



Caracterización *in silico* de los genes de virulencia *PhoP -PhoQ* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fenotipo multidrogo-resistente (MDR)

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C, 03 de septiembre del 2021**



Caracterización *in silico* de los genes de virulencia *PhoP -PhoQ* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fenotipo multidrogo-resistente (MDR)

Laura Ximena Rodríguez Vásquez

Asesor(a) interna:

Ruth Mélida Sánchez Mora

Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Asesor(a) externa:

Ibeth Cristina Romero Calderón PhD.

Docente Universidad Nacional de Colombia

Sede La Paz

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

Trabajo de grado
Bogotá D.C, 03 de septiembre del 2021



Caracterización *in silico* de los genes de virulencia *PhoP -PhoQ* en cepas de
Pseudomonas aeruginosa fenotipo multidrogo-resistente (MDR)

Meritoria: _____
Laureada: X
Aprobada: _____

JURADOS: Luisa Fernanda Castillo León
Edith Del Carmen Hernández Rojas

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá D.C, 03 de septiembre del 2021

Dedicatoria

Con el alma y desde el corazón, quiero agradecer a las personas que con acciones o palabras lograron impulsarme a dar este paso. Especialmente recordaré a mi asesora y maestra Ibeth Cristina Romero ya que sin su guía nada de esto hubiera sido posible, gracias por la paciencia, por los consejos y dedicación que han marcado la diferencia, también gracias a mi asesora interna Ruth Sánchez por su participación. En segundo lugar, quiero agradecer a mis padres Ciro Rodríguez y Mery Vásquez por la educación que me han brindado y su fe en mis capacidades. En tercer lugar, agradezco a Valentina Hidalgo, Luisa Amador y Geraldine Rojas por el apoyo emocional y la esperanza brindada en cada paso. Gracias a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a cada docente que participó en mi formación profesional.

Este trabajo de grado va dedicado a Isabella Sánchez Rodríguez, que llegó a este mundo no solo a enseñarme a ser tía sino a ser una mejor persona, y por último y no menos importante, a mi abuelita que desde el cielo cuida mis pasos.

Muchas gracias

Tabla de contenido

	Página
Resumen	9
Introducción	11
1. Objetivos	13
1.1 Objetivo general	13
1.2 Objetivos específicos	13
2. Antecedentes	14
3. Bases legales	16
4. Marco teórico	17
4.1 Características generales de Pseudomonas aeruginosa	17
4.2 Enfermedades o infecciones ocasionadas por Pseudomonas aeruginosa	17
4.2.1 Modo de transmisión	18
4.2.2 Tratamiento y resistencia en P. aeruginosa	18
4.2.3 Alternativas terapéuticas	19
4.3 Patogenicidad y virulencia de Pseudomonas aeruginosa	20
4.3.1 Genes de virulencia y resistencia en Pseudomonas aeruginosa	21
4.4 Función biológica de PhoP y PhoQ en microorganismos	21
4.5 Importancia de los estudios in silico en resistencia bacteriana	24
5. Metodología	25
6. Resultados	29
7. Discusión	47
8. Conclusiones	51
Referencias bibliográficas	51

Lista de figuras

	Página
Fig. 1. Interacción entre el sistema de dos componentes PhoQ y PhoP	22
Fig. 2. Metodología usada para la caracterización de los genes PhoQ-PhoP	26
Fig. 3. Resultados del Blastn para los genes <i>PhoQ-PhoP</i>	30
Fig. 4. Ubicación cromosomal de los genes <i>PhoQ-PhoP</i>	30
Fig. 5. Alineamiento de secuencias nucleotídicas del gen <i>PhoQ</i>	32
Fig. 6. Alineamiento de secuencias del gen <i>PhoP</i>	33
Fig. 7. Marcos abiertos de Lectura (ORFs) encontrados para las secuencias de nt de del gen <i>PhoQ</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepas MDR3 y MDR4	34
Fig. 8. Traducción de secuencias del gen <i>PhoP</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 213BR	34
Fig. 9. Alineamiento proteico de las secuencias con el gen <i>PhoQ</i> y <i>PhoP</i> en Clustal Omega	35
Fig. 10. Mutaciones encontradas en la secuencia nt del gen <i>PhoQ</i> y su traducción	37
Fig. 11. Alineamiento múltiple entre secuencias proteicas de PhoQ y PhoP con ortólogas en otros microorganismos.	38
Fig. 12. Árbol filogenético a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas PhoQ y PhoP con sus ortólogas en otras especies bacterianas	40

Fig. 13. Ubicación celular del sistema de dos componentes PhoQ-PhoP	41
Fig. 14. Uso de Prosite base de datos de dominios, familias y sitios funcionales de proteínas.	42
Fig. 15. Predicción de estructura secundaria en el programa PSIPRED	43
Fig. 16. Predicción de la estructura terciaria de las proteínas para las proteínas PhoQ y PhoP.	45
Fig. 17. Validación estructura terciaria de la proteína PhoQ mediante prosa web	46
Fig. 18. Validación estructura terciaria de la proteína PhoP mediante prosa web	46
Fig. 19. Gráfico de Ramachandran mediante PROCHECK de PhoQ-PhoP.	47

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Cepas elegidas en el programa Blastn para los genes <i>PhoQ-PhoP</i>	31

Lista de abreviaturas

CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CIM	Concentración inhibitoria mínima
EMA	Enzimas modificantes de aminoglucósidos
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FQ	Fibrosis quística
IAAS	Infecciones asociadas a atención en salud
MDR	Multidrogo resistente
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Open reading frame (Marco de lectura abierto)
OTUs	Unidades taxonómicas operativas
PDR	Pan drogo resistentes
RFLPS	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SNP	Polimorfismos de nucleótido único
TTSS	Sistema de secreción tipo III
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XDR	Extremo drogo resistente



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Caracterización *in silico* de los genes de virulencia *PhoP-PhoQ* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fenotipo multidrogo-resistente (MDR)

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que presenta resistencia en los entornos clínicos. Son diferentes los mecanismos por los cuales logra evadir los antimicrobianos, uno de ellos son los sistemas de dos componentes. PhoQ y PhoP son un sistema de dos componentes conocido principalmente en *Salmonella sp.*, es por esto que su caracterización *in silico* en *Pseudomonas aeruginosa* aporta al conocimiento sobre la identificación de nuevos marcadores moleculares asociados a virulencia y resistencia. En el presente proyecto se caracterizaron los genes *PhoQ-PhoP* de dos cepas MDR de *P. aeruginosa* haciendo uso de herramientas bioinformáticas con el objetivo de buscar mutaciones frente a las cepas sensibles a medicamentos, realizar un análisis filogenético con ortólogos y determinar características de las proteínas codificadas por estos genes. Se logró observar una mutación de cambio de sentido en PhoQ con un cambio de tirosina por fenilalanina, un distanciamiento filogenético de *P. aeruginosa* en comparación a ortólogos de estos genes por las diferencias funcionales y ambientales de las distintas especies y se obtuvo modelos tridimensionales de buena calidad lo cual permite realizar la búsqueda de compuestos que tengan afinidad de unión con estas proteínas, paso principal en el diseño racional de nuevos medicamentos. Estos resultados pueden ser usados a futuro para el desarrollo de posibles blancos terapéuticos o para la inhibición selectiva de *P. aeruginosa* en alternativas terapéuticas.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, Sistema de dos componentes, PhoQ, PhoP, MDR, sensibilidad

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a microorganism that has resistance in clinical settings. The mechanisms by which it manages to evade antimicrobials are different, one of them being the two-component systems. PhoQ and PhoP are a two-component system known mainly in *Salmonella* sp., Which is why their *in silico* characterization in *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the knowledge on the identification of new molecular markers associated with virulence and resistance. In this project, the *PhoQ-PhoP* genes of two MDR strains of *P. aeruginosa* were characterized using bioinformatics tools in order to search for mutations against drug-sensitive strains, perform a phylogenetic analysis with orthologs and determine protein characteristics. encoded by these genes. It was possible to observe a missense mutation in PhoQ with a change from phenylalanine to tyrosine, a phylogenetic distancing of *P. aeruginosa* in comparison to orthologs of these genes due to the functional and environmental differences of the different species and three-dimensional models of good quality which allows the search for compounds that have binding affinity with these proteins, a main step in the rational design of new drugs. These results can be used in the future for the development of possible therapeutic targets or for the selective inhibition of *P. aeruginosa* in therapeutic alternatives.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Two Component System, PhoQ, PhoP, MDR, sensitivity

Introducción

Actualmente la resistencia antimicrobiana ha ido en incremento hasta tal punto que la organización mundial de la salud (OMS) llegó a designarla como uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana debido a que está ligada a cientos de miles de muertes al año.¹ Los entornos hospitalarios suelen verse bastante afectados por la presencia de estos microorganismos resistentes debido al aumento de la estancia hospitalaria y aumento de los costos derivados de la atención en salud.⁸

Las infecciones nosocomiales o infecciones asociadas a atención en salud (IAAS) son aquellas infecciones contraídas durante la estadía del paciente en un hospital u otro centro sanitario y que previo a su entrada el paciente no las tenía ni se encontraban en incubación.^{8,9} Se ha estimado que en el mundo más de 1,4 millones de personas contraen infecciones en áreas hospitalarias.¹⁰ En América Latina estudios puntuales demuestran que entre las IAAS, la neumonía asociada a ventilador es la infección más frecuente con una tasa de 24,1 casos/1000 días ventilador, seguida por las infecciones asociadas a catéteres centrales con 12,5 casos/1000 días catéter y las infecciones del tracto urinario asociadas a catéter con 8,9 casos /1000 días catéter urinario.^{10,11}

Pseudomonas aeruginosa es uno de los microorganismos fuertemente asociado a IAAS causando infecciones crónicas en las vías respiratorias especialmente en pacientes con fibrosis quística, con bronquiectasias o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o en pacientes internados en las unidades de cuidados intensivos (UCI).^{3,12,13} En Colombia, aproximadamente 10,5% de las IAAS son causadas por *P. aeruginosa*,¹⁶ este microorganismo es el agente etiológico en 21% de las neumonías, 10% en infecciones del tracto urinario, 8% en infecciones postquirúrgicas y 3% en bacteriemias; en UCI es la

segunda causa de infección nosocomial, causando 30% de neumonías, 19% de infecciones urinarias y 10% de bacteriemias.^{4,17,19}

Por otro lado, la aparición de *P. aeruginosa* con fenotipos resistentes, MDR (multidrogo resistente) o XDR (Extremo drogo resistente) también representa una amenaza para la salud en estos entornos hospitalarios.^{2,14,15} *Pseudomonas aeruginosa* pertenece al grupo de patógenos ESKAPE,^{5,6,7} considerados un problema en salud pública, debido a las altas tasas de resistencia que presentan, las cuales han sido reportadas entre el 15% y 30% en MDR y XDR en algunas zonas geográficas como España y EE.UU, respectivamente.^{18,20} La mayoría de los países de Europa informan tasas de resistencia de más del 10%, por ejemplo, en España, de 51 hospitales monitoreados, se observó que la mayoría de estos aislados sólo eran susceptibles a colistina, el cual es usado como último recurso contra patógenos hospitalarios resistentes a múltiples fármacos, hecho que se asocia con el incremento en las tasas de mortalidad por falta de un buen tratamiento que permita el control del patógeno.²² Se ha observado una asociación directa entre la mortalidad y el fenotipo de la cepa, de tal forma que las probabilidades de morir por causa de una cepa MDR son el doble frente a una cepa no MDR.^{21,23}

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se busca la caracterización *in silico* de los genes de virulencia *PhoP* y *PhoQ* identificados en el genoma de dos cepas colombianas de *P. aeruginosa* fenotipo MDR. Esto permitirá aportar al conocimiento sobre la identificación de nuevos marcadores moleculares asociados a virulencia y resistencia que puedan ser usados como posibles blancos terapéuticos o de la inhibición selectiva de *P. aeruginosa* para el desarrollo de alternativas terapéuticas. En este sentido, el trabajo de grado busca responder a la pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características de los genes de virulencia *PhoP* y *PhoQ* encontrados en dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fenotipo multidrogo resistente (MDR)?

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterizar *in silico* los genes de virulencia *PhoP* y *PhoQ* pertenecientes a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fenotipo multidrogo-resistente (MDR)

1.2 Objetivos específicos

-Identificar mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes *PhoP* y *PhoQ* entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fenotipo multidrogo-resistente (MDR) y fenotipo sensible.

-Analizar filogenéticamente los genes *PhoP* y *PhoQ* de bacterias multidrogo-resistente (MDR).

-Determinar características estructurales de las proteínas codificadas por los genes *PhoP* y *PhoQ* de *P. aeruginosa* multidrogo-resistente (MDR).

2. Antecedentes

La evolución y la plasticidad genética bacteriana ha proporcionado la capacidad de tolerar concentraciones de antibióticos clínicamente relevantes, microorganismos sensibles y expuestos constantemente a estos han conseguido promover la expresión de genes presentes en el genoma o en elementos extracromosomales, favorecer mutaciones puntuales en genes, o el traspaso de nuevos genes de resistencia por transferencia horizontal.¹¹

Pseudomonas aeruginosa representa hoy en día un desafío en salud a nivel mundial, gracias a la facilidad que tiene para desarrollar resistencia frente a los antibióticos de uso convencional, debido a la gran variación genética que se complementa con la adquisición de plásmidos, transposones e integrones a partir de otras bacterias; por esta razón, estudios encaminados al análisis y conocimiento del genoma de *P. aeruginosa* se han hecho indispensables permitiendo la comprensión global de los procesos microbianos, la reconstrucción de las redes metabólicas que permiten establecer y comprender la relación entre genotipo y fisiología molecular y sobre todo permiten la búsqueda e identificación de nuevos marcadores para el desarrollo de nuevas terapias.^{11,23,24,25}

En el estudio y comprensión de los fenotipos resistentes en *Pseudomonas aeruginosa* han sido diversos los abordajes que se han hecho, inicialmente se buscaba la tipificación fenotípica de las cepas, la serotipificación de lipopolisacáridos y la tipificación de fagos, estos eran métodos que se utilizaban pero resultaban ser muy limitantes respecto a la variedad de cepas que se podían estudiar e identificar; posteriormente los métodos de genotipificación como técnicas de huellas dactilares genómicas anónimas tales como el análisis de patrones de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), enfoques de tipificación basados en secuencias mediante tipificación de secuencias multilocus (MLST) o microarrays; así como el secuenciamiento del genoma en cepas resistentes (resistoma) han surgido como herramientas que permiten conocer no solo los genes que conforman el genoma central de *P. aeruginosa* el cual consta de aproximadamente 4000 genes, sino todo el complemento genético (10.000 y 40.000 genes adicionales) que puede llegar a adquirir la bacteria al recombinarse libremente con el genoma de otras especies bacterianas.^{26,27,28,29}

En la literatura y a partir de estudios genómicos han sido descritos varios genes que influyen en la resistencia a antimicrobianos en *P. aeruginosa*, además de ser excelentes marcadores genéticos en resistencia, uno de ellos es el gen *oprD* que codifica para una porina involucrada en la captación pasiva de aminoácidos básicos y carbapenémicos a través de la membrana externa, en fenotipos resistentes se ha observado que las mutaciones causadas por inserciones o deleciones de nucleótidos conducen a la inactivación de la proteína OprD con una pérdida significativa de porinas en la membrana externa, lo que genera aumento en la concentración inhibitoria mínima (CIM) para carbapenémicos, así como una mayor resistencia a la muerte a pH ácido.^{30,31} En un estudio observacional prospectivo realizado por Yoon E.³² se ha observado que la tasa de mortalidad causada por *P. aeruginosa* con mutaciones en OprD es más alta que la causada por *P. aeruginosa* con OprD en perfecto estado en infecciones del torrente sanguíneo, además se confirma que OprD es esencial en el proceso de resistencia a imipenem.³³

Por otro lado, el gen *oprD* ha sido catalogado como un buen marcador genético debido a la alta variabilidad de secuencia que presenta, lo que permite el análisis clonal ya que se muestra que los miembros de linajes clonales estrechos suelen mostrar secuencia de *oprD* idénticas.³⁰ Igualmente, el grupo de Khatua B. han descrito que la porina OprD es una glicoproteína altamente sialilada que tiene ácidos siálico con enlaces $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$, lo que contribuye a resistencia y adaptación de las cepas de *P. aeruginosa* con presencia de ácido siálico.³⁴

Otros genes reportados son *ampC* y *ampR* que codifican para las proteínas AmpC y AmpR, inicialmente fueron estudiados en especies Gram negativas como *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae*, pero se ha observado que en *P. aeruginosa* las mutaciones en esta región pueden aumentar la producción de AmpC. Cuando se produce en exceso AmpC como resultado de mutaciones en el proceso de reciclaje de peptidoglicanos *P. aeruginosa* se convierte en una causa principal de resistencia a las penicilinas antipseudomonas (ticarcilina y piperaciclina), monobactamas (aztronam) y cefalosporinas de tercera (ceftazimida) y cuarta generación (cefepime). La regulación de la resistencia a β -lactámicos por *P. aeruginosa* AmpR parece involucrar más de una vía, y además de regular positivamente la resistencia a los β -lactámicos, AmpR también regula la resistencia a las quinolonas encontrándose entre los pocos reguladores transcripcionales en *P. aeruginosa* que modula la resistencia a diferentes clases de antibióticos.³³⁻³⁵

La bomba de eflujo MexXYOprM de tres proteínas expulsa los antibióticos aminoglucósidos, cefalosporinas (cefepima, cefpiroma y ceftobiprol), fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina y macrólidos de las células bacterianas, según los estudios el operón *mexXY* es inducible por muchos de los antimicrobianos que exporta, aunque su aumento se debe más a la alteración de los ribosomas que a los aminoglucósidos en sí. Los genes *mexZ* y *amrZ* son los encargados de regular y aumentar la expresión del operón *mexXY*. Otro sistema de eflujo que funciona en la resistencia intrínseca y adquirida de *P. aeruginosa* es MexA-MexB-OprM, este sistema de salida extruye quinolonas, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina y la mayoría de los β -lactámicos, pero no imipenem.³⁶⁻³⁹

Otro mecanismo de resistencia en *P. aeruginosa* es contra las fluoroquinolonas, las cuales buscan inhibir la replicación de DNA, aparecen genes que codifican la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y/o topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) los cuales conducen a una baja afinidad con las quinolonas cuando aparecen mutaciones en ellos. En un estudio realizado por Nouri R. al desarrollar aislamientos de *P. aeruginosa* con la mutación *parC* observaron que tenían una o dos mutaciones en *gyrA* lo cual confirmó que la ADN girasa era el objetivo principal de la resistencia a las fluoroquinolonas en los aislados clínicos de *P. aeruginosa* y de paso sugieren que el número de mutaciones en estos genes pueden estar correlacionados con la resistencia a estos antibióticos.⁴⁰⁻⁴²

3. Bases legales

Este es un trabajo enfocado en herramientas bioinformáticas, así que no se hace uso de intervenciones biológicas o sociales que requiere de normativa de aplicación. Se expone la resolución número 8430 de 1993 para aludir a las investigaciones realizadas *in silico* y que no tienen riesgo alguno en la salud humana

RESOLUCIÓN NÚMERO 8430 DE 1993: Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

Según el artículo 11 una investigación sin riesgo son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas,

sicológicas o sociales, tampoco ninguna manipulación de microorganismos. Además, se recomienda siempre que sean apropiados, deben usarse métodos tales como modelos matemáticos, simulación en computador y sistemas biológicos in vitro. Los modelos computacionales o bioinformáticos proporcionan una investigación sin riesgo, así que este trabajo se clasifica como una investigación sin riesgo.⁴³

4. Marco teórico

4.1 Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia *γ-proteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Pseudomonadaceae*. Es un patógeno oportunista tiene forma de bastón o puede ser ligeramente curvo, aproximadamente de 0,5-1 μm de diámetro y de 1,5-5 μm de largo, es motil gracias a su flagelo polar, es anaerobio facultativo ya que es capaz de crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones, no es fermentador de lactosa, no tiene esporas, es catalasa y oxidasa positivo.⁴⁴⁻⁴⁷

Se considera un saprófito con capacidad de vivir durante meses en distintos hábitats y a diferentes temperaturas, es capaz de crecer entre 4° y 43°C en ambientes acuáticos o terrestres, en tejidos de animales o plantas incluyendo frutas y vegetales, este género bacteriano es capaz de sobrevivir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos.^{46,47}

P. aeruginosa es un patógeno productor de biopelículas, su rápida adaptabilidad a las nuevas condiciones ambientales también se ve facilitada por el gran número de genes que participan en los procesos reguladores. En el entorno médico los reservorios incluyen aerosoles, agua potable, grifos, desagües de lavabos y duchas, equipos respiratorios, humidificadores, endoscopios, baños de agua y piscinas de hidroterapia.⁴⁸

4.2 Enfermedades o infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno reconocido por la variedad de infecciones que ocasiona, se pueden clasificar según su tipo, en agudas o crónicas. Este microorganismo se

asocia en gran medida con infecciones gastrointestinales, meningitis, infecciones del oído, queratitis microbiana ya que tiene la capacidad de adherirse, difundir y formar biopelículas, no solo en dispositivos médicos sino en lentes de contacto. Las infecciones oculares por *P. aeruginosa* conllevan a una pérdida de la visión rápidamente, la queratitis es la forma más frecuente y la endoftalmitis junto a oftalmia neonatal las más severas.⁴⁹⁻⁵¹

Esta bacteria ha sido fuertemente vinculada a infecciones adquiridas en el hospital (IAAS), principalmente a neumonía asociada al ventilador, siendo ésta la segunda infección nosocomial más común en la unidad de cuidados intensivos y la más común en pacientes ventilados mecánicamente; así mismo, la bacteria ha estado ligada a infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la vía central, las infecciones urinarias relacionadas con el catéter urinario y las infecciones quirúrgicas de trasplante, cabe destacar que las infecciones por *P. aeruginosa* pueden adquirirse también en entornos comunitarios como jacuzzis o piscinas.
49-53

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que puede llegar a ocasionar infecciones mortales en individuos inmunosuprimidos, como pacientes con cáncer, pacientes en postoperatorio, pacientes con quemaduras graves o infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y pacientes con enfermedad pulmonar subyacente como bronquiectasias y fibrosis quística (FQ). *P. aeruginosa* es el patógeno predominante que infecta a los pacientes adultos con FQ; aproximadamente las tres cuartas partes de las personas con esta enfermedad están infectadas con este microorganismo.^{54,55}

4.2.1 Modo de transmisión

La transmisión en *Pseudomonas aeruginosa* ocurre principalmente a través del contacto directo con piel lesionada y mucosas. En el ámbito hospitalario son distintas las vías de transmisión, una de las más frecuentes es por medio de las manos del personal sanitario, los equipos hospitalarios mal desinfectados, además del agua que se considera un factor de amplificación y transmisión de este microorganismo, pueden servir como reservorios naturales de *P. aeruginosa* y puede persistir durante meses en superficies secas inanimadas.⁵⁰⁻⁵⁶

Tanto en el ambiente hospitalario como externo, *P. aeruginosa* puede encontrarse

comúnmente en superficies húmedas. Puede ser causa de infección en la mayoría de las partes del cuerpo donde sea expuesta. Se ha documentado también que *P. aeruginosa* sobrevive dentro de núcleos de gotitas y puede permanecer en aerosoles durante largos períodos de tiempo.⁵⁷

4.2.2 Tratamiento y resistencia en *P. aeruginosa*

Por la actual resistencia de este microorganismo el momento del tratamiento es crucial. Cuando se está frente a una infección de *P. aeruginosa* es importante tener en cuenta la concentración mínima inhibitoria (CMI) que tenga esta cepa contra los antimicrobianos, además de esto hay que tener en cuenta la carga microbiana en el foco de infección ya que la presencia de una carga bacteriana elevada es el mayor riesgo de selección de mutantes resistentes.^{52,58}

Los antibióticos más usados como tratamiento de *P. aeruginosa* suelen ser penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, aminoglucósidos, monobactámicos, carbapenémicos y fluoroquinolonas.⁸ A partir de la década de los 80 se empezó a utilizar terapia combinada intravenosa de piperacilina o ceftazidima con un aminoglucósido. Otros tratamientos alternativos son la reactivación de colistina y polimixina B que habían sido discontinuados, el desarrollo de moléculas que superan la resistencia a los antibióticos β -lactámicos (combinaciones de inhibidores de cefalosporina- β -lactamasa: ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam), cefalosporina sideróforo cefiderocol y antimicrobianos no β -lactámicos.^{13,21,59} Los antibióticos inhalados (tobramicina, colistina o aztreonam) se reservan para casos de neumonía grave o neumonía causada por cepas MDR de *P. aeruginosa*.⁵⁸

El uso indiscriminado de antibióticos y las características fenotípicas y genotípicas de *P. aeruginosa* han ocasionado el aumento progresivo de las tasas de resistencia provocando la aparición de cepas con fenotipos multirresistentes (MDR), fenotipos de resistencia extendida o extremadamente resistentes (XDR) y cepas pan resistentes a fármacos (PDR).⁴⁹ *P. aeruginosa* tiene una amplia gama de mecanismos de resistencia intrínsecos y adaptativos frente a los antimicrobianos de uso actual; a nivel intrínseco los mecanismos más estudiados están relacionados con la expresión de la β -lactamasa AmpC cromosómica inducible y la producción de bombas de salida constitutivas (MexAB-OprM) o inducibles (MexXY).⁵⁸

Por otro lado, la expresión inducible de MexXY tiene un papel importante en la resistencia adaptativa (inducible) a los aminoglucósidos y la expresión inducible del operón *arnBCADTEF*, es fundamental para el desarrollo de resistencia adaptativa a las polimixinas; de igual forma, ha sido reportado resistencia a ciertos antimicrobianos policatiónicos tales como aminoglucósidos, polimixinas y péptidos antimicrobianos catiónicos debido a mutaciones en proteínas reguladoras afines como son los sistemas de dos componentes PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB, CprR-CprS y ParR-ParS.⁴⁹

4.2.3 Alternativas terapéuticas

Se han estudiado alternativas de tratamiento distintas a los antibióticos como bacteriófagos, péptidos antimicrobianos con diversas estructuras y mecanismos de acción, inhibidores de virulencia, sideróforos, compuestos de origen natural (como aceites esenciales) y otros adyuvantes (p. ej., inhibidores de la bomba de eflujo, anticuerpos monoclonales).⁵⁶

Los bacteriófagos han estado en investigación constante para probar su funcionalidad frente a cepas de *P. aeruginosa*, el fago BrSP1 podría incluirse en un cóctel de fagos para tratar infecciones veterinarias,⁶¹ en estudios con roedores y cerdos se demostró que los bacteriofagos disminuyeron significativamente el recuento de colonias bacterianas y mejoró la curación de las heridas cutáneas de los diabéticos. En un modelo de ratón con queratitis provocada por *P. aeruginosa*, se demostró que la administración de cocteles que contienen bacteriófagos erradicó eficazmente las bacterias y permitió preservar la integridad estructural y la transparencia de la córnea, incluido el epitelio corneal.⁶¹ Los péptidos antimicrobianos son opciones terapéuticas prometedoras para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, ya que permiten reducir el impacto negativo de los factores de virulencia en las células huésped y favorecen la reparación del epitelio cutáneo.⁶²

Otra terapia alternativa es la terapia fotodinámica que requiere el uso de fotosensibilizadores, inyectados por vías intravenosas o aplicados en un sitio infectado, y posteriormente incorporados por bacterias. Esta se considera que podría ser un enfoque interesante para favorecer la reparación epitelial en pacientes con *P. aeruginosa* MDR en heridas cutáneas infectadas. Curiosamente, esta estrategia también se ha considerado en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística.⁶³ Es importante seguir

investigando estas terapias alternativas para mitigar el impacto de la resistencia a los antibióticos por parte de este y otros microorganismos.

4.3 Patogenicidad y virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Es importante recalcar que la patogenia de *Pseudomonas aeruginosa* se debe a la producción de diversos factores de virulencia que permiten un enfrentamiento efectivo con el sistema inmunológico del huésped y su colonización.⁶⁴ Adicionalmente, la virulencia propia y adquirida del microorganismo es otro aspecto importante que considerar, varias cepas de *P. aeruginosa* están fuertemente relacionadas con la capacidad de formación de biopelículas, diferentes tipos de motilidad celular / colonial y producción de toxinas.⁶⁵

El sistema de secreción tipo III (TTSS) no solo está presente en *P. aeruginosa*, se encuentra en otros patógenos como *Shigella*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Yersinia* y *Escherichia*, permite la inyección de toxinas en el citosol de los eucariocitos y secreta citotoxinas como: ExoS, ExoT, ExoU y ExoY que aumentan la supervivencia bacteriana, subvierten activamente las respuestas inmunitarias y promueven el desarrollo de una infección con mayor propagación de bacterias a los tejidos subyacentes y al sistema circulatorio.^{66,67} De estas citotoxinas, la más destacada es la lipasa ExoU ya que en diversos estudios se han realizado aislados genéticos y se ha comprobado que cuando hacía falta el gen *exoU* estas cepas eran menos citotóxicas.⁶⁷

Existen otros factores de virulencia importantes en este microorganismo los cuales son: la exotoxina A (*exoA*) que juega un papel importante en la lisis tisular y la invasión bacteriana, la exoenzima S (*exoS*) que es responsable del daño a muchos tipos de células huésped, elastasa B (*lasB*) que resalta en la infección aguda, la hemolisina fosfolipasa H (*plcH*) actúa para destruir los lípidos que contribuyen a la invasión tisular y algunas cepas producen alginato que forma la matriz de la biopelícula que protege a las bacterias de las defensas del huésped durante la infección crónica.^{64,65}

4.3.1 Genes de virulencia y resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

Se plantea que la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* comprometen rápidamente la vida de los pacientes infectados, sobre todo en pacientes con afectación pulmonar, además de presentar posibles correlaciones con la resistencia de este microorganismo, se ha

observado que hay correlación entre la secreción de toxinas y las cepas productoras de betalactamasas y que la producción de pigmentos como piocianina, fluoresceína y piorrubina se asocia más significativamente a la resistencia frente a antimicrobianos que la producción de factores de virulencia como lo son las elastasas y proteasas. En adición se informó una incidencia elevada de ExoS en aislamientos de resistencia a los medicamentos en diferentes estudios.⁶⁸

La resistencia a los β -lactámicos se debe a la acción de unas enzimas llamadas β -lactamasas las cuales son capaces de destruir el enlace amida del anillo β -lactámico, provocando que el antimicrobiano sea ineficaz. La resistencia a aminoglucósidos está mediada por enzimas modificadoras de aminoglucósidos transferibles (EMA), baja permeabilidad de la membrana externa, salida activa y, rara vez, modificación de la diana.^{14, 52, 69}

Por último, también se ha estudiado que los sistemas de dos componentes desempeñan un papel importante en el control de la virulencia de *P. aeruginosa*, con más del 50% implicados en la formación de biopelículas y la resistencia a los antibióticos.⁷⁰

4.4 Función biológica de PhoP y PhoQ en microorganismos

Es grande la variedad de genes que brindan virulencia a las bacterias, existe el sistema regulador pleiotrópico de dos componentes *PhoP* - *PhoQ* el cual media la adaptación del microorganismo a entornos limitantes de Mg^{+2} , niveles bajos de pH y péptidos antibacterianos (Figura 1). Este sistema es codificado por el locus *phoP*, el cual fue identificado por primera vez a finales de la década de los 80 en *Salmonella entérica* serovar *Typhimurum* y desde entonces ha sido bien caracterizado en esta bacteria y en otras Gram negativas.⁷¹ La proteína PhoQ de *Salmonella* presenta dos regiones transmembrana que definen una larga cola citoplásmica C-terminal que alberga el residuo de histidina que es el sitio de autofosforilación y un dominio periplásmico que alberga varios residuos ácidos que podrían estar involucrados en la detección de cationes divalentes. Estudios actuales han mostrado que la activación de *PhoP-PhoQ* ayuda a las bacterias a adaptarse a ambientes externos, además de aumentar su capacidad de sobrevivir dentro de macrófagos, resistencia contra antimicrobianos en mamíferos y resistencia contra ácidos.⁷²

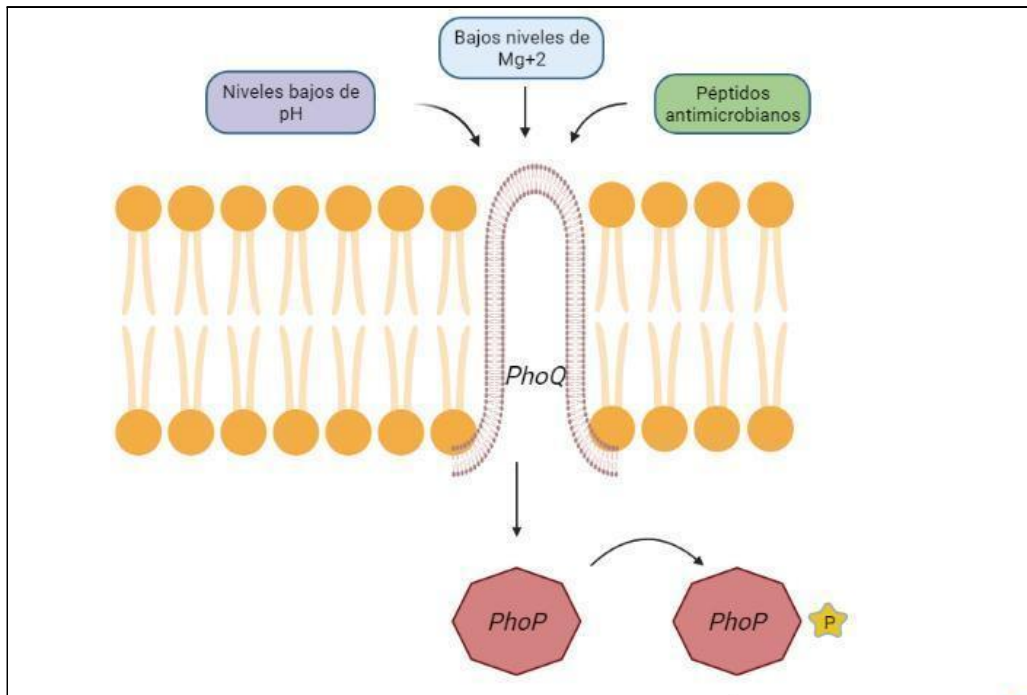


Figura 1. Interacción entre el sistema de dos componentes *PhoQ* y *PhoP*. Creada en BioRender. Fuente: Autora

La presencia del sistema *PhoP-PhoQ* suele ser diferente en varios grupos bacterianos, lo que sugiere que *PhoP* puede controlar la expresión de diferentes genes en las especies. Como se mencionó anteriormente, este sistema ha sido descrito más que todo en *Salmonella sp.*, pero también podemos encontrarlo en otros microorganismos como: *Yersinia pestis*, *Erwinia amylovora*, *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Edwardsiella tarda*, entre otros.^{71,73}

En *Salmonella sp.* este sistema controla la expresión de fenotipos cruciales que definen la capacidad del patógeno para establecer la infección en el huésped. En entornos ricos en bilis, como el intestino delgado y la vesícula biliar, este microorganismo debe buscar la forma de sobrevivir así que se ha estudiado que *Salmonella sp.* puede sentir y responder a la bilis a través del sistema de dos componentes *PhoP-PhoQ* durante la formación de la biopelícula; sin embargo, el sistema de dos componentes no es enteramente responsable de la estimulación de la bilis. La respuesta directa de *PhoQ* a la acidificación está mediada por un cambio conformacional del dominio periplásmico, este cambio conformacional sutil se transmite a través de la membrana al dominio quinasa, dando como resultado la transducción de señales, por lo tanto, se sugiere que la proteína *PhoP* es un objetivo potencial para desarrollar nuevas terapias antibacterianas y preventivas para las infecciones

crónicas por *Salmonella*.⁷⁴⁻⁷⁷

En *Yersinia pestis* la proteína PhoP y la proteína receptora de AMP cíclica son reguladores globales y controlan dos regulones distintos que contienen múltiples genes relacionados con la virulencia. *PhoP* no solo regula la expresión de genes específicos, incluidos los relacionados con virulencia, sino que también controla varios objetivos indirectos al actuar sobre un conjunto de reguladores. Por tanto, las vías celulares gobernadas por *PhoP* y *CRP* han evolucionado para fusionarse en un único circuito regulador global debido a la acción reguladora directa de *PhoP* sobre sus genes diana *rovA*, *crp* y *cyaA*.⁷⁸

En *Y. pestis*, el sistema de dos componentes *PhoP-PhoQ* puede activarse en el intestino de las pulgas y al tiempo mejorar la formación de biopelículas. Sin embargo, *PhoP-PhoQ* regula la producción de biopelículas de *Y. pestis* mediante el control de la transcripción del operón *waaAE-coaD*. Se han hecho estudios de estos genes dentro de *Galleria mellonella* y se concluye que se requiere *PhoP* para la virulencia total y que los mutantes *phoP* no sobreviven tan bien en este huésped.^{79,80} Dado que los contenidos genéticos (incluidas las regiones codificadora y promotora) de *phoP* y *phoQ* son igual a su progenitor estrechamente relacionado, *Yersinia pseudotuberculosis*, el circuito regulador que se caracteriza se conservará en estas dos especies bacterianas. Se conoce que los mutantes *phoPQ* de ambas especies de *Yersinia* demuestran un defecto de supervivencia/crecimiento en macrófagos.⁸¹

Shigella flexneri es un patógeno Gram negativo que causa enfermedad en el ser humano, el sistema *PhoPQ* no ha sido bien estudiado a fondo en este microorganismo, pero se sugiere que este sistema modula la virulencia de *S. flexneri* (de una manera dependiente de *icsA*) y las respuestas al estrés de Mg²⁺, pH y péptidos antibacterianos. La desactivación de *PhoPQ* provoca una disminución de la virulencia de *S. flexneri* en las células HeLa y los modelos de invasión de células Caco-2.⁸²

Existen ortólogos del sistema *PhoPQ* tanto en patógenos de mamíferos como de plantas, *Erwinia amylovora* es una bacteria patógena de plantas en donde este sistema también se manifiesta, según diversos estudios indican que el sistema *PhoPQ* conservado en *E. amylovora* hace que el patógeno sea más susceptible a condiciones de ácido fuerte y suprime la expresión de dos genes nuevos de T3SS, lo que sugiere que este sistema podría

actuar como un regulador negativo para aquellos genes involucrados en la resistencia a los ácidos y T3SS. En *Salmonella*, *Dickeya*, *Xanthomonas* y otras bacterias ocurre lo contrario, así que esto sugiere que este sistema puede haber mantenido funciones como la resistencia a los péptidos antimicrobianos y por otro lado también puede haber desarrollado nuevas funcionalidades para adaptarse a diferentes patógenos bacterianos.⁸³

En conclusión, este sistema *PhoP-PhoQ* ha sido estudiado en diferentes microorganismos, en especial Gram negativos, teniendo profundización en *Salmonella sp*, la caracterización en *Pseudomonas aeruginosa* contribuiría a todos estos estudios y ayudaría en el avance del conocimiento de este sistema y sus posibles usos terapéuticos en un futuro.

4.5 Importancia de los estudios *in silico* en resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos cada día cobra más fuerza, los costos médicos aumentan, el tiempo de hospitalización de los pacientes se prolonga y se aumenta la tasa de mortalidad. Hay que tener en cuenta que los genes de resistencia provienen de la naturaleza, incluso antes de los antibióticos ya existían, ya que los microorganismos a través de los años han luchado por su sobrevivencia. Pero es cierto, que lo que se veía como una solución eterna, al ser descubierta la penicilina por Fleming ahora es un problema de salud pública que preocupa a la población, ya que por el mal uso de estos y por la resistencia de los microorganismos, un creciente número de infecciones, como neumonía, tuberculosis, septicemia, gonorrea, son cada vez más difíciles y, a veces, imposibles de tratar, a medida que los antimicrobianos van perdiendo eficacia.⁸⁴

Los estudios *in silico* contribuyen a profundizar en el conocimiento a nivel molecular y a nivel de propiedades de los fármacos, aportando nueva información para identificar nuevas moléculas o vías metabólicas donde sea posible que el antibiótico pueda actuar. Existen unas 200 proteínas esenciales y conservadas en las bacterias, pero el número de dianas reconocidas por los antibióticos disponibles es muy bajo. Por ejemplo, comparando el genoma de *Streptococcus pneumoniae* con una bacteria relacionada, pero de vida libre como *S. thermophilus*, se han identificado dos genes patógenos (expresados por la primera, pero no por la segunda), candidatos para el diseño de fármacos que los inactivan.^{85,86}

Mediante la aplicación de la bioinformática se está al borde de importantes avances

tecnológicos en la interfaz entre la bacteriología y la práctica clínica. Respecto a *Pseudomonas aeruginosa* que es un patógeno implicado comúnmente en el entorno clínico se han logrado identificar variaciones adaptativas asociadas con la resistencia antimicrobiana de las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y los β -lactámicos además de posibles nuevos biomarcadores.⁸⁷ Diferentes moléculas como compuestos de hierbas, metabolitos secundarios, nanomateriales y fármacos diseñado *in silico* se utilizan para encontrar una alternativa adecuada a los antibióticos actuales utilizados contra el patógeno.⁸⁹ El desafío de este enfoque será llevar los datos genómicos utilizando bioinformática de vanguardia y la experiencia de investigadores líderes en todo el mundo y desarrollar metodologías de orientación clínica que sean fáciles de usar, basadas en evidencia y que conduzcan a un impacto clínico directo.^{87,88}

5. Metodología

Tipo de investigación

La investigación es básica, exploratoria y descriptiva empleando un análisis *in silico*.

Enfoque, nivel o alcance de la investigación

La investigación tuvo un enfoque mixto con un alcance exploratorio, descriptivo y correlacional. Todos los análisis se hicieron por medio de biología computacional.

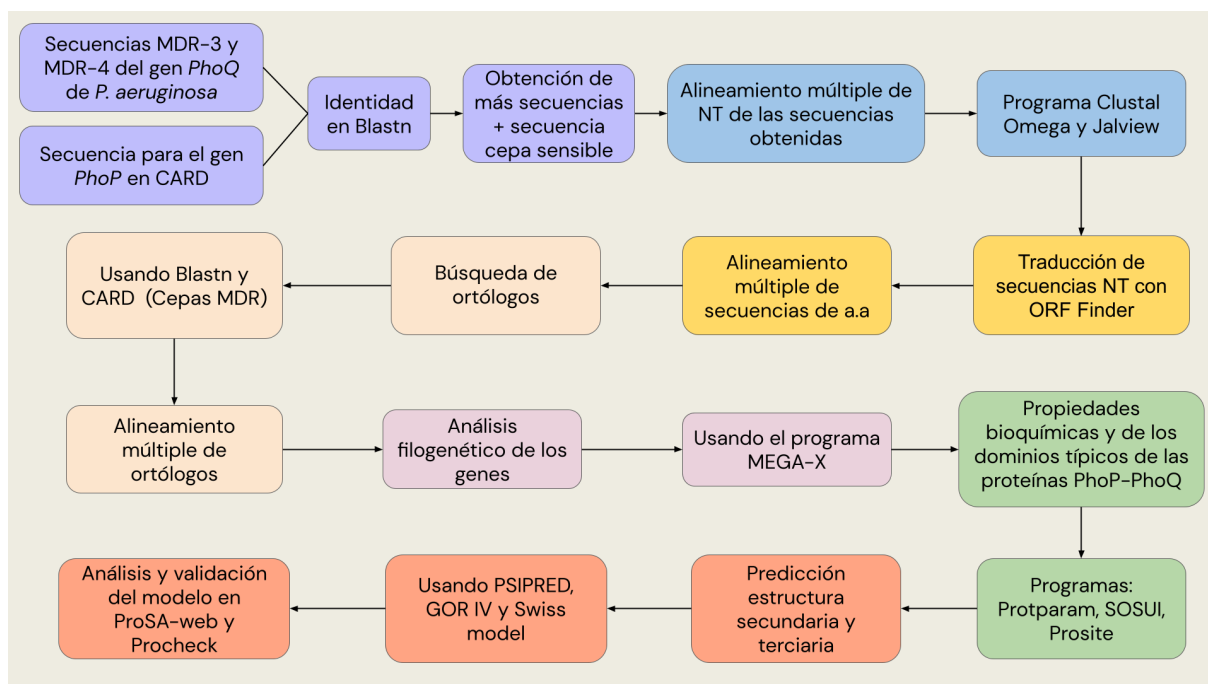


Figura 2. Metodología usada para la caracterización *in silico* de los genes *PhoQ-PhoP*

5.1 Determinación de la identidad de los genes *Phop-PhoQ* con secuencias nucleotídicas de *Pseudomonas aeruginosa*

Para la realización de este proyecto se obtuvieron dos cepas colombianas de *P. aeruginosa* fenotipo MDR provenientes de dos muestras distintas las cuales cada una fue secuenciada varias veces logrando un ensamblaje de las corridas realizadas, dando como resultado la cepa denominada MDR-3 y la cepa denominada MDR-4. En el análisis genómico solo fue posible encontrar las secuencias para el gen *PhoQ* y es por esto que se decidió complementar con una búsqueda en la base de datos CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) y así obtener la secuencia para el gen *PhoP* a partir de una cepa MDR denominada 213BR. (Figura 2)

Se procedió a determinar la identidad de estas tres secuencias iniciales utilizando la herramienta Blastn del NCBI (Centro Nacional de Biotecnología de la Información, USA) el cual es un programa informático de alineamiento y comparación de secuencias, en el cual se inserta la secuencia problema y ésta es comparada contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren reportadas en las diferentes bases de datos de nucleótidos a nivel mundial determinando el porcentaje de identidad entre las secuencias comparadas permitiendo establecer similitud entre las secuencias analizadas.⁹⁰ Se procedió a elegir tres

secuencias por cada secuencia inicial de los resultados obtenidos en el Blastn, teniendo en cuenta principalmente el porcentaje de identidad, el valor-E y la cobertura total, además de que las secuencias no provinieran del mismo trabajo. De igual forma, las secuencias nucleotídicas fueron usadas para la búsqueda de marcos abiertos de lectura usando el programa ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) del NCBI y de esta forma, poder obtener las secuencias aminoacídicas codificadas por estos genes *Phop-PhoQ*.

5.2 Búsqueda de ortólogos desde NCBI

Se utilizaron bases de datos como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y CARD (<https://card.mcmaster.ca/>), las cuales almacenan y constantemente actualizan la información referente a secuencias genómicas, para buscar secuencias ortólogas de *Phop* y *PhoQ* en otros microorganismos. En la base de datos NCBI se buscaron trabajos en los cuales se utilizaron secuencias de estos genes y en donde se mencionaba que eran cepas multidrogo-resistentes. En la base de datos CARD por medio del buscador se realizó la búsqueda de secuencias pertenecientes a estos dos genes, ya que está es una base de datos con fenotipos de resistencia. Después de indagar en las dos bases de datos se logró encontrar las secuencias para *PhoQ* y *PhoP* en microorganismos como: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*.

5.3 Alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas codificadas por los genes *Phop-PhoQ* de *P. aeruginosa* y los ortólogos identificados

El alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en el Blastn y las secuencias traducidas a proteínas a partir del ORF finder, para los dos genes se realizó usando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) el cual toma las secuencias y las alinea, encontrando regiones conservadas y no conservadas entre ellas. Luego los resultados se observaron en el programa Jalview (<https://www.jalview.org/>) el cual es un software que se utiliza para ver y editar alineamientos de secuencias múltiples.

5.4 Análisis filogenético de los genes *Phop* y *PhoQ*

Los análisis filogenéticos se realizaron usando el programa MEGA-X

(<https://www.megasoftware.net/>), el cual es un software informático para realizar análisis estadísticos de la evolución molecular y para construir árboles filogenéticos.⁹¹ Un árbol filogenético es un esquema que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común, aquí se puede ver cómo se agrupan algunos microorganismos que tienen más similitud en su secuencia y probablemente compartan líneas filogenéticas.⁹² En este trabajo se utilizó el método neighbor joining, el principio de este método es encontrar pares de unidades taxonómicas operativas (OTUs) que minimicen la longitud total de la rama en cada etapa de agrupación de OTU comenzando con un árbol en forma de estrella.⁹³ Luego de esto utiliza una ecuación determinada para analizar las distancias reales entre las secuencias y agruparlas por similitud, siendo así una versión simplificada del método de evolución mínima.⁹⁴

5.5 Predicción de las propiedades bioquímicas y de los dominios típicos de las proteínas PhoP-PhoQ *in silico*

Las propiedades bioquímicas como peso isoelectrico, peso molecular, longitud de la proteína, etc, fueron predichas usando las herramientas bioinformáticas disponibles en la plataforma Swissprot (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>). Se hizo uso del programa Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) el cual es una herramienta que permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos para una proteína determinada,⁹⁵ el programa SOSUI (<https://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/mobile/>) fue utilizado para predecir si las proteínas en cuestión son proteínas solubles o transmembrana.

Los dominios y motivos típicos de estas proteínas fueron predichos usando el programa SCANProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) el cual consta de entradas de documentación que describen dominios de proteínas, familias y sitios funcionales, así como patrones y perfiles asociados para identificarlos.⁹⁶

5.6. Predicción de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas codificadas por los genes *PhoP* y *PhoQ*

La función de una proteína está estrechamente vinculada a su estructura, es decir, cómo se tuerce y pliega la cadena de aminoácidos en tres dimensiones. La estructura determina la posición espacial de los aminoácidos individuales, algunos de los cuales están involucrados

en la actividad bioquímica de la proteína, es por eso que en este trabajo se hizo predicción de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas Phop y PhoQ mediante el uso de las herramientas tales como: GOR IV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) para obtener un análisis y una predicción estructural de las proteínas codificadas por los genes PhoP y PhoQ de *P. aeruginosa* fenotipo MDR. SWISS MODEL es una herramienta útil para la predicción de la estructura terciaria.⁹⁷ PSIPRED y GOR IV son programas especializados en la predicción de las estructuras secundarias de las proteínas dadas en cuestión por el usuario.^{98,99}

Luego con la estructura de las proteínas se realizó un análisis y validación del modelo 3D predicho mediante ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) y Procheck (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) que se emplea con frecuencia para la validación de la estructura de proteínas.¹⁰⁰

Todos los programas utilizados en este proyecto son accesibles por medio de internet.

6. Resultados

6.1 Determinación de la identidad de los genes *Phop-PhoQ* con secuencias nucleotídicas de *Pseudomonas aeruginosa*

Con el objetivo de corroborar la identidad de las secuencias obtenidas de la secuenciación del genoma de dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR-3 y MDR-4 para el gen *PhoQ* se realizó un Blastn, ya que éstas provenían de dos muestras previas a la realización de este proyecto. El programa arrojó un 100% de identidad, con secuencias del gen *PhoQ* reportadas en las bases de datos para otras cepas y clones de *P. aeruginosa*, adicional, el valor-E de 0.0 otorga confianza ya que no son secuencias elegidas al azar y un 100% de cobertura del alineamiento, que para este caso fue total. A partir de estos resultados se seleccionaron las secuencias de los genes *PhoQ* de otras cepas identificadas en el Blastn como PB367, GIMC5002, CCUG, 243931, AR_0357 y P5 para hacer una comparación global de estas secuencias con las de MDR secuenciadas. (Figura 3A-Figura 3B)

Posteriormente se utilizó la secuencia del gen *PhoP* de una cepa resistente de *Pseudomonas aeruginosa* 213BR encontrada en la base de datos CARD, se eligió esta debido a su fenotipo de resistencia y a que fueron escasas las secuencias encontradas para este gen. Se le realizó un Blastn donde se obtuvieron resultados de otras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con 100% de identidad, valor-E de 0.0 y un 100% de cobertura total. Las cepas seleccionadas para el gen *PhoP* fueron PA0750, DVT412 y PAAK095. (Figura 3C)

(A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain PB367 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2488	2488	100%	0.0	100.00%	6752906	CP025056.3
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain PB350 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2488	2488	100%	0.0	100.00%	6752906	CP025056.2
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain GIMC5002.PAT-169 chromosome	Pseudomonas a...	2488	2488	100%	0.0	100.00%	6449272	CP043549.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain GIMC5001.PAT-23 chromosome	Pseudomonas a...	2488	2488	100%	0.0	100.00%	6427888	CP043483.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain CCUG 51971 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2488	2488	100%	0.0	100.00%	7012798	CP043328.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain 243931 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2488	2488	100%	0.0	100.00%	6514208	CP041772.1

(B)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain 243931 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2483	2483	100%	0.0	100.00%	6514208	CP041772.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain FDAARGOS_571 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2483	2483	100%	0.0	100.00%	6999770	CP033833.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain FDAARGOS_501 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2483	2483	100%	0.0	100.00%	6865838	CP033843.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain AR_0357 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2483	2483	100%	0.0	100.00%	7162784	CP027166.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain AR_0354 chromosome complete genome	Pseudomonas a...	2483	2483	100%	0.0	100.00%	6747010	CP027171.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain P5 two-component regulatory system sensor PhoQ (phoQ) gene complete c...	Pseudomonas a...	2483	2483	100%	0.0	100.00%	1347	KT716120.1

(C)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain PA0750 chromosome complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1253	1253	100%	0.0	100.00%	6241875	CP034908.2
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain DVT410 chromosome complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1253	1253	100%	0.0	100.00%	6229931	CP050334.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain DVT412 chromosome complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1253	1253	100%	0.0	100.00%	6394923	CP050333.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain PAAK095 chromosome complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1253	1253	100%	0.0	100.00%	6780782	CP054473.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa strain PAAK088 chromosome complete genome	Pseudomonas aeruginosa	1253	1253	100%	0.0	100.00%	6390212	CP054472.1

Figura 3. Resultados del Blastn para genes *PhoQ-PhoP*. (A) Resultado del Blastn para la secuencia de *P. aeruginosa* cepa MDR-3 gen *PhoQ* (B) Resultado del Blastn para la secuencia de *P. aeruginosa* cepa MDR-4 gen *PhoQ* (C) Resultado del Blastn para la secuencia de *P. aeruginosa* cepa 213BR gen *PhoP*. En rojo se observa las secuencias seleccionadas.

En la base de datos de *Pseudomonas* (<https://pseudomonas.com/>) se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes *PhoQ* y *PhoP* en una cepa sensible de *Pseudomonas aeruginosa*, se eligió la cepa de referencia sensible a medicamentos PAO1 para poder realizar la comparación con las cepas MDR, es denominada PA1180 para el gen *PhoQ* y PA1179 para el gen *PhoP*. Estos genes son de copia única y en el cromosoma completo de

Pseudomonas aeruginosa PAO1 se encuentran ubicados para *PhoQ* en las coordenadas 1278362 a 1279808 y para *PhoP* en las coordenadas 1277688 a 1278365. (Figura 4)

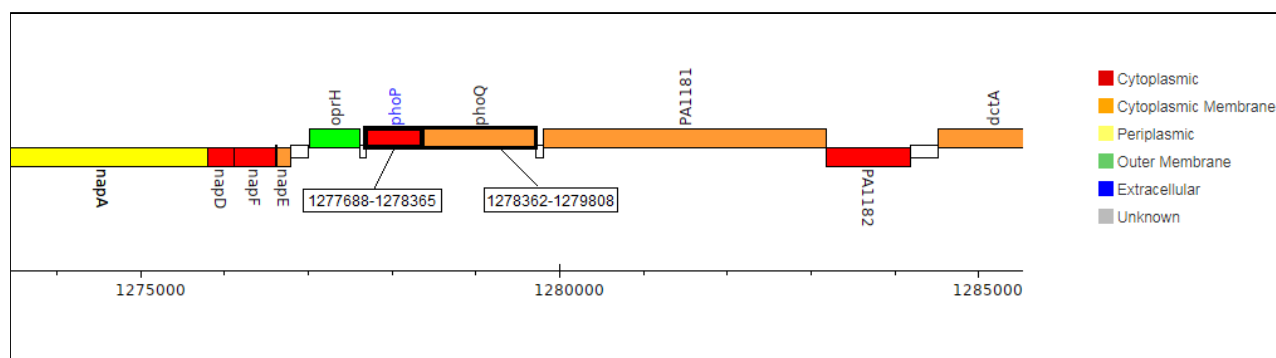


Figura 4. Ubicación cromosomal de los genes *PhoQ-PhoP*. En rojo los genes ubicados en el citoplasma, en naranja los genes ubicados en la membrana.

6.2 Alineamiento de secuencias nucleotídicas del gen *PhoQ* y *PhoP* en diferentes cepas de *P. aeruginosa* encontradas en las bases de datos

Con el objetivo de observar las regiones conservadas y las posibles mutaciones génicas entre las secuencias de los genes *PhoP* y *PhoQ* de cepas resistentes frente a la cepa sensible, se realizaron alineamientos múltiples incluyendo las secuencias obtenidas a partir del Blastn que se pueden visualizar mejor en la tabla 1.

Nombre de la cepa	Gen	Descripción
PB367	<i>PhoQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP025056.3
GIMC5002	<i>PhoQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP043549.1
CCUG	<i>PhoQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP043328.1
243931	<i>PhoQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP041772.1
AR_0357	<i>PhoQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP027166.1
P5	<i>PhoQ</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: KT716120.1
PA0750	<i>PhoP</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP034908.2
DVT412	<i>PhoP</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP050333.1
PAAK095	<i>PhoP</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - GenBank: CP054473.1

Tabla 1. Cepas elegidas en el programa Blastn para los genes *PhoQ-PhoP*.

Los resultados obtenidos a partir del alineamiento para el gen *PhoQ* permitieron determinar en primer lugar, que secuencias como GIMC5002, AR_0357 y P5 tuvieron un 100% de identidad con las cepas MDR-3 y MDR-4. (Figura 5A) En segundo lugar, se determinó que la única diferencia entre MDR3 y MDR4 es el codón de inicio GTG, el cual solo lo tiene la cepa MDR3; las cepas GIM5002 y PAO1 – PA1180 también lo tienen. (Figura 5B). Y por último, el menor porcentaje de identidad con las cepas MDR-3 y MDR-4 se presentó con la cepa 243931 con un 49.52% de identidad, en donde 599 nucleótidos de 1347 fueron iguales. Adicionalmente, se pudo observar una única diferencia entre las cepas PB367, CCGU y 243931 presentando al final de la secuencia el codón “CAC” y en donde la cepa 243931 difiere de estas dos no presentándolo. (Figura 5B).

Al comparar las secuencias MDR-3 y MDR-4 con la cepa sensible PAO1-PA1180 los porcentajes de identidad fueron de 99.41% y 99.40% respectivamente para MDR3 y MDR4, resaltándose la presencia de 8 mutaciones puntuales en los nucleótidos, en primer lugar va el nucleótido presente en las cepas MDR y en segundo lugar el nucleótido presente en la cepa sensible, en la posición 24 una sustitución por transición (C-T) , en la posición 254 una sustitución por transversión (T-A), en la posición 258 una mutación por transición (T-C), en la posición 342 una sustitución por transición (T-C), en la posición 363 una sustitución por transición (C-T), en la posición 675 una sustitución por transversión (G-T), en la posición 702 una sustitución por transición (G-A) y en la posición 1150 una sustitución por transición (T-C). Estos nucleótidos distintos también los presentan las cepas GIMC5002, P5 y AR_0357. (Figura 5C)

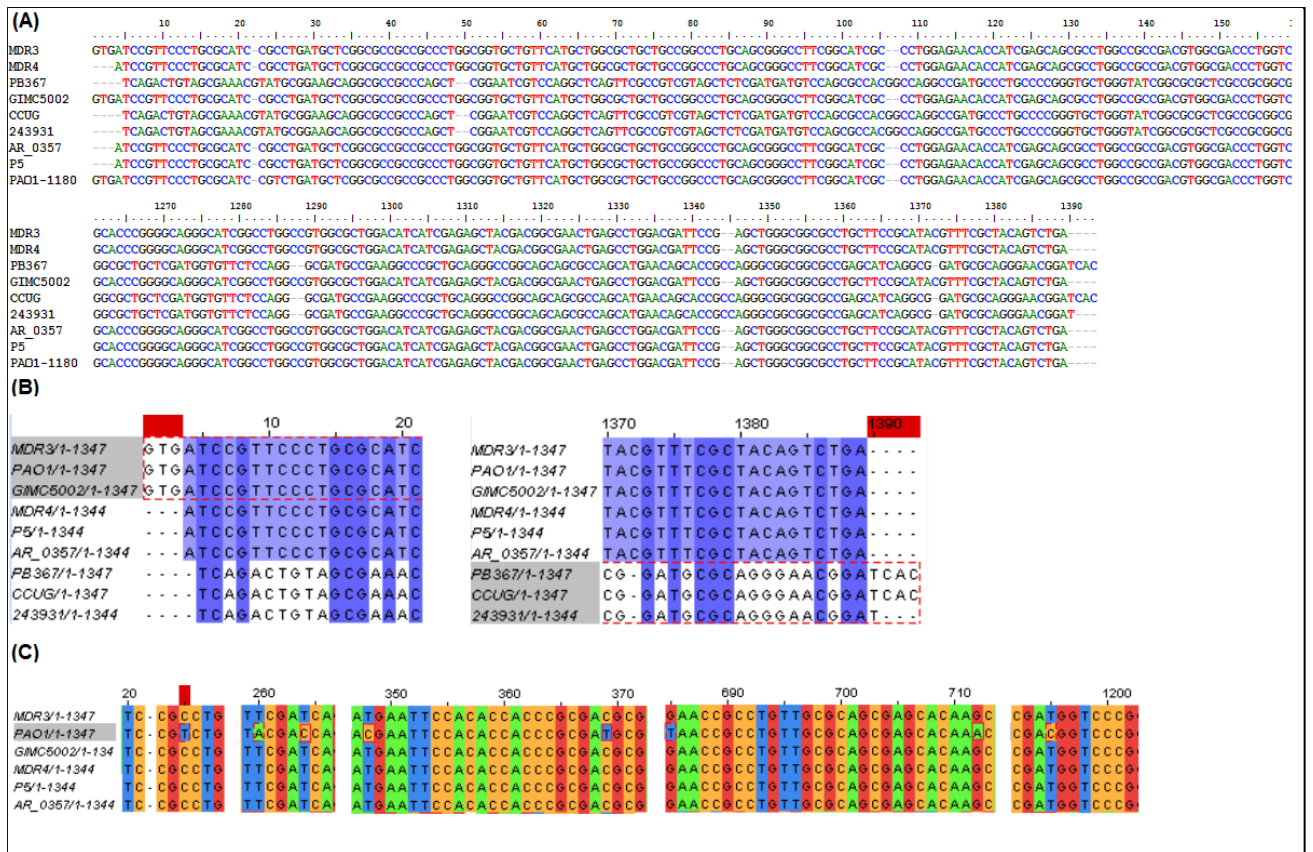


Figura 5. Alineamiento de secuencias nucleotídicas del gen *PhoQ* de diferentes cepas de *P. aeruginosa*. **(A)** Representación del alineamiento de las nueve cepas seleccionadas **(B)** Inicio y final de las secuencias en donde se observan diferencias de codones **(C)** Mutaciones de nucleótidos encontradas en las secuencias MDR3 y MDR4 en comparación con la cepa sensible. Posición 24 (C-T), posición 254 (T-A) posición 258 (T-C), Posición 342 (T-C), posición 363 (C-T), Posición 675 (G-T), Posición 702 (G-A), posición 1150 (T-C). MDR3-MDR4= *Pseudomonas aeruginosa* MDR; PAO1= *Pseudomonas aeruginosa* cepa sensible; GIMC5002, P5, AR_0357, PB367, 243931= cepas de *Pseudomonas aeruginosa* encontrada en BLASTn.

Para el alineamiento que corresponde a las secuencias del gen *PhoP* (Figura 6A), se pudo observar gran similitud entre las secuencias, a diferencia de lo que sucedió con el gen *PhoQ*. En la posición 568 en la secuencia de la cepa resistente de *Pseudomonas aeruginosa* podemos observar una mutación de sustitución por transición, ya que se encuentra una C en vez de T en la cepa resistente de *P. aeruginosa*. (Figura 6B)

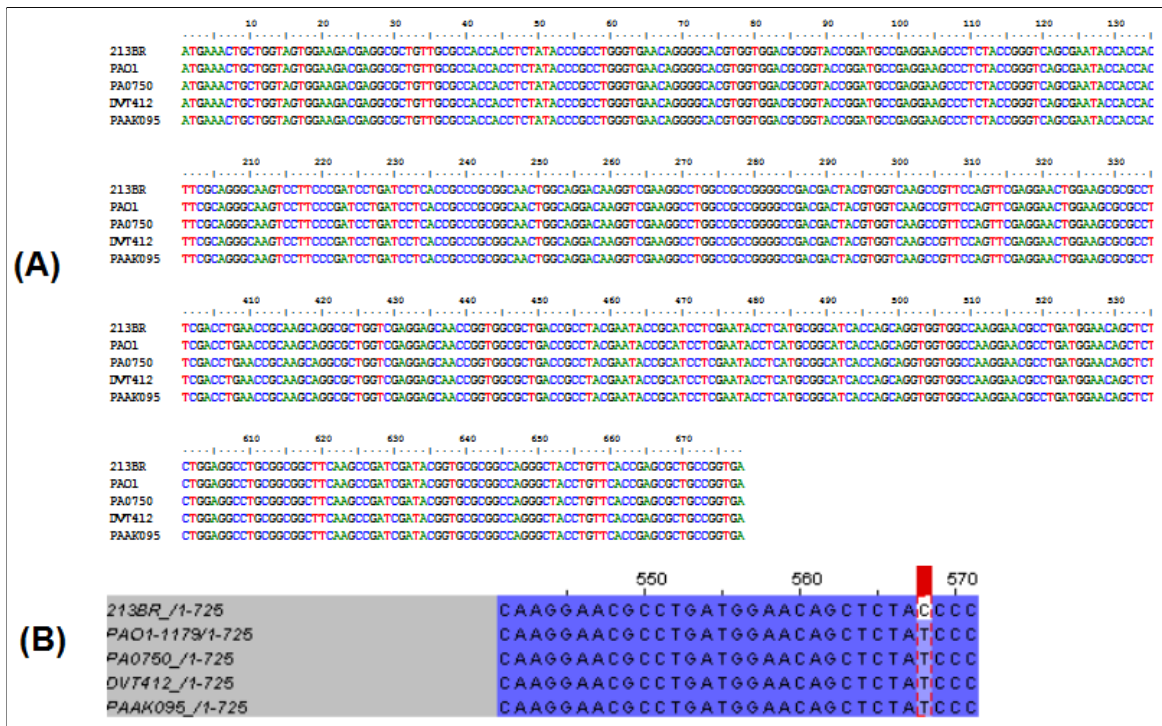


Figura 6. Alineamiento de secuencias del gen *PhoP*. (A) Alineamiento completo del gen *PhoP* (B) Se observa una mutación nucleotídica en comparación con la cepa sensible.

213BR= *Pseudomonas aeruginosa* MDR; PAO1= *Pseudomonas aeruginosa* cepa sensible; PA0750, DVT412, PAAK095= Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* encontrada en BLASTn.

6.3 Identificación de marcos abiertos de lectura y secuencias de proteínas codificadas por los genes *PhoQ-PhoP*

Utilizando la herramienta ORF Finder se identificaron varios marcos abiertos de lectura, de los cuales uno solo contenía la secuencia completa de aminoácidos de cada gen. Para el gen *PhoQ* a partir de las secuencias del gen tanto para la cepa MDR3 como MDR4 de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvieron ocho posibles marcos abiertos de lectura (ORFs). Se eligió la primera opción de ORF y de secuencia para la cepa MDR3 y la primera opción para la cepa MDR4 ya que se muestra una secuencia que no es interrumpida y contiene los aminoácidos esperados de acuerdo con la secuencia de nucleótidos de la cual se partió (Figura 7). A pesar de las diferencias observadas en los alineamientos de las secuencias nucleotídicas, entre las cepas de *P. aeruginosa* MDR3 y MDR4, las dos secuencias proteicas obtenidas a partir de los ORFs son idénticas en un 100% así que a partir de acá solo se va a trabajar con la secuencia de la cepa MDR-3.

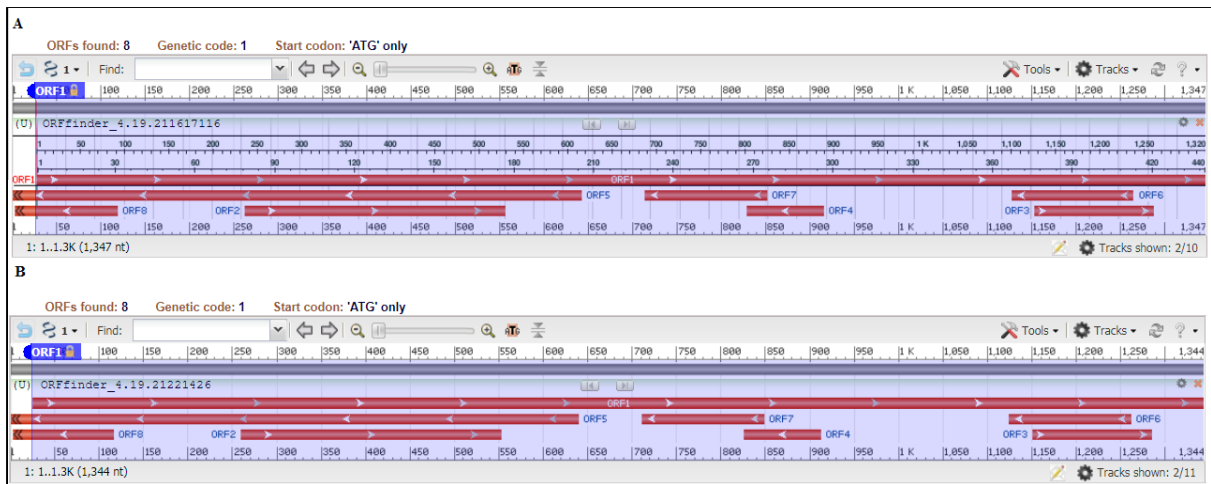


Figura 7. Marcos abiertos de Lectura (ORFs) encontrados para las secuencias de nt de del gen *PhoQ* en *Pseudomonas aeruginosa* cepas MDR3 y MDR4 (A) ORFs para el gen *PhoQ* de la cepa MDR3 (B) ORFs para el gen *PhoQ* de la cepa MDR-4

Para el gen *PhoP* se utilizó la secuencia 213BR, en donde se obtuvieron tres resultados en ORF Finder y se eligió el primero ya que fue la secuencia menos interrumpida de inicio a fin y contiene los aminoácidos esperados de acuerdo con la secuencia de nucleótidos de la cual se partió. (Figura 8)

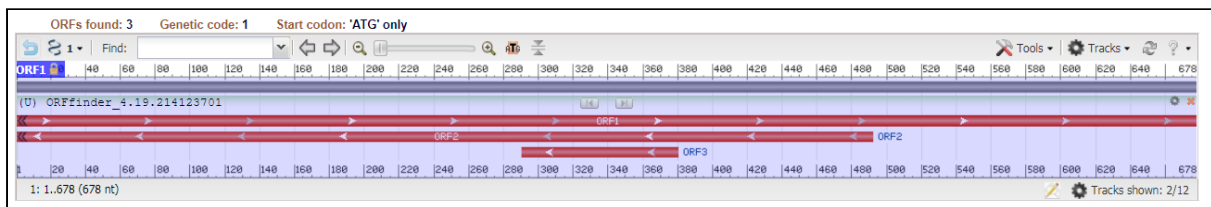


Figura 8. Traducción de secuencias del gen *PhoP* en *Pseudomonas aeruginosa* cepa 213BR.

6.4 Alineamiento de secuencias proteicas del gen *PhoQ* y *PhoP*

Para comprobar si las mutaciones de nucleótidos realmente afectan o no la proteína se tomaron las secuencias obtenidas de los marcos de lectura abiertos seleccionados para cada gen *PhoP-PhoQ* y se realizó un alineamiento múltiple con secuencias proteicas ortólogas incluyendo la secuencia de la cepa sensible PAO1 como control de comparación.

Para la proteína *PhoP* se utilizó la secuencia proteica de la cepa resistente de *Pseudomonas aeruginosa* 213BR, la sensible PAO1-PA1179, PA7050, DVT412 y PAAK095. Todas las secuencias tuvieron un 100% de identidad, lo cual permite establecer que la

mutación génica encontrada en la cepa resistente 213BR, posición 568 con el cambio de C por T corresponde a una mutación silenciosa pues no afecta la secuencia aminoacídica de la proteína. (Figura 9B)

Para la proteína PhoQ se utilizaron las secuencias proteicas de las cepas MDR-3, GIM5002, AR_057, P5 y la sensible PAO1-PA1180 (Figura 9A). Al realizar el alineamiento en Clustal Omega se observó solo una mutación de cambio de sentido en comparación a la cepa sensible. Esta mutación corresponde al aminoácido Fenilalanina (F) en la posición 76, en contraste con la cepa sensible en donde se encuentra una tirosina (Y). (Figura 9C).

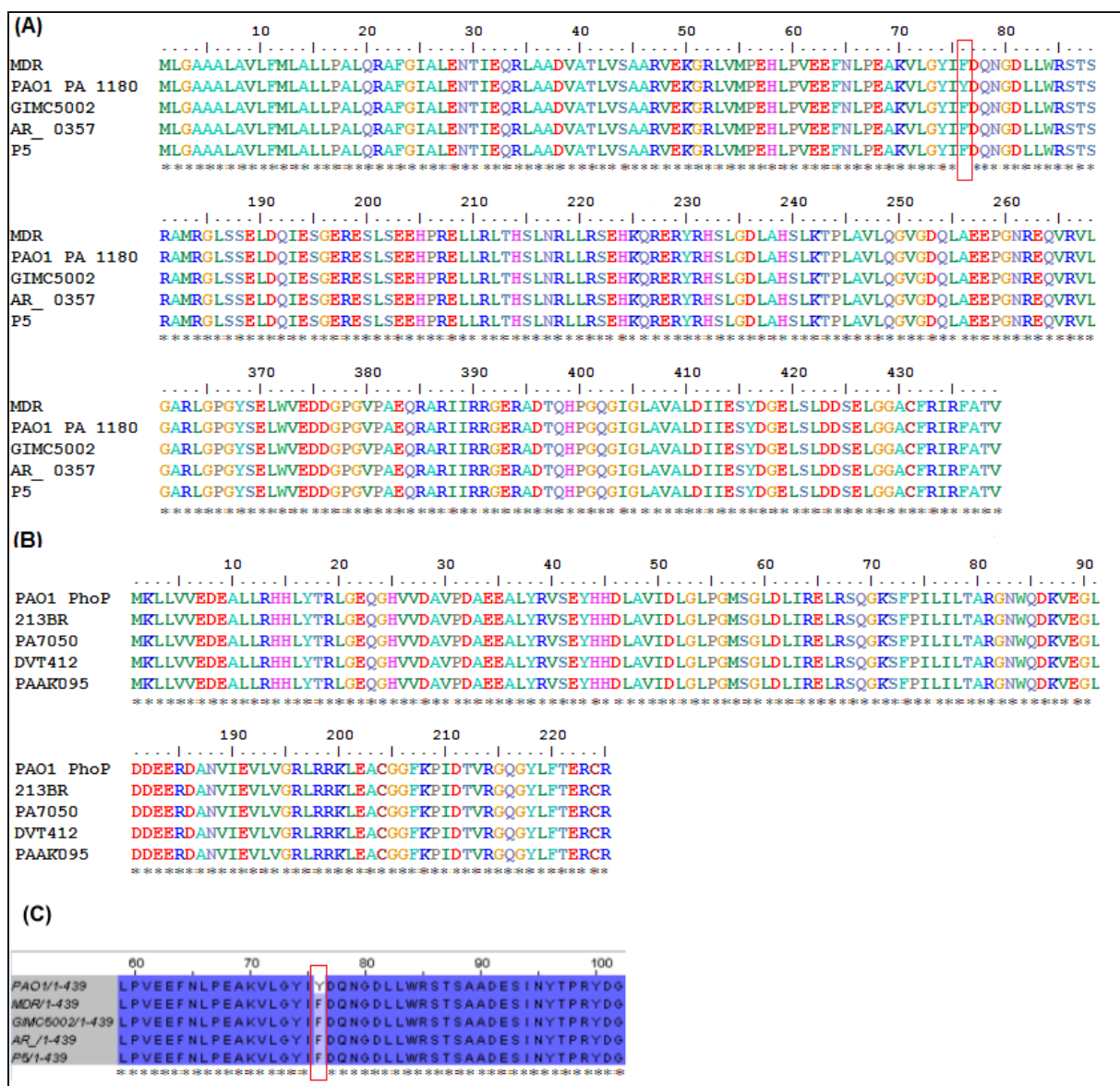


Figura 9. Alineamiento de las secuencias proteicas de PhoQ y PhoP en Clustal Omega **(A)** Alineamiento de PhoQ, en rojo el lugar de la mutación **(B)** Alineamiento de PhoP **(C)** Se observa una mutación en todas las cepas en comparación con la cepa sensible PAO1 de *P. aeruginosa* PhoQ. Los asteriscos indican las partes iguales de las secuencias.

Con el fin de encontrar el sitio donde se produjo la mutación que corresponde a un cambio de sentido en la secuencia nucleotídica se realizó la comparación y se encontró que el nucleótido responsable se encuentra en la posición 254 de la secuencia MDR, perteneciendo al codón "TTC" que al ser traducido se obtiene Fenilalanina (Figura 10B), a diferencia de la cepa sensible que tiene "TAC" y al ser traducido se obtiene Tirosina.

Por otro lado y teniendo en cuenta que a nivel nucleotídico, el gen PhoQ de las cepas MDR, presentó varias mutaciones respecto a la sensible, cada mutación genética descrita se analizó a nivel proteico de forma individual así: posición 24 con el codón "GTC" y "GCC" los cuales codifican para Arginina (Figura 10A), posición 258 con el codón "GAC" y "GAT" los cuales codifican para ácido aspártico (Figura 10C), posición 342 con el codón "AAC" y "AAT" los cuales codifican para Asparagina (Figura 10D), posición 363 con el codón "GAT" y "GAC" (Figura 10E) los cuales codifican para ácido aspártico, posición 675 con el codón "CTT" y "CTG" los cuales codifican para Leucina (Figura 10F), posición 702 con el codón "AAA" y "AAG" (Figura 10G) los cuales codifican para Lisina y posición 1150 con el codón "GAC" y "GAT" los cuales codifican para Ácido aspártico (Figura 10H); teniendo en cuenta que el código genético es degenerado se observó que las mutaciones génicas no afectan a la proteína, por ende, son mutaciones silenciosas.

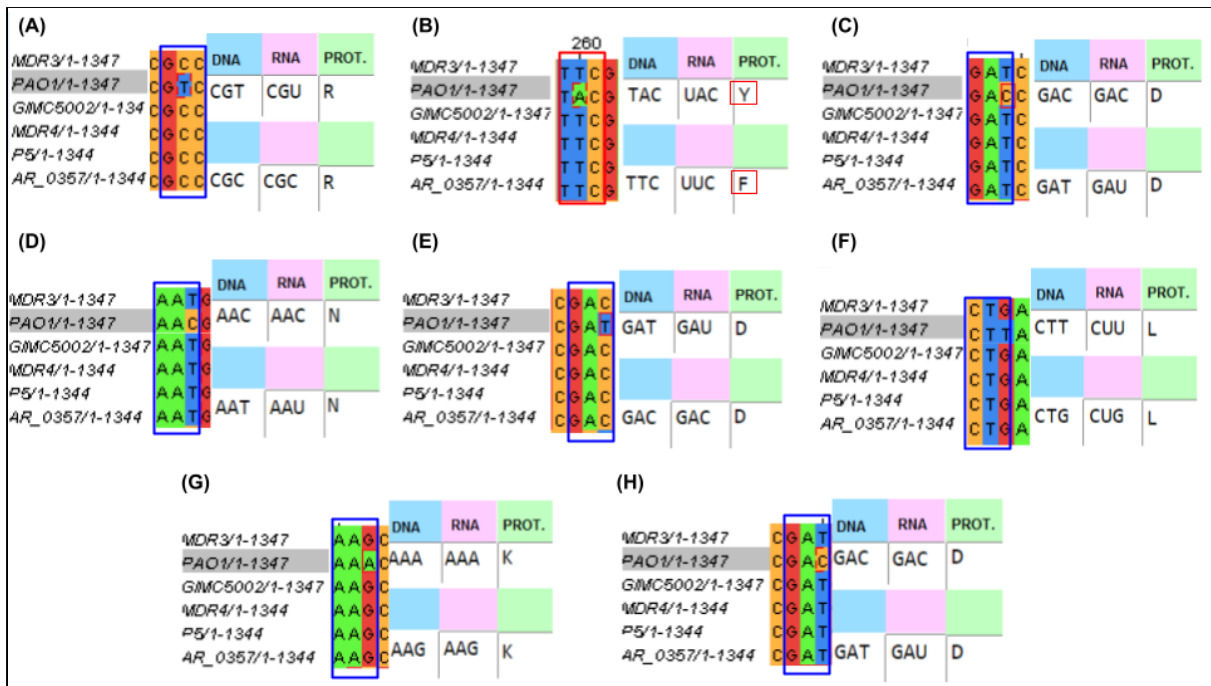


Figura 10. Mutaciones encontradas en la secuencia nt del gen *PhoQ* y su traducción. En todas se muestra a la izquierda el lugar de la secuencia nucleotídica donde ocurre la mutación y a la derecha se muestra la transcripción y traducción. En la figura B observamos la mutación de cambio de sentido por el codón “TTC”.

6.5 Alineamiento de secuencias proteicas de ortólogos de *PhoQ* y *PhoP*

Para realizar una comparación de secuencias proteicas de *PhoQ* y *PhoP*, secuencias de aminoácidos ortólogas a partir de *Klebsiella pneumoniae* cepa Kpngiani7132550, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* cepa TW-Stm6, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* fueron seleccionadas a partir de bases de datos como CARD y NCBI. Se procedió a hacer el alineamiento múltiple en Clustal Omega, entre los ortólogos de *PhoQ* con las secuencias de la cepa MDR de *Pseudomonas aeruginosa* y la cepa sensible PAO1-PA1180 de *Pseudomonas aeruginosa*. Las secuencias de *Pseudomonas aeruginosa* tuvieron un porcentaje de identidad de 99.77% entre ellas, sin embargo, en comparación a los otros microorganismos, el porcentaje de identidad de *PhoQ* de *Pseudomonas* con la de las demás especies, fue muy bajo, por ejemplo, la mayor identidad de *PhoQ* fue de *Klebsiella pneumoniae* la cual osciló entre 36-37%, con *S. flexneri* y *E. coli* obtuvo 35% y con *S. Typhimurium* 34%, en general son pocas las regiones conservadas y estas se ubican en el dominio de histidina quinasa, dominio típico de esta gran familia de proteínas a las cuales pertenece *PhoQ*. (Figura 11A).

Al realizar los análisis del alineamiento múltiple, también se pudo determinar que los porcentajes de identidad entre las secuencias de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* son altos (99.78%), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* con *Escherichia coli* (86.71%) y *Klebsiella pneumoniae* con *E. coli* y *S. flexneri* (82.35%).

Al igual que lo observado con PhoQ, el alineamiento múltiple, las secuencias de proteínas de PhoP entre las cepas de *P. aeruginosa* MDR y sensible presentaron alta identidad entre ellas (100%), ya entre las ortólogas en otros microorganismos respecto de *P. aeruginosa* los porcentajes fueron más bajos (52-55%); sin embargo, es de resaltar que con respecto a los resultados en PhoQ, PhoP pareciera más conservada con las de las otras bacterias. De igual forma, entre las enterobacterias (*E. coli*, *S. flexneri*, *S. enterica serovar Typhimurium* y *K. pneumoniae*), las secuencias de proteínas PhoP presentaron porcentajes de identidad mayores al 90%. Es importante resaltar que, en el alineamiento múltiple, se observan más regiones conservadas para las proteínas PhoP que para las PhoQ entre los microorganismos evaluados (Figura 11B).

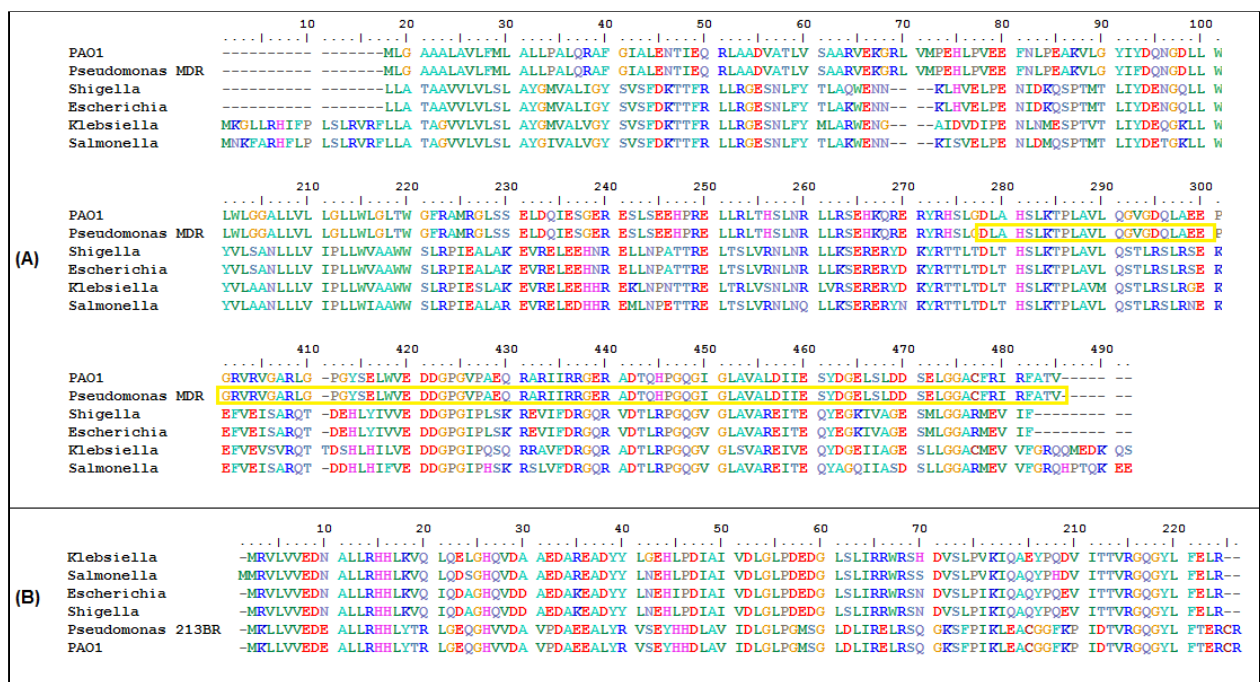


Figura 11. Alineamiento múltiple entre secuencias proteicas de PhoQ y PhoP con ortólogas en otros microorganismos. **(A)** Alineamiento para PhoQ. En orden de arriba abajo *Pseudomonas aeruginosa* cepa sensible PAO1, *Pseudomonas aeruginosa* MDR, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. **(B)** Alineamiento del gen PhoP. En orden de arriba abajo *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella serovar Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*

213BR y *Pseudomonas aeruginosa* cepa sensible PAO1. En el recuadro amarillo se observa el dominio histidina quinasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.6. Análisis filogenético de los genes *PhoP* y *PhoQ*

Utilizando el alineamiento obtenido en el Clustal Omega se procedió a realizar el árbol filogenético para cada uno de los genes, con el objetivo de determinar qué tipos de variaciones evolutivas se encuentran entre estos microorganismos. Se utilizó el programa MEGA-X y se construyó el árbol filogenético con el método de Neighbour joining. Para PhoQ y PhoP este análisis involucró las 6 secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente; en el cual todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias obteniendo un total de 492 y 226 posiciones respectivamente en el conjunto de datos final.

En los árboles filogenéticos para PhoQ y para PhoP, se puede observar y confirmar que existe una variabilidad genética de estas proteínas ya que las secuencias de *P. aeruginosa* forman un clado o rama temprana encontrándose a mayor distancia de las demás ramas donde se agrupan las proteínas de las demás especies (Figura 12A y 12B). También es de resaltar que la mayor cercanía por similitud se da entre *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*, ya que como se observaba en los alineamientos de la figura 11, el porcentaje de identidad era mayor entre estas dos especies.

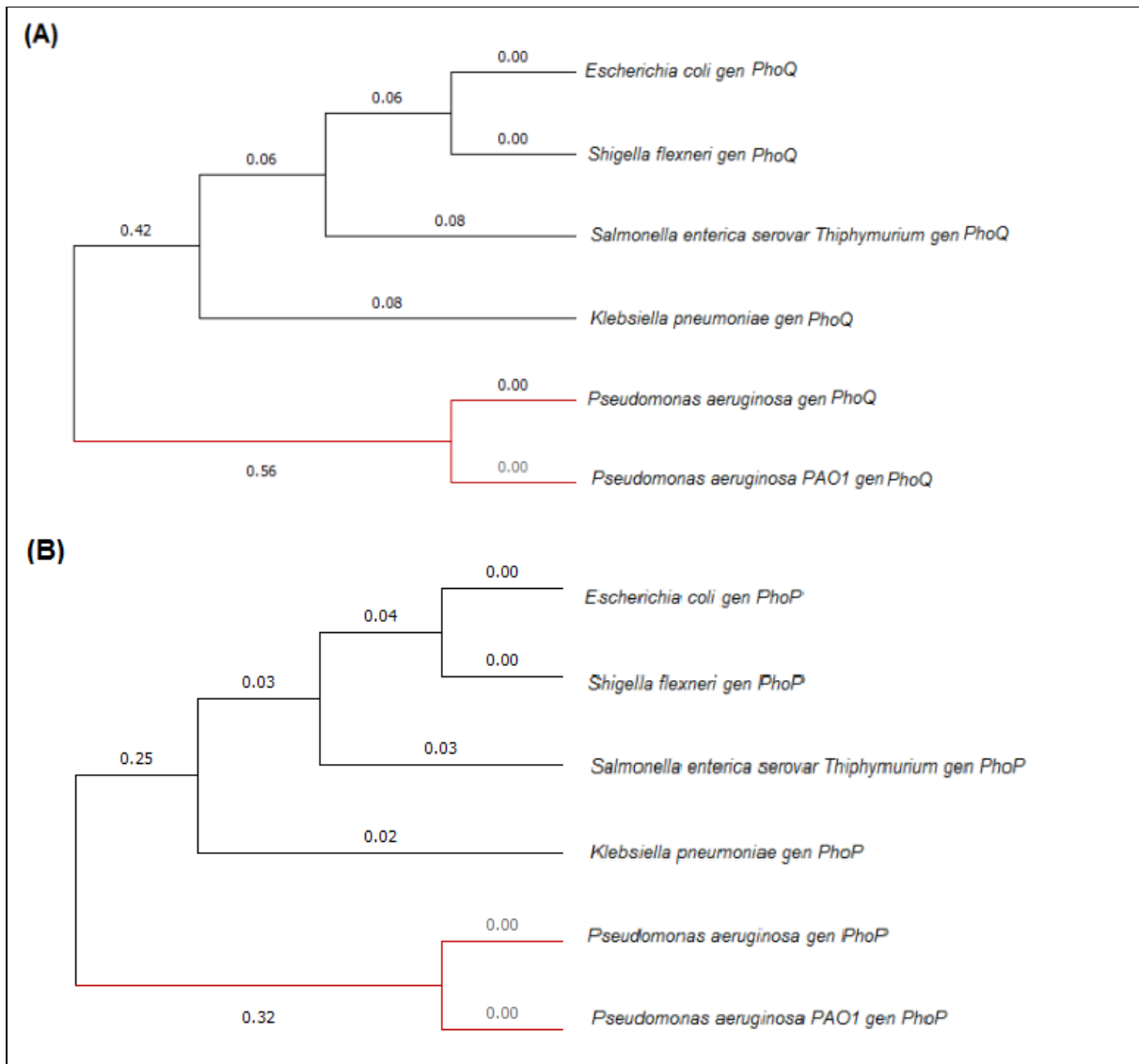


Figura 12. Árbol filogenético a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas PhoQ y PhoP con sus ortólogas en otras especies bacterianas. **(A)** Árbol filogenético de PhoQ. **(B)** Árbol filogenético de PhoP.

6.7 Descripción de las características bioquímicas *in silico* y de los dominios típicos de las proteínas PhoP-Q

Con el objetivo de caracterizar a nivel bioquímico las proteínas PhoQ-PhoP, se utilizó en primer lugar el programa ProtParam el cual arroja diferentes datos como lo es el peso molecular, el pI teórico, la composición de aminoácidos, la composición atómica, la vida media estimada y el índice de inestabilidad. Se obtuvo para la proteína PhoQ un total de 439 aminoácidos con un peso molecular de 49125.01 kDa, tiene un punto isoeléctrico de 5.56 y los aminoácidos más prevalente son Leucina y Arginina con 15.9% y 9.6% respectivamente. Es una proteína inestable ya que su índice de inestabilidad fue de 42,29.

Para la proteína PhoP se obtuvo un total de 225 aminoácidos con un peso molecular de 25650.35 kDa, un punto isoeléctrico de 5.34 y los aminoácidos más prevalentes son Leucina y ácido glutámico con 14.7% y 10.2% respectivamente. Su índice de inestabilidad es de 46, 59 lo cual indica que es una proteína inestable.

A continuación, se utilizó el programa SOSUI el cual predice una parte de la estructura secundaria de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos y tiene la capacidad de mostrarnos si la proteína es soluble o transmembrana. Se pudo predecir que la hidrofobicidad de la proteína PhoQ es de -0.213212 y presenta dos hélices transmembranales (Figura 13B) y la proteína PhoP es una proteína soluble ya que ella se encuentra en el citoplasma y presenta un promedio de hidrofobicidad de -0,266667(Figura 13A).

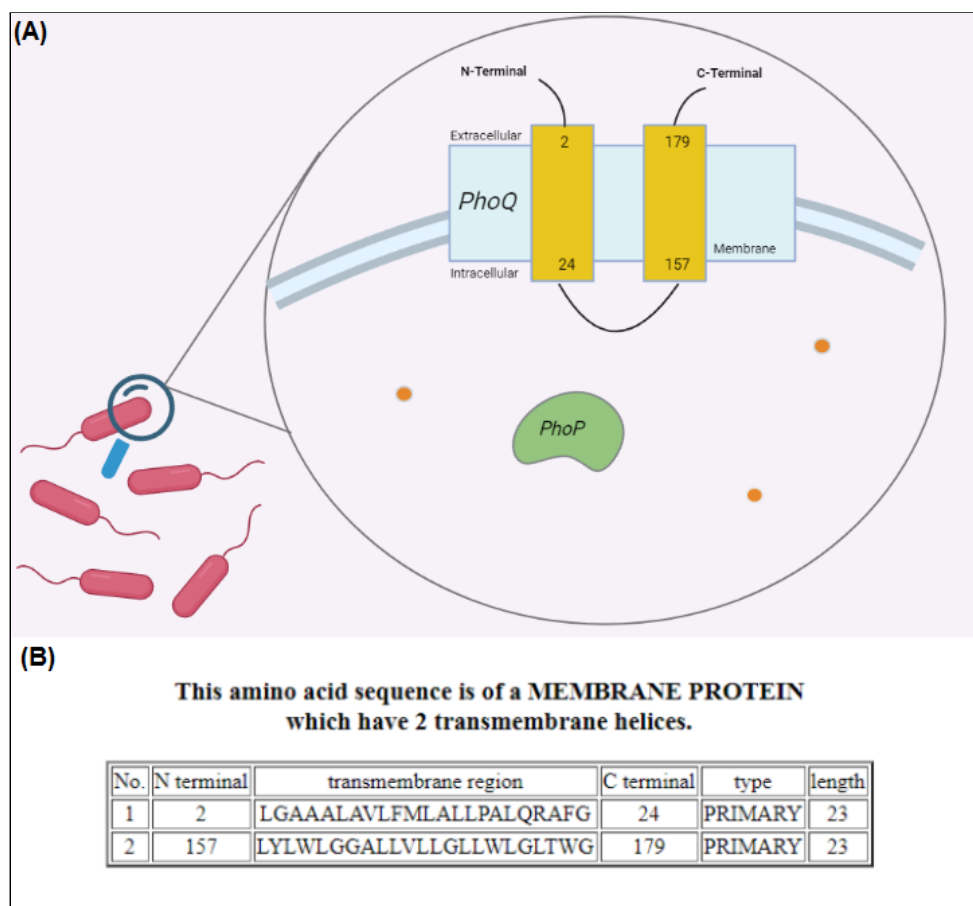


Figura 13. Ubicación celular del sistema de dos componentes PhoQ-PhoP (A) Diagrama alusivo a las posiciones en la bacteria del sistema de dos componentes. (B) Resultado del programa SOSUI para la proteína PhoQ.

Posteriormente, se hizo la búsqueda de dominios y sitios funcionales típicos de la familia de proteínas a la cual pertenecen PhoQ y PhoP, usando el programa Prosite. Para PhoQ, los resultados mostraron dos dominios (Figura 14A), el primero es el histidina quinasa

En primer lugar, para PhoQ se obtuvieron dos dominios (Figura 14A), el primero es el histidina quinasa el cual se caracteriza por estar regulado por estímulos ambientales y se encuentra ubicado en la posición 236 hasta 439 y el segundo dominio es HAMP el cual es un dominio que está presente en histidina quinasa, adenilciclasas, proteínas aceptoras de metilo y fosfatasas participando en un variedad de procesos de transducción de señales y que se encuentra ubicado en la posición 177 hasta el aminoácido 228 (Figura 14A).

En segundo lugar, para PhoP se obtuvieron dos dominios el primero fue el perfil de dominio regulatorio de respuesta que se encuentra ubicado entre el aminoácido 2 hasta el 116 y el segundo es el dominio de unión a ADN de tipo OmpR / PhoB el cual es uno de los más grandes de los reguladores de respuesta citosólica y participa en este sistema de dos componentes y que se encuentra ubicado en la posición 124 hasta el 222 (Figura 14B).

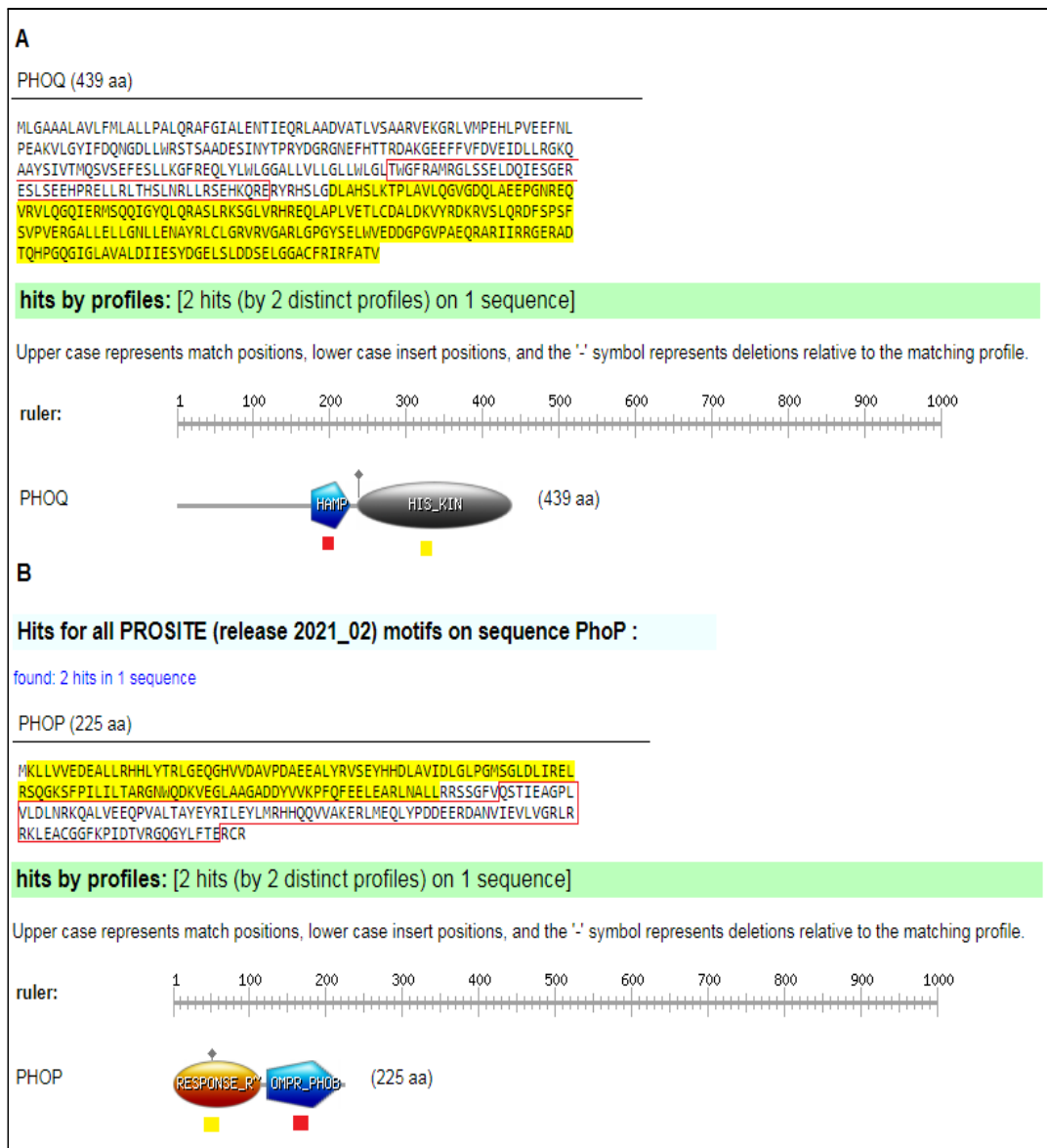


Figura 14. Uso de Prosite base de datos de dominios, familias y sitios funcionales de proteínas. **(A)** PhoQ, en amarillo el dominio Histidina quinasa y en rojo el dominio HAMP **(B)** PhoP, en amarillo dominio regulatorio de respuesta y en rojo dominio de unión a ADN de tipo OmpR / PhoB.

6.8. Predicción de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas codificadas por los genes *PhoP* y *PhoQ*

Para realizar una predicción sencilla de la estructura secundaria de nuestras proteínas se utilizaron los programas GOR IV y PSIPRED. La mayoría de los programas de predicción reconocen 4 tipos de elementos de estructura secundaria: α -hélices, estructuras β , giros β y estructura al azar (random coil). Para PhoQ se aproxima un 60% de hélices alfa y aproximadamente un 30% de estructuras no características o al azar definidas como "Coil".

(Figura 15A). Para PhoP se aproxima un 54% de hélices alfa y aproximadamente un 34% de Coil. (Figura 15B).

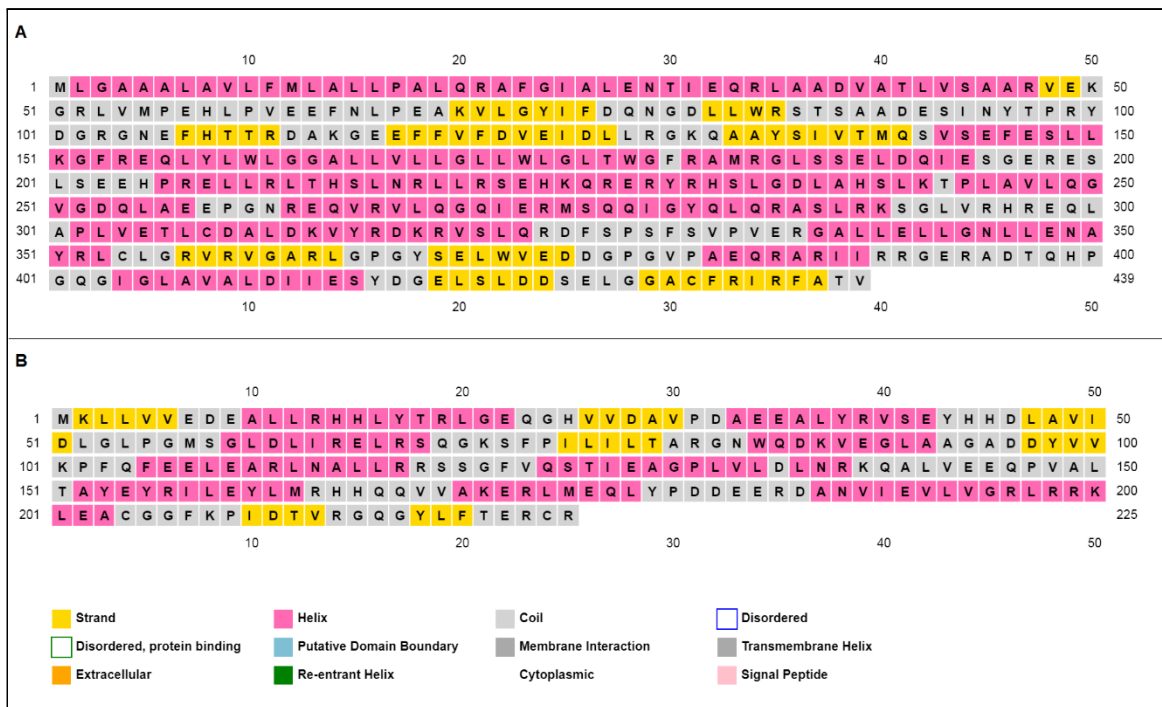


Figura 15. Predicción de estructura secundaria en el programa PSIPRED. **(A)** Predicción para la secuencia proteica de PhoQ **(B)** Predicción para la secuencia proteica de PhoP. En rosado se observan hélices alfa, en amarillo las hebras y en gris los random coil.

A continuación, se utilizó el programa SWISS MODEL para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas en 3D, tanto para PhoQ (Figura 16A) como para PhoP (Figura 16B).

El valor QMEAN proporciona estimaciones de calidad absoluta tanto global (es decir, para toda la estructura) como local (es decir, por residuo), alrededor de cero indican una buena concordancia y puntuaciones de -4.0 o menos implican modelos de baja calidad, para las proteínas PhoQ y PhoP tenemos resultados de -1.17 (Figura 16A1) y -0.80 (Figura 16B1) respectivamente, los cuales están dentro del rango para clasificar los modelos con una buena calidad. Además, aparecen otros valores de QMEAN como el potencial de interacción entre los átomos de C β solamente, todos los átomos, el potencial de solvatación y el potencial del ángulo de torsión que al tener valores positivos nos hablan de que nuestro modelo puntúa más alto que otras estructuras experimentales en promedio (Figura 16A1 y

Figura 16B1).

La gráfica de calidad local muestra, para cada residuo del modelo (reportado en el eje x), la similitud esperada con la estructura nativa (eje y). Normalmente, se espera que los residuos que muestran una puntuación inferior a 0,6 sean de baja calidad. Para el gen *PhoQ* (Figura 16A2) debajo de la línea azul se mostrarían los residuos de baja calidad presentes en el modelo. Así mismo se muestra para *PhoP* (Figura 16B2) pero en este caso, es debajo de la línea roja que se observan los residuos de baja calidad. La proteína *PhoQ* presenta más residuos de baja calidad que la proteína *PhoP*.

En la gráfica de “Comparación”, se ubica el modelo propio con una estrella roja y se observa una comparación de este con otros modelos experimentales en donde los que tienen un QMEAN normal se encuentran como puntos de color negro y los que están más alejados se encuentran de color gris. Para *PhoQ* (Figura 16A3) y para *PhoP* (Figura 16B3) nuestro modelo se encuentra ubicado en el límite de modelos experimentales con puntuación $Z < 1$, lo que quiere decir que tienen un QMEAN normalizado.

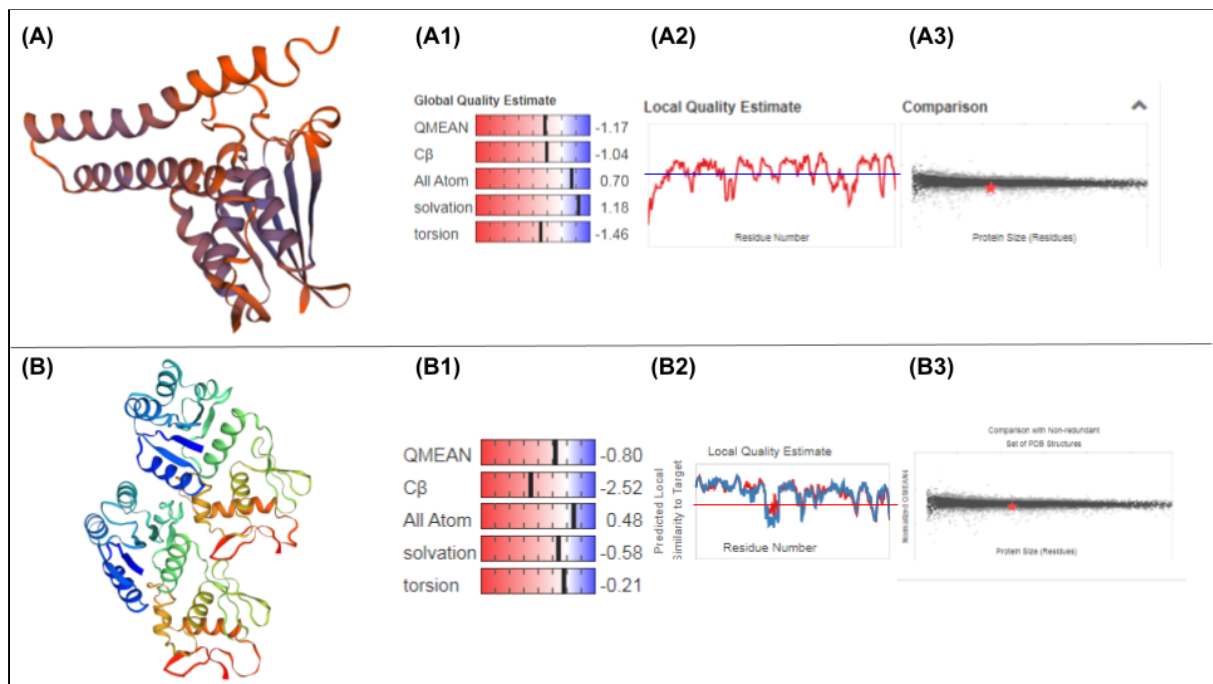


Figura 16. Predicción de la estructura terciaria de las proteínas para las proteínas PhoQ y PhoP. **(A)** Estructura terciaria para la proteína PhoQ **(A1)** Valores de QMEAN y sus cuatro términos individuales para PhoQ **(A2)** Gráfica de calidad local estimada para PhoQ **(A3)** Gráfica de comparación con otros modelos experimentales para PhoQ **(B)** Estructura terciaria para la proteína PhoP **(B1)** Valores de QMEAN y sus cuatro términos

individuales para PhoP **(B2)** Gráfica de calidad local estimada para PhoP **(B3)** Gráfica de comparación con otros modelos experimentales para PhoP.

Después de obtener los modelos tridimensionales de las proteínas se procedió a realizar una validación de estas por medio del programa ProSA-web ya que el reconocer los errores inmersos en ellas nos ayuda a saber más sobre la calidad de los modelos predichos.

Para el gen *PhoQ* se obtuvo una puntuación Z de -6.4, las puntuaciones Z fuera de un rango característico para las proteínas nativas indican estructuras erróneas, pero como se observa en la figura (Figura 17A) el modelo de la proteína que se representa por el punto negro se encuentra dentro de la región definida por los puntajes-Z de las estructuras resueltas por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear para otras proteínas nativas con las mismas características. Para el modelo de PhoP (Figura 18A) se obtuvo un puntaje Z de -7.55 pero al igual que el modelo de PhoQ este se posiciona dentro del rango descritos para los modelos o estructuras resueltas experimentalmente por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear para otras proteínas nativas con las mismas características.

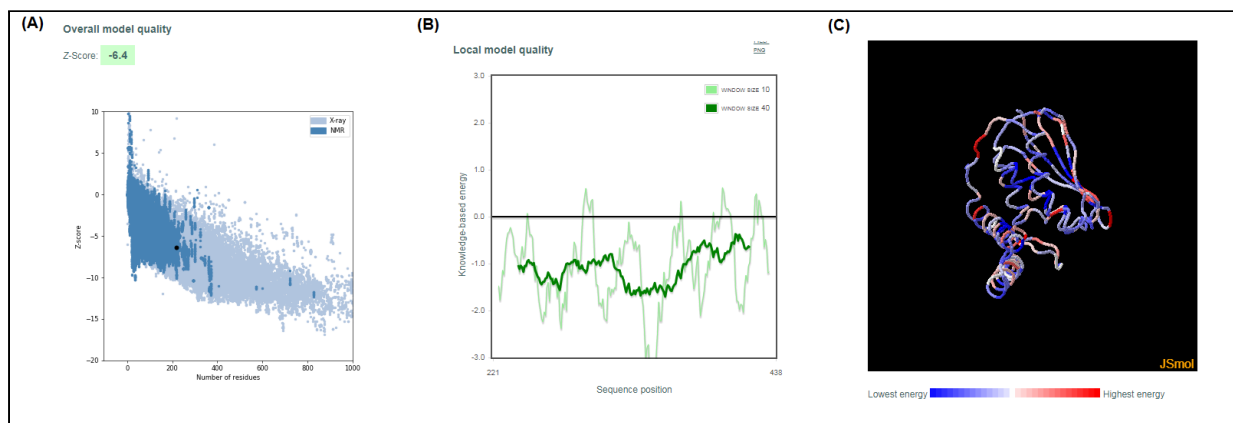


Figura 17. Validación estructura terciaria de la proteína PhoQ mediante ProSA-web. **(A)** Gráfica de calidad general del modelo utilizando la puntuación Z **(B)** Gráfica de calidad del modelo local la cual representa las energías en función de la secuencia de aminoácidos **(C)** Visor de moléculas interactivo para modelo proteico del gen *PhoQ*

Por otra parte, en cuanto a la gráfica de las energías de cada residuo, tanto para el modelo de PhoQ (Figura 17B) como para el modelo de PhoP (Figura 18B) fueron pocos los residuos que se encuentran en la parte positiva de la gráfica, en general, los valores positivos corresponden a partes problemáticas o erróneas de la estructura de entrada.

En la tercera gráfica para la proteína PhoQ (Figura 17C) y PhoP (Figura 18C) encontramos un visor de moléculas interactivo que se relaciona con la figura B, en donde los valores de energía positivos tienden a ser residuos que se colorean de rojo para resaltar energías inusualmente altas. Podemos observar que tanto para PhoQ como para PhoP son pocas las zonas en rojo dándonos a entender que las partes problema de las estructuras son pocas y no representativas.

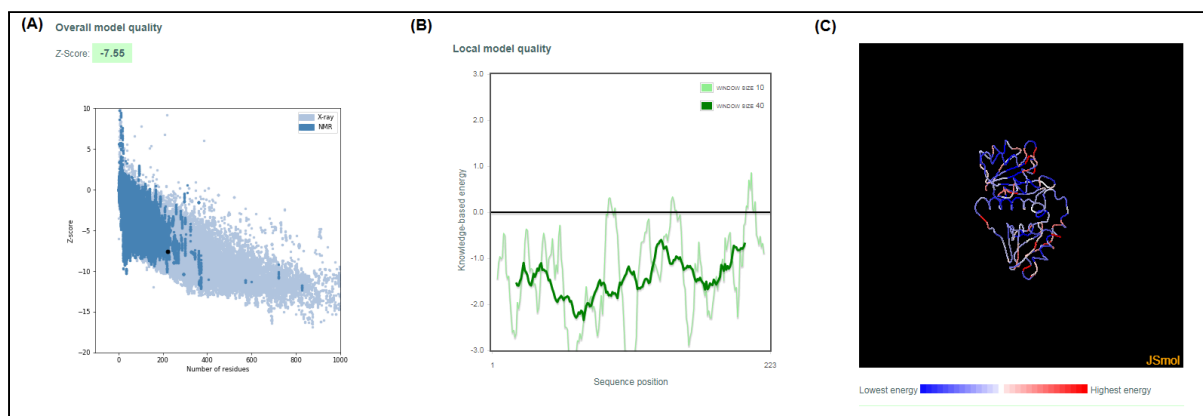


Figura 18. Validación estructura terciaria de la proteína PhoP mediante prosa web. **(A)** Gráfica de calidad general del modelo utilizando la puntuación Z **(B)** Gráfica de calidad del modelo local la cual representa las energías en función de la secuencia de aminoácidos **(C)** Visor de moléculas interactivo para modelo proteico del gen *PhoP*

Por último, se realizó una validación adicional de los modelos con el programa Procheck para así obtener el gráfico de Ramachandran (Figura 19) donde se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, y que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas. Podemos ver que para la proteína PhoQ (Figura 19A) presenta 91,1% de sus residuos en la zona roja que es la zona más favorecida y el 8,4% en las zonas adicionales permitidas. En el caso de la proteína PhoP (Figura 19B) observamos que al igual que PhoQ, tiene gran cantidad de sus residuos en la zona más favorecida con un 94.1% y en las zonas adicionales permitidas un 5.4% de residuos. Por ende, podemos concluir que los modelos presentan residuos en posiciones que indican que la conformación de las proteínas es estable.

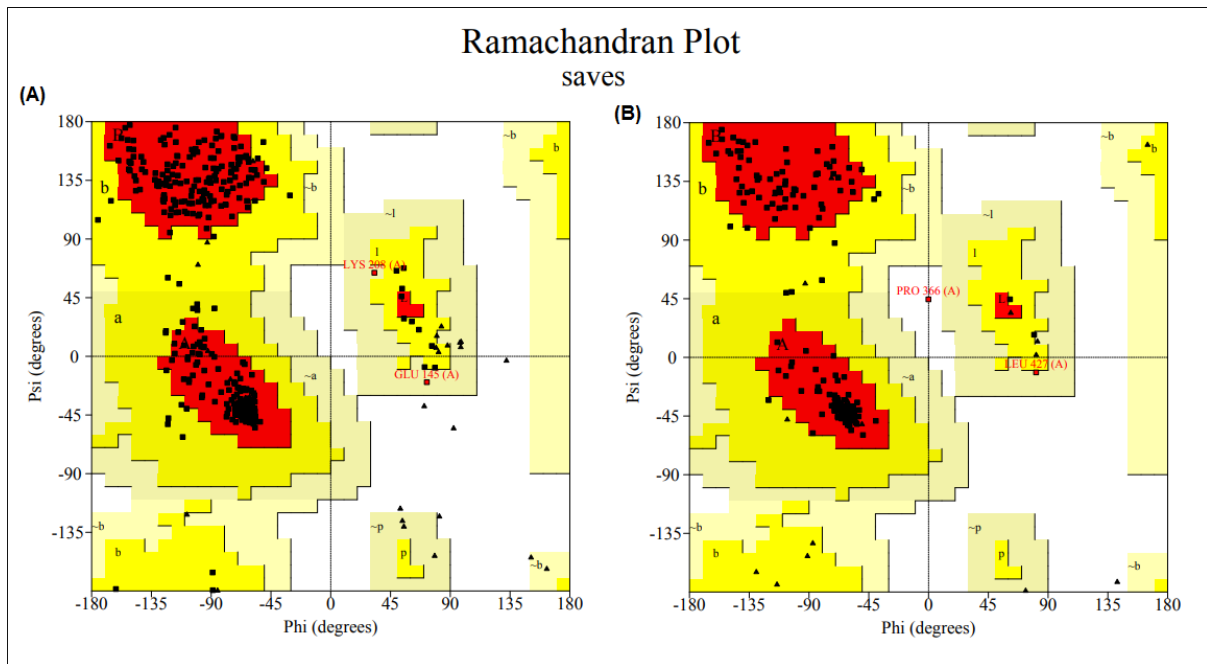


Figura 19. Gráfico de Ramachandran mediante PROCHECK de PhoQ-PhoP. **(A)** Proteína PhoQ **(B)** Proteína PhoP. Las regiones más favorecidas se indican en color rojo; las regiones adicionales permitidas y generosas se indican en amarillo y amarillo claro; las regiones no permitidas se indican en color blanco.

7. Discusión

En este trabajo se realizó una aproximación *in silico* a la caracterización de los genes *PhoQ-PhoP* de cepas MDR de *P. aeruginosa*, hecha la comparación entre cepas MDR y la cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa* se encontraron diferentes mutaciones de aminoácidos que resultaron siendo sin sentido, a excepción de una que generó un cambio en la proteína codificada por el gen *PhoQ*, la cual podría intervenir en la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* ya que se ha evidenciado que el sistema regulador de dos componentes *PhoPQ* potencializa mutaciones,^{101,102,103} causando resistencia a colistina, polimixina B y péptidos antimicrobianos en *P. aeruginosa* tanto en condiciones bajas de Mg^{2+} como en condiciones altas.^{104,105}

En otros estudios se han reportado diferentes mutaciones que dan como resultado deleciones en marco, cambios de marco o truncamientos del gen *phoQ* lo cual confiere resistencia a este microorganismo.¹⁰⁶ Por ejemplo, se registró una deleción de timidina la cual puede provocar un desplazamiento del marco de lectura de los codones y a base del desplazamiento se provoca un truncamiento de 28 aminoácidos carboxi-terminales de la

proteína *PhoQ* ocasionando resistencia.¹⁰⁴ Además de las deleciones, se registran mutaciones que provocan cambios en aminoácidos tales como leucina en posición 364 de la secuencia proteica, glicina en la posición 365,¹⁰⁷ una sustitución por transición de Glicina -Arginina en la posición 365, todas confiriendo resistencia.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹

En este trabajo se obtuvo un cambio de tirosina a fenilalanina en las cepas resistentes de *P. aeruginosa* por el cambio de adenina a timina en la secuencia nucleotídica. Se han reportado que las mutaciones de *PhoQ* suelen ocurrir por un SNP.¹⁰⁷ Esto a nivel bioquímico se asocia frecuentemente al cambio de LPS debido a mutaciones que en general, conducen a una expresión aumentada o constitutiva de los genes para la modificación de la amino arabinosa y, con frecuencia, se acompañan de otras mutaciones en genes que no son sistemas de dos componentes.¹¹⁰ En *PhoP* no se evidenció ninguna mutación lo cual concuerda con otros estudios donde se describe que *PhoP* no tiene fenotipos de resistencia.¹¹¹

En *P. aeruginosa* se conoce que el sistema de dos componentes *PhoPQ* junto a *PmrAB* responden a la presencia de concentraciones limitantes de Mg^{2+} y regulan por separado ciertos operones, el sistema *PhoPQ* autorregula el operón *oprH-phoP-phoQ* en condiciones de crecimiento que limitan el Mg^{2+} y también participa en la resistencia a los péptidos antimicrobianos catiónicos y la polimixina.¹¹² En este trabajo pudimos observar que el porcentaje de identidad de *P. aeruginosa* no es mayor a 36% frente a los demás microorganismos evaluados (*Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*), esto puede deberse a diferencias funcionales que debido a mutaciones y cambios evolutivos además del ambiente en que se encuentra cada especie han variado en *P. aeruginosa*.

De este sistema regulador de dos componentes *PhoQ-PhoP* se han aislado homólogos en diferentes microorganismos patógenos como no patógenos, más que todo en especies de bacterias Gram negativas como lo son *S. Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Shigella flexneri*. La aparición generalizada de este regulón sugiere que su función principal puede estar en el control rutinario de las adaptaciones fisiológicas comunes a la mayoría de las bacterias.¹⁰⁹

Este sistema de dos componentes ha sido mejor descrito en *Salmonella enterica serovar*

Typhimurium en donde se argumenta la funcionalidad de *PhoQ-PhoP* al encontrarse *Salmonella* en entornos ácidos y limitados de Mg^{2+} ya que es un patógeno intracelular y está presente en el tracto digestivo.^{109,113} A diferencia de *Pseudomonas* que es un patógeno que infecta por mucosas y en estas no presenta las mismas condiciones adversas que *Salmonella*, es por esto que se ha evidenciado la activación independiente de Mg^{2+} de *PhoQ-PhoP* en pacientes con fibrosis quística para resistir la alta presencia de péptidos.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Respecto a la funcionalidad de *PhoQ* entre *S. enterica serovar Typhimurium* y *P. aeruginosa* si hay diferencias que se han ido registrando en la literatura, por ejemplo, *P. aeruginosa* puede responder con alta especificidad estructural a diferentes concentraciones de cationes divalentes y protones, como a la presencia de pH ácido, pero, a diferencia de *PhoQ* en *S. Typhimurium* no responde a CAMP. Esto sugiere que *Salmonella* ha evolucionado para identificar ambientes en el hospedador como lo es el reconocimiento de CAMP y del pH ácido que se encuentran dentro del fagosoma del hospedador.^{114,115}

En cuanto a las mutaciones, en *P. aeruginosa* las mutaciones de *PhoQ* dan como resultado una resistencia hasta 64 veces mayor a las polimixinas, a diferencia de *Salmonella* en donde generan supersensibilidad.¹¹⁶ Además, se ha demostrado que los mutantes *PhoQ* de *P. aeruginosa* demuestran deficiencias en la formación de biopelículas, adherencia, movimientos de contracción y en virulencia.^{116,117} Estas diferencias en funcionalidad y adaptación han provocado que *P. aeruginosa* tenga un distanciamiento notorio de las demás especies Gram negativas evaluadas, la poca similitud puede deberse a los dominios típicos en estos genes.

En este trabajo se documentó distintos dominios, (Figura 14) el primero de ellos fue el histidina quinasa de *PhoQ*, el cual se caracteriza por estar regulado por estímulos ambientales, se autofosforila en un residuo de histidina dependiente de ATP, creando un grupo fosforilo de alta energía que posteriormente se transfiere a un residuo de aspartato en el dominio de la proteína reguladora de respuesta. Los dominios de detección o sensores pueden ser variables a diferencia del núcleo de la quinasa que son aproximadamente 250 residuos más conservados.¹¹⁸

La histidina quinasa transmembrana *PhoQ* de *E. coli*, *S. enterica serovar Typhimurium* y *P.*

aeruginosa son similares en su respuesta biológica a los cationes divalentes extracelulares; sin embargo, sus dominios sensores muestran poca identidad de secuencia. Se sugiere que la forma en que la proteína *PhoQ* en *P. aeruginosa* detecta y responde a señales extracelulares pueden diferir de las de las demás bacterias entéricas ya que la naturaleza modular de las histidina quinasa sugieren que la diferencia de los dominios sensores podría haber surgido como resultado de un evento de recombinación del ADN.¹¹⁹⁻¹²²

En *PhoQ* se encuentra el dominio HAMP, el cual se encuentran con frecuencia conectando dominios extracelulares y transmembrana a dominios catalíticos citoplasmáticos y se ha demostrado que son esenciales para la correcta transducción de señales. Los dominios HAMP a menudo están presentes en proteínas de señalización de homodímeros transmembrana como histidina quinasa, adenil ciclasas, quimiorreceptores que aceptan metilo y fosfatasa.¹²²

Los dominios presentes en *PhoP* fue en primer lugar, el perfil de dominio regulatorio de respuesta, el cual tiene tres actividades importantes que son interactuar con los dominios de histidina quinasa fosforilados y catalizar la transferencia de un grupo fosforilo a uno de sus propios residuos Asp, catalizar la autodefósforilación y finalmente regular las actividades de sus dominios efectores asociados de una manera dependiente a la fosforilación.¹²¹ En segundo lugar se encontró el dominio de unión a ADN de tipo OmpR / PhoB, los dominios en *PhoP* tienen mayor similitud con el de las demás especies comparadas y esto tiene concordancia con anteriores estudios.¹¹⁹

La mayor cantidad de diferencias entre las especies giran en torno de las proteínas *PhoQ*, lo cual refuerza la idea de que la evolución de diferentes mecanismos es la consecuencia de una amplia divergencia de secuencias. Se podría decir que la proteína *PhoQ* de *P. aeruginosa* se adaptó para detectar señales adicionales que son necesarias para su existencia en un espectro diferente de entornos.¹¹⁹

En la literatura aún falta más documentación sobre la estructura proteica de este sistema de dos componentes en *P. aeruginosa*. Sin embargo, en *Salmonella* se ha observado que la región periplásmica de *PhoQ* consiste en una región central de cinco láminas β , coincidente con la topología de los dominios PAS. No obstante, esta región está flanqueada por una larga hélice α N-terminal y varias hélices α cortas, formando un plegamiento característico

que se ha denominado dominio PDC (por ser un plegamiento común encontrado en PhoQ-DcuS-CitA).¹²³⁻¹²⁵

Homólogos del dominio sensor de la histidina quinasa de *PhoQ* como *E. coli*, *S. enterica* serovar *Typhimurum*, *Erwinia carotovora* y *Providencia stuartii* a diferencia de *P. aeruginosa* poseen un grupo de residuo de ácidos que probablemente requirió la evolución de un mecanismo diferente de detección de señales.^{119, 123} Por lo tanto, sería bueno investigar los cambios estructurales entre estas especies para así poder acercarse más al distanciamiento evolutivo que han tenido.

8. Conclusiones

- Dando cumplimiento al primer objetivo específico del trabajo, se encontró una nueva mutación SNP de cambio de sentido en la secuencia del gen *PhoQ* de la cepa MDR de *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con la cepa de referencia PAO1 la cual es sensible a medicamentos. Adicionalmente, se observó que como se ha descrito en la literatura, *PhoP* no presentó mutaciones en comparación a la cepa sensible.
- Respecto al segundo objetivo específico se pudo observar que el porcentaje de identidad de *P. aeruginosa* frente a otras bacterias MDR es bajo debido a diferentes cambios evolutivos y de entornos ambientales que hacen que este sistema de dos componentes sea diferente a los de las demás especies bacterianas.
- Dando cumplimiento al tercer objetivo específico se realizó la predicción de la estructura terciaria de las proteínas codificadas por este sistema de dos componentes y se observó la buena calidad en los modelos obtenidos, lo cual permite establecer características que a futuro pueden servir como base para usar desde la biología computacional y realizar la búsqueda de compuestos que tengan afinidad de unión con estas proteínas, paso principal en el diseño racional de nuevos medicamentos.

Los resultados obtenidos otorgan información de este sistema de dos componentes en *Pseudomonas aeruginosa*, recalcando su importancia no solo en la virulencia de este patógeno sino también en su resistencia a los diferentes antibióticos. También contribuye al conocimiento para la identificación de nuevos marcadores moleculares en estas cepas resistentes para poder combatir este problema de salud pública.

Referencias bibliográficas

1. Yagui M. Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. Rev. perú. med. exp. 2018; 35: 1726-4634. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342018000100002
2. Quiñones D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Rev Cubana Med Trop. 2017; 69 (3): 1561-3054. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009
3. Ponce S, Arredondo R, López Y. La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. Gac Med Mex. 2015;151:681-9. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2015/gm155r.pdf>
4. Ruiz P., & Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. Rev Esp Quimioter. (2017). 30 (Suppl. 1): 8-12. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/30/suppl1/01ruiz.pdf>
5. Tierney A & Rather P. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. Future Microbiol. 2019; 14(6): 533–552. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6526388/>
6. Yang B, Liu C, Pan X, Fu W, Fan Z, Jin Y, et al. Identification of Novel phoP-phoQ Regulated Genes that Contribute to Polymyxin B Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. Microorganisms. 2021; 9(2): 344. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7916210/>
7. Bou G. Relación entre resistencia y virulencia en bacterias de interés clínico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014; 32(1):1–3. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X13003352>
8. OMS. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria [Internet]. Disponible en: https://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/ [Consultado el 15 de enero de 2020]
9. Barchiesi J, Castelli M, Venanzio G, Colombo M, García E. The PhoP/PhoQ System and Its Role in *Serratia marcescens* Pathogenesis. J Bacteriol. 2012; 194(11): 2949–2961. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3370626/>
10. Instituto Nacional de Salud. Infecciones asociadas a dispositivos [Internet].

Disponible en:

https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro_Infecciones%20asociadas%20a%20dispositivos.pdf#search=IAAS [Consultado el 15 de enero de 2020]

11. Boyd S, Vasudevan A, Moore L, Brewer C, Gilchrist M, Costelloe C, et al. Validating a prediction tool to determine the risk of nosocomial multidrug-resistant Gram-negative bacilli infection in critically ill patients: A retrospective case-control study. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020; 22: 826-831. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716520301855?via%3Dihub>
12. Angeletti S, Cella E, Prospero M, Spoto S, Fogolari M, Florio L, et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. *Microb. Pathog.* 2018; 123: 233-241. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401018306557?via%3Dihub>
13. Tummeler B. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000 Faculty Rev.* 2019; 8: 1371. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688719/>
14. Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Rev Esp Quimioter.* 2017; 30: 8-12. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/30/suppl1/01ruiz.pdf>
15. Wieland K, Chhatwal P, Vonberg R. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. *Am. J. Infect. Control.* 2018; 46: 643-648. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29398072/>
16. INS. Infecciones asociadas a dispositivos en UCI. [Internet]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/INFECCIONES%20ASOCIADAS%20A%20DISPOSITIVOS%20PE%20II%202021.pdf#search=pseudomonas%20infecciones>
17. Morales J, Andrade J. Risk factors associated with mortality and antibiotic susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Bol. Med. Hosp. Infant.* 2006; 63 (5): 1665-1146. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462006000500002#:~:text=La%20mortalidad%20asociada%20a%20bacteriemias,incidencia%20de%20infecciones%20por%20P.
18. Valderrama S, González PF, Caro MA, Ardila N, Ariza B, Gil F, et al. Factores de

- riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. *Biomédica*. 2016; 36 (1): 69-77. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2784>
19. Saavedra A, Duarte C, Nilse M, Realpe M. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomédica* 2014; 34 (1):217-23. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1685>
 20. Hernández A, Yague G, Vázquez E, Simon M, Moreno L, Canteras M. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Rev Esp Quimioter*. 2018 Apr; 31(2): 123–130. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159385/>
 21. Derakhshanab S, Hosseinzadehc A. Resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying virulence genes in hospitalized patients with urinary tract infection from Sanandaj, west of Iran. *Gene rep*. 2020; 20: 100675. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100675>
 22. Horcajada J, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32(4): e00031-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6730496/>
 23. Recio R, Mancheño M, Viedma E, Villa J, Orellana M, Lora J, et al. Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* and Impact of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64(2): e01759-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6985728/>
 24. Sharma A, Sangwan N, Negi V, Kohli P, Khurana J, Lakshmi D, et al. Pan-genome dynamics of *Pseudomonas* gene complements enriched across hexachlorocyclohexane dumpsite. *BMC Genomics*. 2015; 16(1): 313. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405911/>
 25. Orellana M, Pachecho N, Costa J, Mendez K, Miossec M, Meneses C. In-Depth Genomic and Phenotypic Characterization of the Antarctic Psychrotolerant Strain *Pseudomonas sp.* MPC6 Reveals Unique Metabolic Features, Plasticity, and Biotechnological Potential. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1154. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6543543/>

26. Lee C, Klockgether J, Fischer S, Trcek J, Tummler B, Romling R. Why? – Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C. FEMS Microbiol Rev. 2020 Nov; 44(6): 740–762. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7685784/>
27. Parkins M, Somayaji R, Waters V. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2018; 31(4): e00019-1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6148191/>
28. Schwartz D, Cantor C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984;37(1): 67-75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6373014/>
29. Jolley K, Bray J, Maiden M. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 2018; 3: 124. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6192448/>
30. Yan Y, Yao X, Li H, Zhou Z, Huang W, Stratton C, et al. A Novel *Pseudomonas aeruginosa* Strain with an oprD Mutation in Relation to a Nosocomial Respiratory Infection Outbreak in an Intensive Care Unit. J Clin Microbiol. 2014; 52(12): 4388–4390. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313324/>
31. Xu Y, Zheng X, Zeng W, Chen T, Liao W, Lin J, et al. Mechanisms of Heteroresistance and Resistance to Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Drug Resist. 2020; 13: 1419–1428. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7234976/>
32. Yoon E, Kim D, Lee H, Sun H, Hwan J, Soo Y, et al. Mortality dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections and the influence of defective OprD on mortality: prospective observational study. J Antimicrob Chemother. 2019; 74(9): 2774-2783. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31236593/>
33. Balasubramanian D, Kumari H, Mathee K. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR: an acute–chronic switch regulator. Pathog Dis. 2015 Mar; 73(2): 1–14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542883/>
34. Khatua B, Van J, Pronab B, Chaudhry R, Mandal C. Sialylation of Outer Membrane Porin Protein D: A Mechanistic Basis of Antibiotic Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Cell Proteomics. 2014; 13(6): 1412–1428. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047463/>
35. Tsutsumi Y, Tomita H, Tanimoto K. Identification of Novel Genes Responsible for

- Overexpression of ampC in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(12): 5987–5993. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837884/>
36. Ho-Fung C, Krahn T, Gilmour C, Mullen E, Poole K. AmgRS-mediated envelope stress-inducible expression of the mexXY multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen.* 2015 Feb; 4(1): 121–135. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335980/>
37. Puja H, Bolard A, Nogués A, Plésiat, Jeannot K. The Efflux Pump MexXY/OprM Contributes to the Tolerance and Acquired Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Apr; 64(4): e02033-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7179290/>
38. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec; 44(12): 3322–3327. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90200/>
39. Poole K, Ho-Fung C, Gilmour C, Hao Y, Lam J. Polymyxin Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* Linked to the MexXY-OprM Multidrug Efflux System. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec; 59(12): 7276–7289. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649153/>
40. Nouri R, Ahangarzadeh M, Hasani A, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Braz J Microbiol.* 2016; 47(4): 925–930. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5052375/>
41. Feng X, Zhang Z, Li X, Song Y, Kang J, Yin D, et al. Mutations in *gyrB* play an important role in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 261–272. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6371945/>
42. Bruchmann S, Dötsch A, Nouri B, Chaberny I, Häussler S. Quantitative Contributions of Target Alteration and Decreased Drug Accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* Fluoroquinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Mar; 57(3): 1361–1368. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591863/>
43. Colombia. Resolución N° 008430 de 1993 por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. (Boletín oficial del Estado, 4 de octubre de 1993).

44. Vélez E. Bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa. En: Orjuela O, Gallejo CR. Bacteriología Aplicada. Manual de Procedimientos. Colombia: Kimpres; 2014. p 101-102.
45. Burguillos L. Resistencia antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa*: Situación epidemiológica en España y alternativas de tratamiento. [Pregrado]. Universidad Complutense; 2018. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/LAURA%20BRAVO-BURGUILLOS%20ROS.pdf>
46. Paz V, Mangwani S, Martínez A, Álvarez D, Solano S, Vázquez R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Rev. chil. infectol. 2019; 36 (2): 0716-1018. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180
47. Ruíz L. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. [Doctoral]. Universidad de Barcelona; 2017. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf
48. Ghadam P, Akhlaghi F, Abdi A. One-step purification and characterization of alginate lyase from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* with destructive activity on bacterial biofilm. Iran J Basic Med Sci. 2017; 20(5): 467–473. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5478773/>
49. Moradali M, Ghods S, Rehm B. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7: 39. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310132/>
50. Bedard E, Prevost M, Deziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. Microbiologyopen. 2016; 5(6): 937–956. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5221438/>
51. Conceição J, Pereira P, Damasceno F, Ribeiro C, Oliveira S, Tranches A. Ozone against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in contact lenses storage cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2019; 61: e23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6481249/>
52. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes Dis. 2019; 6(2): 109–119. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6545445/>

53. Liu T, Zhang Y, Wan Q. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among liver transplant recipients. *Infect Drug Resist.* 2018; 11: 2345–2356. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6247952/>
54. Tran M, Wibowo D, Rehm B. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(22): 8671. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698413/>
55. Malhotra S, Hayes D, Wozniak D. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32(3): e00138-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6589863/>
56. Mui T, Kretzschmar M, Bertrand X, Bootsma M. Tracking *Pseudomonas aeruginosa* transmissions due to environmental contamination after discharge in ICUs using mathematical models. *PLoS Comput Biol.* 2019; 15(8): e1006697. Disponible en: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1006697>
57. Bachtá K, Allen J, Cheung B, Chiu C, Hauser A. Systemic Infection Facilitates Transmission of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioRxiv.* 2019. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/765339v1.full>
58. Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter.* 2018; 31(1): 78–100. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159363/>
59. Raman G, Avendano E, Chan J, Merchant S, Puzniak L. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018; 7: 79. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032536/>
60. Behzadi P, Barath Z, Gajdacs M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10(1): 42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7823828/>
61. Carmine A, Gomes A, Melo F, Ardisson D, Castagna A, Lunkes V. Characterization of a bacteriophage with broad host range against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from domestic animal. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 134. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6580649/>
62. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 281. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5882822/>

63. Ruffin M, Brochiero E. Repair Process Impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in Epithelial Tissues: Major Features and Potential Therapeutic Avenues. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 182. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6554286/>
64. Elmouaden C, Laglaoui A, Ennane L, Bakkali M, Abid M. Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2019; 13(10):892-898. Disponible en: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/32084019>
65. Pejčića M, Stojanović-Radića Z, Genčić M, Dimitrijevića M, Radulovićb N. Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food Chem. Toxicol.* 2020; 141:111431. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111431>
66. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener J. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care.* 2014; 18(6): 668. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4331484/>
67. Wang C, Liu X, Wang J, Zhou J, Cui Z, Hui L. Design and characterization of a polyamine derivative inhibiting the expression of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2016; 6: 30949. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971474/>
68. Ullah W, Qasim M, Rahman H, Jie Y, Muhammad N. Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. *Chin Med J.* 2017; 80 (3): 173-177. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2016.08.011>
69. Schinner S, Engelhardt F, Preusse M, Gesine J, Tomasch J, Haussler S. Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* fitness during biofilm growth. *Biofilm.* 2020; 2: 100023. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100023>
70. Francis V, Stevenson E, Porter S. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2017; 364(11): fnx104. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5812489/>
71. Groisman E. The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *mBio.* 2001; 1835-1842. Disponible en: <https://jb.asm.org/content/183/6/1835>
72. Samantha A, Vrielink A. Lipid A Phosphoethanolamine Transferase: Regulation, Structure and Immune Response. *J. Mol. Biol.* 2020; 432 (18): 5184-5196. Disponible

- en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002228362030320X>
73. Raheem M, Xue M, Ahmad H, Ahmad M, Tipu M, Afzal G, et al. Adaptation to host specific bacterial pathogens drive rapid evolution of novel PhoP/PhoQ regulation pathway modulating the virulence. *Microb. Pathog.* 2020; 141: 103997. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103997>
74. Cao L, Wang J, Sun L, Kong Z, Wu Q, Wang Z, et al. Transcriptional analysis reveals the relativity of acid tolerance and antimicrobial peptide resistance of Salmonella. *Microb. Pathog.* 2019; 136: 103701. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103701>
75. Tsai M, Liang Y, Chen C, Chiu C. Characterization of Salmonella resistance to bile during biofilm formation. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020; 53 (4): 518-524. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.06.003>
76. Gunn J, Richards S. Recognition and Integration of Multiple Environmental Signals by the Bacterial Sensor Kinase PhoQ. *Cell Host Microbe.* 2007; 1 (3): 163-165. Disponible en: [https://www.cell.com/fulltext/S1931-3128\(07\)00075-3](https://www.cell.com/fulltext/S1931-3128(07)00075-3)
77. Prost L, Daley M, Sage V, Bader M, Moual H, Klevit R, et al. Activation of the Bacterial Sensor Kinase PhoQ by Acidic pH. *Mol. cell.* 2007; 26 (2): 165-174. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276507001530#:~:text=Summary,transcriptional%20program%20essential%20for%20virulence.&text=PhoQ%20also%20binds%20and%20is.sensor%20domain%20to%20pH%205.5>
78. Carabajal M, Asquith C, Laitinen T, Tizzard G, Yim L, Rial A, et al. Quinazoline Based Antivirulence Compounds Selectively Target Salmonella PhoP/PhoQ Signal Transduction System. *mBio.* 2020; 64 (1): e01744-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187569/>
79. Liu L, Zheng S. Transcriptional regulation of *Yersinia pestis* biofilm formation. *Microb. Pathog.* 2019; 131: 212-217. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.011>
80. Erickson D, Russel C, Johnson K, Hileman T, Steward R. PhoP and OxyR transcriptional regulators contribute to *Yersinia pestis* virulence and survival within *Galleria mellonella*. *Microb. Pathog.* 2011; 51 (6): 389-395. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.08.008>
81. Bozue J, Mou S, Moody K, Cote C, Trevino S, Fritz D, Worsham P. The role of the phoPQ operon in the pathogenesis of the fully virulent CO92 strain of *Yersinia pestis*

- and the IP32953 strain of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Pathog.* 2011; 50 (6): 314-321. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.02.005>
82. Lin Z, Cai X, Chen M, Ye L, Wu Y, Wang X, et al. Virulence and Stress Responses of *Shigella flexneri* Regulated by PhoP/PhoQ. *Front. Microbiol.* 2018; 8:2689. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5775216/>
83. Nakka S, Qi M, Zhao Y. The *Erwinia amylovora* PhoPQ system is involved in resistance to antimicrobial peptide and suppresses gene expression of two novel type III secretion systems. *Microbiol. Res.* 2010; 165 (8): 665-673. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501309001165?via%3Dihub>
84. Serra M. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev haban cienc méd.* 2017; 16 (3): 1729-519. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X2017000300011
85. ISGLOBAL. Los 4 frentes de batalla contra la resistencia a los antibióticos. [Internet]. Disponible en: <https://www.isglobal.org/informe-la-batalla-contra-las-resistencias> [Consultado el 30 de enero de 2020]
86. Pintilie L, Stefaniu A. In Silico Drug Design and Molecular Docking Studies of Some Quinolone Compound. *Molecular Docking and Molecular Dynamics*. 2019. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/molecular-docking-and-molecular-dynamics/-em-in-silico-em-drug-design-and-molecular-docking-studies-of-some-quinolone-compound>
87. Jeukens J, Freschi J, Kukavica-Ibrulj I, Emond J, Tucker N & Levesque R. Genomics of antibiotic-resistance prediction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann N Y Acad Sci.* 2019; 1435(1): 5–17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7379567/>
88. Soukarieh F, Vico E, Dubern J, Gomes J, Halliday N, Crespo M, et al. *In Silico* and *in Vitro*-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules.* 2018; 23(2): 257. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017655/>
89. Solanki V, Tiwari M & Tiwari V. Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2019; 9: 5240. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6437148/>
90. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Disponible en:
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=blastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp
91. MEGA. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/>
92. Khan S. Árboles filogenéticos. [Internet]. Khan Academy. 2016. [citado 20 de mayo del 2021]. Disponible en:
<https://es.khanacademy.org/science/high-schoolbiology/hs-evolution/hs-phylogeny/a/phylogenetic-trees>
93. Martínez-Lage, A y González-Tizón, A. Aplicaciones de la bioinformática en la elaboración de filogenias moleculares. 2004. Fundación Alfredo Brañas. 53-81. Disponible en:
<https://www.udc.es/grupos/gibe/uploads/gibe/andres%20ana/filogenias.pdf>
94. Nei M & Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. 1 ed. New York: Oxford University Press: 2000.
95. Protparam tool. Disponible en: <https://web.expasy.org/protparam/>
96. PROSITE Database of protein domains, families and functional sites. Disponible en: <https://prosite.expasy.org/>
97. SWISS-MODEL. Disponible en: <https://swissmodel.expasy.org/>
98. PSIPRED. Disponible en: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
99. GOR IV. Disponible en:
https://npsaprab.iibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html
100. Protein Structure Analysis Web. Disponible en:
<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>
101. Jochumsen N, Marvig R, Damkjaer S, Lyngkjaer R, Paulander W, Molin S, et al. The evolution of antimicrobial peptide resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is shaped by strong epistatic interactions. Nat. Commun. 2016; 7: 13002. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/ncomms13002>
102. Barrow K, Know D. Alterations in Two-Component Regulatory Systems of phoPQ and pmrAB Are Associated with Polymyxin B Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 2020; 53 (12). Disponible en:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00893-09>

103. Meng L, Liu H, Lan T, Dong L, Hu H, Zhao S, et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas spp.* Isolated From Raw Milk Revealed by Whole Genome Sequencing. *Front. Microbiol.* 2020; 11:1005. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01005/full>
104. Gutu A, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon M, Jacobs M, Haugen E, et al. Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ Mutants Is Dependent on Additional Two-Component Regulatory Systems. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 57 (5). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02353-12?permanently=true>
105. Gooderham J, Hancock R. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews.* 2009; 33 (2): 279-294. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/33/2/279/588178>
106. Olaitan A, Morand S, Rolain J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 2014; 5:643. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00643/full>
107. Miller A, Brannon M, Stevens L, Krogh H, Selgrade S, Miller S, et al. PhoQ Mutations Promote Lipid A Modification and Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Found in Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12): 5761–5769. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232818/>
108. Molina L, Udaondo Z, Duque E, Fernández M, Molina M, Roca A, et al. Antibiotic Resistance Determinants in a *Pseudomonas putida* Strain Isolated from a Hospital. *PloS one.* 2014. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081604>
109. Macfarlane E, Kwasnicka A, Ochs M, Hancock R. PhoP–PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* 2002; 34 (2): 305-316. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.1999.01600.x>
110. Francis V, Stevenson E, Porter S. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2017; 364(11): fnx104. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5812489/>
111. McPhee K, Lewenza S, Hancock R. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.*

- Microbiol. 2003; 50 (1): 205-217. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x>
112. McPhee J, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Brazas M, Brinkman F, et al. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg²⁺-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2006; 188(11): 3995–4006. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1482896/>
113. Olaitan A, Morand S, Rolain J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front. Microbiol. 2014; 5:643. Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00643/full>
114. Prost L, Daley M, Bader M, Klevit Miller S. The PhoQ Histidine Kinases of *Salmonella* and *Pseudomonas spp.* are Structurally and Functionally Different: Evidence that pH and Antimicrobial Peptide Sensing Contribute to Mammalian Pathogenesis. Mol Microbiol. 2008; 69(2): 503–519. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2555970/>
115. Gunn J. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. Trends Microbiol. 2008; 16 (6): 284-290. Disponible en: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.007>
116. Gellatly S. Regulation of the PhoQ-PhoP two-component system in *Pseudomonas aeruginosa* and its role in virulence. [Doctoral]. University of Victoria; 2012.
117. Brinkman F, MacFarlane E, Warrener P, Hancock R. Evolutionary Relationships among Virulence-Associated Histidine Kinases. Infect Immun. 2001; 69(8): 5207–5211. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98623/>
118. Molnar K, Bonomi M, Pellarin R, Clinthorne G, Gonzalez G, Goldberg S, et al. Cys-scanning Disulfide crosslinking and Bayesian modeling probe the transmembrane signaling mechanism of the histidine kinase, PhoQ. Structure. 2014; 22(9): 1239–1251. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322757/>
119. Lesley J, Waldburger C. Comparison of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* PhoQ Sensor Domains. J. Biol. Chem. 2001; 276 (33): P30827-30833. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)80227-/fulltext#fig1](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)80227-/fulltext#fig1)
120. Matamouros S, Hager K, Miller S. HAMP Domain Rotation and Tilting Movements Associated with Signal Transduction in the PhoQ Sensor Kinase. mBio. 2015; 6(3): e00616. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4447245/>

121. Stock A, Robinson V, Goudreau P. Two-Component Signal Transduction. *Biochemistry*. 2000; 69:183-215. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
122. Velikova N, Fulle S, Manso A, Mechkarska M, Finn P, Conlon J, et al. Putative histidine kinase inhibitors with antibacterial effect against multi-drug resistant clinical isolates identified by in vitro and in silico screens. *Sci Rep*. 2016; 6: 26085. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865847/>
123. Viarengo G. Identificación y caracterización de compuestos antibacterianos a partir de productos naturales o semisintéticos. [Doctoral]. Universidad Nacional del Litoral; 2015.
124. Cheung J, Hendrickson W. Sensor Domains of Two-Component Regulatory Systems. *Curr Opin Microbiol*. 2010; 13(2): 116–123. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3078554/>
125. Ahmad A, Fadel F, Kreuzer C, Ba M, Pélissier G, Bornet O, et al. Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2017; 7: 11262. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5595915/>