigaciones que estén encaminadas a identificar las interacciones existentes entre las células, los genes implicados en la formación y desarrollo de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.

La información tomada como base para el desarrollo de esta monografía indica la importancia de los mecanismos de actividad Antibiofilm de las moléculas derivadas de productos naturales, que actúan como agentes inhibitorios del Quórum sensing dependiente de autoindicadores (AHLs). Gran parte de estos metabolitos secundarios (Terpenos, Fenilpropanoides, Flavonoides, Alcaloides, Lactonas y Compuestos azufrados) evidencian efectos directos sobre los genes y proteínas relacionadas con la comunicación celular (LasI, LasR). La estabilidad y resistencia a la degradación por parte del metabolismo del huésped y su fácil transporte a través

de las células hasta su lugar de acción, los hacen los candidatos ideales para futuros desarrollos enfocados en la síntesis de nuevos fármacos.

RECOMENDACIONES

A continuación, se enumeran las recomendaciones a tener en cuenta como línea base para la estructuración de proyectos e investigaciones:

1. Promover los estudios a partir de compuestos naturales como alternativa para el tratamiento de enfermedades asociadas a la atención Hospitalaria.
2. Promover a la Universidad de Cartagena y a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas mantener y fortalecer las asignaturas relacionadas con el tema abordado en este trabajo.
3. Profundizar dentro del plan de estudio asignaturas como Fitoterapeutas, microbiología, botánica y biología, para reforzar el conocimiento y el espíritu investigativo dentro de la comunidad académica.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, HA., Shaldam, MA. (2016). Glyceryl trinitrate is a novel inhibitor of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Afr Health Sci.* 16(4),1109–1117.
- Ahmed, S. A., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S., Marchant, R., Banat, I. M. (2019). Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(8), 3521-3535.
- Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., Gamian, A., Al-Wrafy, FA. (2016). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postep. Hig Med Dosw.* 70(70), 78-91.

Arias, CR., Rosado, U., Vargas, A., Grajales. (2016) Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc; 54 (1), 20-4.

Allegretta, G., Maurer, CK., Eberhard, J., *et al.* (2017) In-depth profiling of MvfR-regulated small molecules in *Pseudomonas aeruginosa* after quorum sensing inhibitor treatment. Front Microbiol. 8, 924.

Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., Gamian, A. (2016). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. Postep. Hig Med Dosw, 70(70).

Bennett, J., Dolin, R., Blaser, M., Mandell, D. (2014). Bennett's principles and practice of infectious diseases. Elsevier, 3463-3480.

Berthelot, P., Grattard, F., Mahul, P., *et al.* (2001) Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically

ventilated patients. Intensive Care Med, Mar 27(3), 503-12.

Cantón, R., Aznar, J., Cercenado, E., Cisterna, R., Romo, F. G., Rubio, C. (2011). Sensibilidad de microorganismos gramnegativos de infecciones intraabdominales y evolución de los aislados con β -lactamasas de espectro extendido en el estudio SMART en España (2002-2010). Original, 24(4), 223–232.

Center for Disease Control and Prevention. (2019). MULTIDRUG-RESISTANT *Pseudomonas aeruginosa*. Disponible: www.cdc.gov/DrugResistance/BiggestThreats.html

Chaturongakul, S., Ounjai, P. (2014) Phage-host interplay: examples from tailed phages

and Gram-negative bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 5, 442.

CLSI. (2010). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. USA.

Collen, S., Curran., Bolig, T., Torabi-Parizi, P. (2018). Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Volume 197 Number 6.

Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of clinical investigation.* 112(10), 1466–1477.

D’Almeida, R., Molina, R., Viola, C., *et al.* (2017). Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*. *Bioorg Chem.* 73, 37–42

Ditu, L. M., Chifiriuc, M. C., Bezirtzoglou, E., Voltsi, C., Bleotu, C., Pelinescu, D., Mihaescu, G., Lazar, V. (2011). Modulation of virulence and antibiotic susceptibility of

enteropathogenic *Escherichia coli* strains by *Enterococcus faecium* probiotic strain culture fractions. *Anaerobe* 17, 448-451.

32

Donlan, R. M. (2002). Biofilm: Microbial life on surfaces. 8(9), 881–890.

Esser, C., Rannug, A. (2015) The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev.* 67, 259–279.

Gallardo, M. (2009). Búsqueda del regulón “QUORUM SENSING” de *Acidithiobacillus Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante estudios proteómicos y determinación del

efecto del Fe^{2+} sobre las AHLs producidas por la bacteria.

Gellatly, S. L., Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, 67(3), 159-173.

Ghosh, R. (2019). Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: A Review. 81(January), 797–806.

Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Remy, B., Elias. (2017). Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors. *Front Microbiol.* 8, 227.

Gómez-Estrada, H., Díaz, F., Franco, L., Mercado, J., Guzmán, J., Medina, D., Gaitán, R. (2011). Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 7(27), 1-1.

Greenberg, E. P. (2003). Bacterial communication and group behavior. *Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1288-1290.

Gutiérrez, J., Ramírez, A., Martínez, M., Coria, J., Armenta, L., Ayala, J., Bernal, S., Flores, F., García, F., Monjardín, J., Martínez, G., Gutiérrez, V., Suárez, J. (2017). Estudio

multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev. Latinoamericana de Infectología Pediátrica*; 30 (2), 68-75. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/rlip>

33

Hernández, A., Yagüe, G., García, E., Simón, M., Moreno, L., Canteras, M., Gómez, J. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. 31(2): 123–130.

Holban, AM., Bleotu, C., Chifiriuc, MC., Lazar, V. (2013) Control of bacterial virulence by cell-to-cell signalling molecules Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. *Formatex*. 1, 978–984.

Ikeda, T., Inoue, Y., Suehiro, A., Ikeshoji, H., Ishida, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., Ohtake, H. (2002). The Effects of Cyclodextrins on Autoinducer Activities of Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*, 44 (1/4), 381-382.

Instituto Nacional de Salud. (2020). Boletín Epidemiológico Semanal. Resultados de la Vigilancia de brotes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud IAAS, Colombia. Disponible en:
https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_10.pdf

Jakobsen, T., Bragason, S., Phipps, R., Christensen, L., Van Gennip, M., Alhede, M., Skindersoe, M., Larsen, T., Hoiby, N., Bjarnsholt, T. (2012). Food as a Source for Quorum Sensing Inhibitors: Iberin from Horseradish Revealed as a Quorum Sensing Inhibitor of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (7), 2410–2421.

Journal of the Indian Institute of Science. (2020). Swarming in Bacteria: A Tale of Plasticity in Motility Behavior. 100, 515-524.

Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Sharma, D., Narvi, S. S., Agarwal, V. (2018). Exploring the impact of parthenolide as anti-quorum sensing and anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Life sciences*, 199, 96-103.

Kirisiti, M., Parsek, M. (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell. Microbiol.* 8 (12), 1841-9.

Kusum, H., Ravi, K., Sukhvinder, S. (2009). Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.

LaSarrea, Brea, Federle, M. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 73 - 111.

Lee, J., Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1), 26–4.

Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J. (2019). Developing natural products as potential anti -biofilm agents. *Chinese Medicine*, 1-17.

Ma, L., Jackson, K., Landry, R., Parsek, M., Wozniak, D. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of bacteriology*, 188(23), 8213–8221.

Malmström, J., Karlsson, C., Nordenfelt, P., Ossola, R., Weisser, H., Quandt, A., Björck, L. (2012). *Streptococcus pyogenes* in human plasma: adaptive mechanisms analyzed by mass spectrometry-based proteomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1415-25.

Mark, Silby., Craig, Winstanley., Scott, Godfrey., Stuart, Levy., Robert, Jackson. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *Rev* 35, 652-680.

Martínez, I. (2014). Papel de EF-TU en la interacción de *Pseudomonas aeruginosa* con los queratinocitos humanos.

Merino, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: una bacteria con personalidades múltiples. *Revista argentina de microbiología*. 39(3), 143.

Myszka, K., Schmidt, M. T., Majcher, M., Juzwa, W., Olkowicz, M., Czaczyk, K. (2016). Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 252-259.

Mohd, W., Khan, Asad U. (2018). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*.

Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., Iqbal, M. (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 265.

Naito, Y., Moriyama, K., Sawa, T. (2017). Anti-PcrV immunization for *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis, In: Progress in Understanding Cystic Fibrosis. Sriramulu, D. (ed) InTechOpen.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). Las medicinas tradicionales, complementarias y alternativas. [Consultado: 9 de Junio 2020.] Disponible: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. [Consultado: 24 de Noviembre de 2020.] Disponible: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). Nota descriptiva N°194: Resistencia a los antimicrobianos. [Consultado: 9 de Junio 2020.] Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Listado de las bacterias para las que

se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [comunicado 27 de Febrero 2017].
Disponible: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Organización Panamericana de la Salud (2019). Módulos de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades, segunda edición. Washington D.C, OPS. 49 p (serie PALTEX N° para Técnicos y Auxiliares N° 24)

Organización Mundial de la Salud (2019). Infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemasa. México. Brotes Epidémicos. Disponible en: <https://www.who.int/csr/don/5-march-2019-carbapenem-resistant-p-aeruginosa-mex/en/>

Pallaval, V., Yugandhar, N., Prathyusha, A., Mohana, G., Jalaja, N., Nagam, V. (2019). Quorum Sensing Regulated Swarming Motility and Migratory Behavior in Bacteria.

Palleroni N.J. (1981). Introduction to the Family Pseudomonadaceae. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_58

Palleroni NJ (1992) Introduction to the Pseudomonadaceae. The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, Vol. III, 2nd edn (Balows A Truper HG Dworkin M Harder W Schleifer KH, eds), pp. 3071–3085. Springer, New York.

Peix, A., Ramírez, H., Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*. 9(6), 1132-1147.

Pejin, B., Ciric, A., Glamoclija, J., Nikolic, M., Sokovic, M. (2015) In vitro anti-quorum

sensing activity of phytol. *Nat Prod Res.* 29 (4), 374-377.

Persat, A., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., *et al.* (2015). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(24), 7563-8.

Persson, T., Hansen, T., Rasmussen, T., Skinderso, M., Givskov, M., Nielsen, J. (2005) Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem.* 3, 253–62.

Rada, B. (2017). Neutrophil extracellular trap release driven by bacterial motility: Relevance to cystic fibrosis lung disease. *Commun. Integr. Biol.* 10(2).

Ramsey, M., Korgaonkar, A., Whiteley, M. (2009). *Quorum-Sensing in Bacteria.* The University of Texas at Austin, Austin, TX, USA. Elsevier Inc.

Rasamiravaka, T., Jaziri, M. (2016). Quorum-Sensing Mechanisms and Bacterial Response to Antibiotics in *P. aeruginosa*. 73, 747–753.

Rasamiravaka, T., Quentin, L., Duez, D., aziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms.

Rasmussen, Thomas, B., Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology (Reading, England)*, 152(4): 895-904.

Rathinam, P., Vijay Kumar, H. S., Viswanathan, P. (2017). Eugenol exhibits anti-virulence properties by competitively binding to quorum sensing receptors. *Biofouling*, 33(8), 624-639.

Sayner, S., Frank, D., King, J., Chen, H., Van de Waa, J., Stevens, T. (2004) Paradoxical Camp-Induced lung endothelial hypermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Microbiol.* 95(2), 196-203.

Shen, D., Quenne, L., Bonnet, M., Derouazi, M., Toussaint, B., Polack, B. (2008). Orf1/SpcS chaperones ExoS for type Three Secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ.* 21 (2), 103-109.

Solh, A., Alhajhusain, A. (2009). Update on treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother*; 64 (2), 229-38.

Steven, A., Schster, M., Rumbaugh, K. (2012). Working together for the common Good: cell-cell communication in bacteria. *J Bacterial.* 194(9), 2131-2141.

Tacconelli, E., Smith, G., Hieke, K., Lafuma, A., & Bastide, P. (2009). Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates. *The Journal of hospital infection*, 72(2), 97–103.

Tartakovsky B., Guiot S.R. (2004) Biofilm Modelling. In: Nedović V., Willaert R. (eds) *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology. Focus on Biotechnology*, vol 8A. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3_26

Thomson, K. S. (2010). Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC and Carbapenemase issues. *J Clinic Microbial Apr*; 48(4), 1019-25.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 24 Jul 2021 <<https://tropicos.org>>

Vasavi, H. S., Arun, A. B., Rekha, P. D. (2016). Anti-quorum sensing activity of flavonoid rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Journal of microbiology, immunology and infection, 49(1), 8-15.

Vandeputte, OM., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Jaziri, ME., *et al.* (2010) Identification of catechin as one of the flavonoids From *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 76(1), 243-53.

Vanegas, J. (2011). Búsqueda de Compuestos Inhibidores de Quorum Sensing (IQS) a Partir de Extractos de Origen Natural. Primera Fase.

Vipin, C. (2015). Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight. Delhi: Springer India.

Walker, T., Bais, E., Déziel, H., Schweizer, L., Rahme, R., Fall, and Vivanco, J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.* 134, 320-331.

Wilder, CN., Diggle, SP., Schuster, M. (2011). Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: The roles of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems. *ISME J* 5(8):1332–1343.

Whitman, W. B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., & Nedashkovskaya, O. I. (2016). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*.

Yang, J., Toyofuku, M., Sakai, R., Nomura, N. (2017). Type IV pili mechanochemically

regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* 9(3), 239-49.

- Zarza, V., Mangwani, Simran., Martínez, Alejandra., Álvarez, Diego., Solano, S., Vázquez, Rosalino. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189.
- Zhang, S., McCormack, F., Levesque, R., O'Toole, G., Lau, G. (2007). The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PloS one*, 2(6), e564.
- Zhou, J. W., Luo, H. Z., Jiang, H., Jian, T. K., Chen, Z. Q., Jia, A. Q. (2018). Hordenine: a novel quorum sensing inhibitor and antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(7), 1620-1628.