



Caracterización molecular y bioquímica de la enzima Cisteína Sintasa en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, marzo 2020

Caracterización molecular y bioquímica de la enzima Cisteína Sintasa en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.

Farfán Gómez Laura Nicole

Molina Serna Karen Tatiana

Asesora interna:

Ibeth Cristina Romero Calderón

Bacterióloga, MSc. PhD.



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, marzo 2020



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

BOGOTA D.C

MARZO 2020

Caracterización molecular y bioquímica de la enzima Cisteína Sintasa en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.

JURADOS: Johana Marcela Moscoso Gama

Liliana Constanza Muñoz Molina

## Tabla de contenido

	<b>Pág.</b>
Resumen .....	13
Introducción .....	15
1. Objetivos .....	17
1.1 Objetivo general	
1.2 Objetivos específicos	
2. Antecedentes .....	18
3. Marco teórico .....	21
4. Diseño metodológico .....	32
5. Resultados .....	36
6. Discusión .....	53
7. Conclusiones .....	56
8. Referencias bibliográficas .....	57

## **Dedicatoria**

Esta tesis si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que nos acompañaron en el recorrido laborioso de este trabajo, principalmente a nuestra tutora y maestra Ibeth Cristina Romero la cual ha sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación, que con su amplia experiencia y conocimientos nos orientó al correcto desarrollo y culminación con éxito este trabajo para la obtención de nuestro título como bacteriólogas y laboratoristas clínicas, de la misma manera agradecer a nuestras familias que nos apoyan en cada una de nuestras decisiones y son motores de todos nuestros proyectos; por último y no menos importante a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, docentes y administrativos por dejarnos hacer parte de su academia y dejarnos formar como profesionales y personas.

Mil veces gracias.

## Lista de tablas

Pág.

Tabla No. 1 Características generales para las enzimas CS, CYSA y CYSB .....	40
Tabla No. 2 Composición aminoacídica de las enzimas CS, CYSA y CYSB .....	41

## Lista de figuras

	Pág.
Fig. 1 Características microscópicas y macroscópicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
Fig. 2 Porcentajes de resistencia a carbapenemicos, piperacilina / tazobactam, amikacina, fluoroquinolonas y ceftazidima entre GNB y <i>Pseudomonas spp.</i> .....	24
Fig. 3 Mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos en <i>P. aeruginosa</i> .....	26
Fig. 4 Mecanismos de transferencia horizontal de genes en <i>P. aeruginosa</i> .....	26
Fig. 5 Mecanismos de resistencia a antibióticos mediada por biopelículas. ....	27
Fig. 6 Vías biosintéticas de cisteína .....	29
Fig. 7 Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de Cisteína Sintasa de <i>P. aeruginosa</i> .....	37
Fig. 8. Mapas de ubicación de los genes que codifican para CS dentro del genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	38
Fig. 9 Marcos de lectura abiertos de gen que codifica Cisteína Sintasa (CS) en <i>P. aeruginosa</i> .....	39
Fig. 10 Herramienta ScanProsite. Dominios típicos para CYSA y CYSB. ....	43
Fig. 11 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de CS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otros organismos representativos. ....	44

Fig. 12	Árbol filogenético de secuencias de proteínas del gen que codifica para CS en <i>P. aeruginosa</i> con relación a otros microorganismos .....	47
Fig. 13	Método de predicción de estructura secundaria GOR IV .....	48
Fig. 14	Modelo cristalográfico de la enzima Cisteína sintasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	49
Fig. 15	Validación del modelo mediante ProSA-web. Gráfica z-score. ....	51
Fig. 16	Gráfico de Ramachandran mediante servidor PROCHECK.CS, CYSA y CYSB .....	52

## Lista de abreviaturas

CBS	Cistationina-beta Sintasa
CDC	Centro de Control para la Prevención de Enfermedades
CDI	Contact-dependent growth inhibition (Inhibición del crecimiento dependiente de contacto)
CS	Cisteína Sintasa
CYS	Cysteine Synthase (Cisteína Sintasa)
DALY's	Disability adjusted life year. (Años de vida ajustados por discapacidad)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control. (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HO <sub>2</sub> O	Peroxido de Hidrogeno
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud
IBEAS	Estudio sobre la seguridad de los pacientes en hospitales de Latinoamérica
MDR	Multidrogoresistencia
MW	Tamaño

OAS	O-Acetilserina
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Open reading frame (Marco de lectura abierto)
PA01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 01
PDB	Protein Data Bank
PI	Punto isoeléctrico
PLP	Piridoxal fosfato
RAM	Resistencia antimicrobiana
SAT	Serina-Acetiltransferasa
SIB	Instituto de Bioinformática Suizo
UCI	Unidad de cuidados intensivos
XDR	Extremadamente resistente

**Caracterización molecular y bioquímica de la enzima Cisteína Sintasa en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.**

**Resumen:**

*Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria que causa infecciones asociadas a la atención en salud y representa un problema de salud pública, por su capacidad de generar resistencia a los medicamentos usados en el tratamiento convencional, es por esto que se requiere del estudio de nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas terapias. En este sentido, la enzima Cisteína Sintasa (CS) reviste gran interés debido a que no se encuentra en el humano, cumple un papel importante en la supervivencia de algunos microorganismos frente al estrés oxidativo y ha sido asociada a fenotipos de resistencia a medicamentos. En el presente proyecto, se caracterizó *in silico* la enzima CS en *P. aeruginosa*; usando herramientas bioinformáticas se identificaron 3 posibles isoformas de la enzima, de las cuales sólo dos (CysA y CysB) presentaron todos los dominios característicos de la familia de proteínas CS; los modelos tridimensionales de las 3 isoformas predichos mediante I-TASSER mostraron una alta calidad y confiabilidad para poder ser usados en estudios posteriores. Por otro lado, los análisis filogenéticos y de comparación de secuencias aminoacídicas permitieron establecer que las enzimas CS en esta bacteria difieren significativamente con la enzima ortóloga más cercana en el humano la Cistationina Beta Sintasa (CBS). Los resultados obtenidos en este estudio servirán de base para la validación funcional de CS como posible blanco terapéutico en *P. aeruginosa* y la búsqueda de inhibidores específicos contra esta enzima que permitan desarrollar una terapia alternativa y selectiva contra las infecciones producidas por esa bacteria.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, cisteína sintasa, enzima, blancos de acción, terapia selectiva, patógenos, multirresistentes.

## **Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa*, is a bacterium that causes infections associated with health care and represents a public health problem, due to its ability to generate resistance to drugs used in conventional treatment, which is why it is necessary to study new therapeutic targets for the development of new therapies. In this sense, the enzyme Cysteine Synthase (CS) is of great interest because it is not found in humans, it plays an important role in the survival of some microorganisms against oxidative stress and has been associated with phenotypes of drug resistance. In the present project, the CS enzyme in *P. aeruginosa* was characterized in silico; Using bioinformatic tools, 3 possible isoforms of the enzyme were identified, of which only two (CysA and CysB), all the characteristic domains of the CS protein family; The three-dimensional models of the 3 isoforms predicted using I-TASSER protocols have a high quality and reliability to be used in subsequent studies. On the other hand, phylogenetic analysis and comparison of amino acid sequences allowed to establish the CS enzymes in this bacterium differ significantly with the closest orthologous enzyme in human cystathionine beta synthase (CBS). The results obtained in this study will serve as a basis for the functional validation of CS as a possible therapeutic target in *P. aeruginosa* and the search for specific inhibitors against this enzyme that develops an alternative and selective therapy against infections caused by this bacterium.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, cysteine synthase, enzyme, action targets, selective therapy, pathogens, multiresistance.

## Introducción

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, considerada un saprófito ambiental, con alta versatilidad metabólica y plasticidad genómica que le permite colonizar y adaptarse a una gran diversidad de nichos ecológicos, incluyendo ambientes acuáticos, terrestres, plantas, animales e incluso superficies en instalaciones hospitalarias <sup>1</sup>. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista implicado en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) o intrahospitalarias provocando altas tasas de morbimortalidad en la población a nivel mundial <sup>2</sup>. Las infecciones más comunes producidas por éste patógeno se presentan a nivel del sistema respiratorio, sistema urinario y en piel, afectando especialmente a pacientes con compromiso del sistema inmune y/o pacientes que ingresan a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) <sup>3</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa* presenta un repertorio notable de factores de virulencia como por ejemplo la formación de biopelículas sobre superficies vivas como el cuerpo humano o superficies inertes, como algunos equipos médicos, entre los que se destacan tubos endotraqueales, sondas y catéteres <sup>4</sup>. Así mismo, su capacidad sobresaliente para evadir la actividad de los tratamientos antimicrobianos, generando altas tasas de resistencia a los antibióticos usados convencionalmente <sup>5</sup>, contribuyen sinérgicamente a la patogénesis de esta bacteria, haciendo de *P. aeruginosa* uno de los patógenos bacterianos multidrogoresistentes (MDR), más temidos en el entorno clínico a nivel mundial <sup>6</sup>.

Según el Centro de Control para la Prevención de Enfermedades (CDC) de es Estados Unidos, la bacteria es el cuarto patógeno nosocomial más frecuentemente aislado, ya que representa el 10,1% de todas las infecciones adquiridas en el hospital <sup>7</sup>. Además, *Pseudomonas aeruginosa* es responsable del 17% de las neumonías asociadas a asistencia respiratoria mecánica, 11% de infecciones del tracto urinario y 3.8% de bacteriemias primarias en las unidades de cuidados intensivos de adultos. Por otro lado, en las unidades de pacientes quemados, *P. aeruginosa* ha sido asociada al 21.5% de las neumonías, al 20% de las infecciones urinarias y al 9% de las bacteriemias primarias <sup>8</sup>. Así mismo, *P. aeruginosa* es el Gram negativo más frecuentemente aislado (27%) en cultivos a partir de Traqueotomías <sup>8</sup>. En los últimos años, la proporción de *P. aeruginosa* con fenotipos resistentes ha aumentado de manera preocupante en todo el mundo, por ejemplo, la prevalencia de cepas MDR ha sido estimada entre 14-40% y de cepas extensivamente resistentes (XDR, por sus siglas en inglés) es del 13% <sup>9</sup>.

Lo anterior, sustenta la necesidad de encontrar nuevos blancos terapéuticos en patógenos como *P. aeruginosa*, para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que permitan controlar efectivamente las infecciones causadas por ese tipo de patógenos; en este sentido, nuestro proyecto de investigación propone una estrategia innovadora, orientada a la caracterización de la enzima CS de *P. aeruginosa*, como posible blanco terapéutico que permita la búsqueda racional de inhibidores específicos contra esta enzima y a futuro el desarrollo de una terapia selectiva para el control de las infecciones ocasionadas por este patógeno.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente proyecto pretendemos responder a la pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características moleculares y bioquímicas de Cisteína Sintasa en *Pseudomonas aeruginosa* que permiten proponer a esta enzima como blanco terapéutico?

## 1. Objetivos

## **1.1 Objetivo general**

Caracterizar molecular y bioquímicamente la enzima Cisteína Sintasa de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis *in silico*, como posible blanco terapéutico en este patógeno.

## **1.2 Objetivos específicos**

1. Identificar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la enzima Cisteína Sintasa (CS) en *P. aeruginosa* y establecer la similitud que tiene con ortólogos.
2. Determinar la secuencia y características moleculares de la proteína CS de *P. aeruginosa*, mediante herramientas bioinformáticas.
3. Analizar filogenéticamente las secuencias proteicas de CS en *P. aeruginosa* y establecer su evolución con respecto a las ortólogas presentes en otros organismos.
4. Predecir la estructura tridimensional de la proteína CS de *P. aeruginosa*, identificando los dominios y motivos de unión al sustrato natural.

## 2. Antecedentes

En las últimas décadas, los avances en el campo de la biología, la bioquímica y la genética de los microorganismos patógenos han sido significativos. Esos avances han permitido identificar moléculas específicas de los patógenos en vías metabólicas que están ausentes o difieren de aquellas que se encuentran en el huésped mamífero, las cuales están implicadas en la supervivencia, patogénesis y resistencia a fármacos. En este sentido, la vía de síntesis de cisteína y en especial la enzima Cisteína Sintasa ha surgido como un buen blanco terapéutico en algunos patógenos humanos, debido al papel central que tiene en la biosíntesis de cisteína por la *vía de novo*, para microorganismos como bacterias y algunos protozoarios de interés médico.

En bacterias como *E. coli* y *Providencia stuartii*, estudios de Christophe et. al y Sturgill et. al .han demostrado que la síntesis de OAS por medio de la *cysE* (secuencial y funcionalmente homóloga a la familia O-acetilserina), parece regular positivamente la formación de biopelículas; en estos organismos se ha evidenciado que mutaciones en *cysE* mejoran la formación de ellas y causan una mayor producción de biomasa <sup>10,11</sup> en comparación con cepas de tipo salvaje que no poseen esta enzima, lo que sugiere que esta cumple un papel fisiológico importante para la generación de esta señal extracelular <sup>11</sup>. En el caso de *Vibrio fischeri*, estudios realizados por Singh et.al, describieron que las mutaciones de la enzima *cysK* en la vía sintética CS interfieren con la formación de biopelículas, lo que confirma la importancia de esta en este tipo de procesos patógenos<sup>12</sup>. Diner et. al menciona que en *Escherichia coli* uropatógena, las células CDI producen una proteína de inmunidad que se une al CdiA-CT y bloquea su actividad para prevenir la autoinhibición, acción que requiere activación mediada por la enzima biosintética CysK. CysK y CdiA-CT forman un complejo estable, y su interacción de unión parece imitar la del complejo de cisteína sintasa CysK/CysE <sup>13</sup>. La activación de CdiA-CT mediada por CysE, también es necesaria para la inhibición del crecimiento, por lo tanto, CysK actúa como un factor permisivo

para CDI, proporcionando un mecanismo potencial para modular la inhibición del crecimiento en las células objetivo <sup>13,14</sup>.

Por otro lado, Turnbull & Surette han estudiado ciertas propiedades enzimáticas y químicas de Cisteína Sintasa, así como el metabolismo de L-Cisteína en *Salmonella typhimurium* <sup>15</sup>; se ha relacionado con la resistencia a los antibióticos en esta bacteria, debido a que la cisteína está ampliamente relacionada con el estrés oxidativo y se ha demostrado que las propiedades antioxidantes de la cisteína o los metabolitos derivados de la cisteína, contribuyen a la resistencia a los antibióticos en las cepas que expresan el gen CysB para la síntesis de Cisteína.<sup>16,17</sup>. Igualmente, estudios recientes de Ågren et. al demostraron que en bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* la cisteína es un aminoácido importante en la defensa redox, porque constituye el componente básico del mycothiol, una molécula tiol que hace parte de la defensa contra oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en esta bacteria, en donde además se han caracterizado tres isoformas de CS, la CysK, CysM y CysE, involucradas en la síntesis de cisteína <sup>18</sup>. Adicionalmente, estudios genéticos realizados por Brunner et. al, han indicado que la isoforma CysM es la que asegura la biosíntesis de cisteína en *M. tuberculosis* bajo estrés oxidativo aumentando su supervivencia dentro de los macrófagos alveolares del huésped <sup>18,19</sup>.

CysM no solo ha sido asociada a la supervivencia frente al estrés oxidativo sino también al estrés metabólico como sucede en *S. aureus* donde James et. al y Campanini et. al han determinado que la disminución o anulación del gen mediante knockout <sup>20</sup> causó una mayor sensibilidad de la bacteria al telurito, peróxido de hidrógeno, ácido y diamida e igualmente, también redujo significativamente la capacidad de *S. aureus* para recuperarse del estrés metabólico al cual fue expuesta la bacteria <sup>21</sup>. Debido a esta importancia, estudios como los de Becker et. al han empezado a explorar esta enzima como un blanco para nuevas terapias antimicrobianas <sup>17</sup>.

En parásitos, la CS ha sido estudiada por Romero et. al como posible blanco terapéutico, en protozoos como *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, se demostró que la expresión y actividad de CS es importante para la supervivencia de esos parásitos frente al estrés oxidativo<sup>22</sup>; En *T. cruzi* y *L. braziliensis*, la expresión y actividad de CS se encontró aumentada principalmente en los amastigotes (forma intracelular que se encuentra dentro del macrófago humano) contrario a *T. rangeli* que no posee actividad de CS haciendo que el parásito sea más vulnerable a la acción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) durante el estrés oxidativo en el macrófago<sup>22</sup>. Igualmente, Romero et. al ha comprobado que el aumento en la expresión y actividad de CS en *L. braziliensis*, causa el incremento en la resistencia a los compuestos antimoniales, medicamentos que hacen parte del tratamiento convencional en la leishmaniasis<sup>23,24</sup>. Téllez et. al ha demostrado que en *Leishmania donovani* la sobreexpresión de CS dota a este parásito con una eficiente maquinaria de desintoxicación redox dependiente de proteínas tiol; culminando en una alta resistencia a los fármacos<sup>24</sup>.

Finalmente, Gillin & Diamond, han estudiado que en *Entamoeba histolytica* la CS ha estado implicada en varios procesos biológicos importantes, incluidos la motilidad, la proliferación y la defensa antioxidante<sup>25</sup>, siendo esencial para la supervivencia del parásito. Algunos estudios realizados por Fahey et. al y Nagpal et. al, mediante análisis *in silico* han descubierto algunos inhibidores específicos de CS, que prometen ser excelentes candidatos para el desarrollo de una terapia selectiva contra este parásito<sup>26,27</sup>.

### 3. Marco teórico

#### 3.1. *Pseudomonas aeruginosa* (generalidades)

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo que mide de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo <sup>28</sup> con un único flagelo polar no formador de esporas (Figura 1A), produce pigmentos típicos de la especie como piocianina (verde-azul) y fluorescencia de porrubina (amarillo-verde) (Figura 1B), es anaerobio facultativo, metabólicamente es no fermentativo y oxidasa positiva <sup>29</sup>.

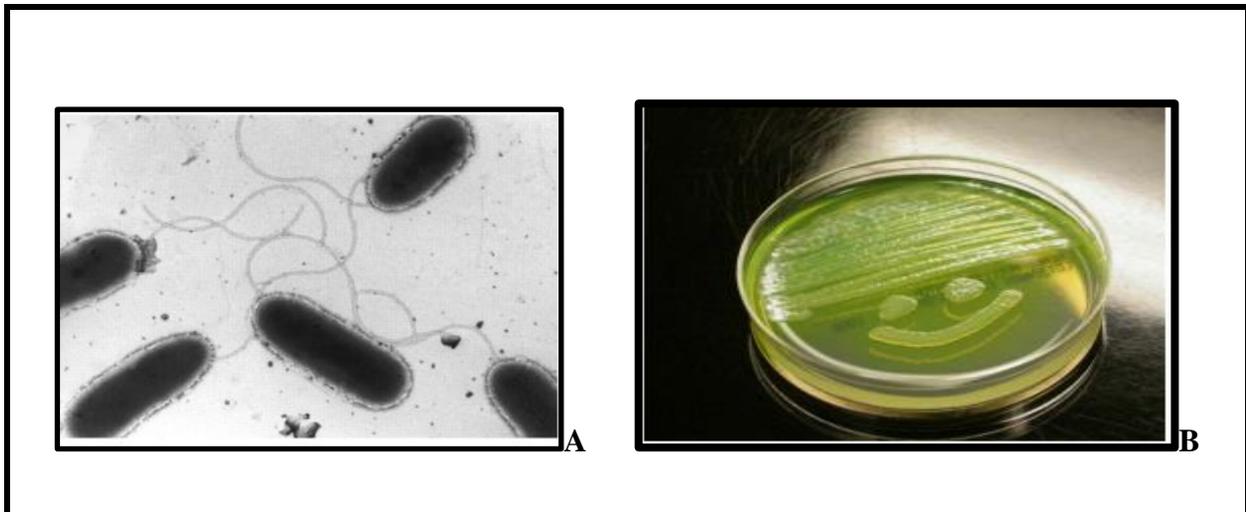


Figura 1. Características microscópicas y macroscópicas de *Pseudomonas aeruginosa*. A. Electromicrografía de *P. aeruginosa* en la que se aprecia el flagelo polar <sup>30</sup>. B. Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimide <sup>31</sup>.

*P. aeruginosa* presenta una notable versatilidad metabólica debido a su gran genoma (5–7 Mbp), lo cual le permite vivir en diversos ambientes, desde el suelo hasta el agua, en plantas, animales,

en humanos e incluso superficies inertes a nivel hospitalario <sup>28</sup>; pese a que la temperatura óptima para el crecimiento de ésta bacteria es de 37 °C, esta bacteria tiene la capacidad de crecer a temperaturas mayores como 42 °C<sup>45</sup> y puede crecer bien en un medio que contiene acetato (como fuente de carbono) y sulfato de amonio (como fuente de nitrógeno) <sup>32</sup>.

*P. aeruginosa* es considerada un patógeno oportunista para el humano, esta bacteria puede producir una gran variedad de factores de virulencia como toxinas extracelulares, incluidas la exotoxina A y las enterotoxinas, también pueden producir sustancias como el ácido hidrocianico, enzimas proteolíticas, limo superficial tóxico y sustancias hemolíticas, de igual forma, tiene la capacidad de genera biopelículas, unidas a alguna superficie vivas como el cuerpo humano o superficies inertes, como algunos equipos médicos, entre los que se destacan tubos endotraqueales, sondas y catéteres que contribuyen a la patogenicidad de esta especie y hacen de éste patógeno uno de los más temidos en el ambiente hospitalario <sup>33,34</sup>.

### **3.2. Infecciones asociadas a la atención en salud causadas por *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* se ha convertido en un patógeno oportunista emergente en las clínicas y según estudios epidemiológicos esta bacteria es responsable del 10-15% de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) <sup>35,36</sup>. Las IAAS son adquiridas en instituciones tanto hospitalarias como ambulatorias y según la OMS, son el evento adverso más frecuente durante la atención médica, representan más del 90% de las infecciones, posicionándose como la octava causa de muerte a nivel mundial <sup>37</sup>; sumado a esto, las IAAS, representan altos costos para las entidades de salud e impactan en las condiciones de vida individual y familiar de los pacientes que las adquieren <sup>38</sup>.

*P. aeruginosa* ha sido asociada a diferentes tipos de infecciones que pueden aparecer en muchos sitios anatómicos, entre ellos, la piel, los tejidos subcutáneos, el hueso, los oídos, los ojos, las vías urinarias, los pulmones y las válvulas cardíacas <sup>39</sup>. El sitio afectado varía según la puerta de entrada y la susceptibilidad del paciente. En pacientes internados en el hospital, el primer signo puede ser una septicemia abrumadora por gramnegativos <sup>39</sup>. La infección se presenta principalmente en pacientes hospitalizados con cáncer, fibrosis quística y quemadura con una mortalidad asociada a la infección con este patógeno del 50% <sup>40</sup>.

### **3.3. Tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa***

Los carbapenémicos son una terapia de primera línea para las y infecciones importantes causadas por *P. aeruginosa* <sup>40</sup>. Hasta hace unos años, los carbapenémicos tenían una excelente utilidad clínica para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, debido a su potente actividad contra este microorganismo, pero este ha desarrollado mecanismos de resistencia después de una exposición incesante a carbapenémicos y otras clases de agentes antimicrobianos, y la resistencia de este tipo de patógenos a los carbapenémicos aumentó en consecuencia <sup>41</sup> con respecto al resto de bacterias Gram negativas (Fig 2) comprobado en un estudio realizado <sup>45</sup>. A medida que más cepas de *P. aeruginosa* han adquirido una gran resistencia a carbapenémicos, los médicos han considerado el uso de agentes alternativos, como las polimixinas B y E (colistina) y la tigeciclina. Sin embargo, el uso de colistina está limitado por su perfil de toxicidad, y la tigeciclina tiene una eficacia limitada en uso clínico <sup>42</sup>. Además, la tigeciclina está inactiva contra *P. aeruginosa*.

La elevada prevalencia de resistencias de este patógeno, unida a la reducción de la mortalidad asociada al tratamiento antibiótico adecuado y precoz, sobre todo en el paciente grave, justifica

el inicio del tratamiento con terapia combinada durante los 3-5 primeros días, hasta conocer los resultados de microbiología. Si la evolución clínica es favorable, es conveniente pasar a monoterapia tras conocer el patrón de resistencias con uno de los antibióticos a los que sea sensible, eligiendo para ello el de mayor penetración en el tejido infectado, mejor perfil de seguridad y menor coste. En caso de que tras 3-5 días de terapia combinada la evolución de la infección no sea favorable, parece recomendable seguir con tratamiento combinado, además de descartar otras causas de la tórpida evolución (sobreinfección, metástasis a distancia, etc<sup>43</sup>. El desarrollo de nuevos antibióticos o estrategias terapéuticas alternativas para el tratamiento de *P. aeruginosa* se requieren urgentemente. Nuevos antibióticos con modos novedosos de acción se han explorado en los últimos años, al igual que nuevas rutas de administración y resistencia a la modificación por enzimas bacterianas <sup>44</sup>.

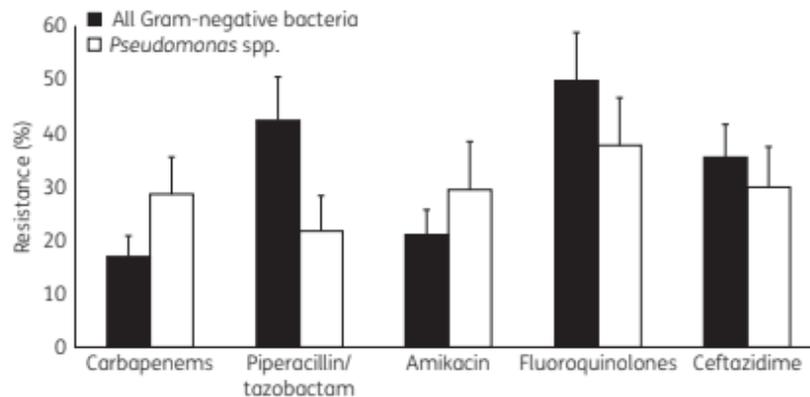


Figura 2. Porcentajes de resistencia a carbapenemicos, piperacilina / tazobactam, amikacina, fluoroquinolonas y ceftazidima entre bacterias Gram negativas y *Pseudomonas spp.* (expresado como porcentaje de todos los aislamientos de *Pseudomonas*).<sup>45</sup>

### 3.4. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*

Las infecciones por *P. aeruginosa* son notoriamente difíciles de tratar debido a su versatilidad genómica y su capacidad para resistir y adquirir la resistencia a muchas clases de antibióticos. Todos los mecanismos conocidos de resistencia a los antibióticos pueden ser mostrados por esta bacteria (intrínseca, adquirida y adaptativa); a veces todos dentro de una misma cepa. Las tasas de resistencia están en aumento a pesar del uso de terapias farmacológicas combinadas <sup>46</sup>. La publicación del genoma de *P. aeruginosa* ha ayudado enormemente al conocimiento de este microorganismo y por lo tanto, de sus mecanismos de resistencia <sup>47</sup>. En general, los principales mecanismos de *P. aeruginosa* utilizado para contrarrestar el ataque antibiótico se puede clasificar en resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa.

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* incluye baja permeabilidad de la membrana externa la cual no permite que algunos antibióticos penetren al interior de la bacteria, impidiendo que este cumpla su objetivo, de igual manera, la expresión de bombas de salida que expulsan los antibióticos fuera de la célula por medio de transportadores de membrana citoplasmática, proteínas de enlace periplásmicas y proteínas del canal de porina de la membrana externa <sup>48</sup> y por último la producción de enzimas como las B-Lactamasas, las cuales son inactivadoras de antibióticos y descomponen o modifican los antibióticos <sup>48</sup> terminando en la inhibición de la acción de los antibióticos con este fundamento. Todos estos mecanismos comúnmente utilizados en bacterias Gram negativas y principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* como se observa en la figura 3. <sup>48</sup>

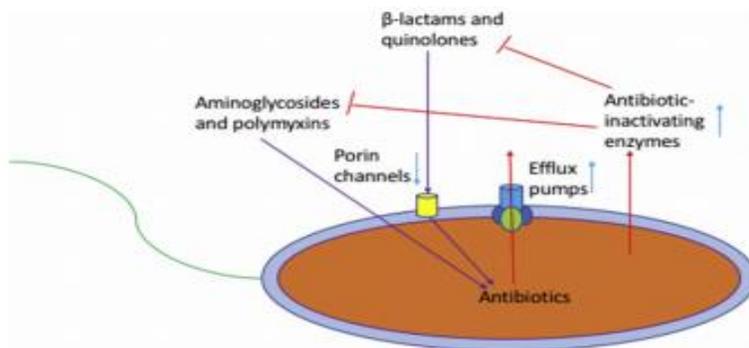


Figura 3. Esquema de los mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos en *P. aeruginosa*.<sup>48</sup>

La resistencia adquirida de *P. aeruginosa* puede ser lograda por transferencia horizontal de genes de resistencia o mutacionales cambios<sup>48</sup>. Los genes de resistencia a los antibióticos pueden transportarse en plásmidos, transposones, integrones y profágicos, y las bacterias pueden adquirir estos genes a través de la transferencia horizontal de genes de la misma o diferentes especies bacterianas<sup>47</sup>. Los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes implican transformación, transducción y conjugación como se muestra en la Figura 4.<sup>48</sup>

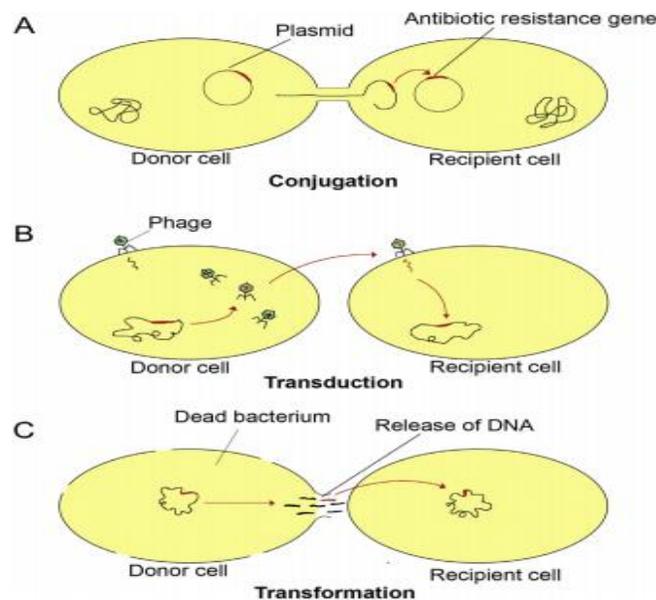


Figura 4. Mecanismos de transferencia horizontal de genes en *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>48</sup>

La resistencia adaptativa de *P. aeruginosa* implica la formación de biopelículas en los pulmones de pacientes infectados donde la biopelícula sirve como barrera de difusión para limitar el acceso a antibióticos a las células bacterianas<sup>49</sup>. Además, tolerantes a múltiples fármacos las células persistentes que pueden sobrevivir al ataque antibiótico pueden formarse en el biofilm.<sup>50</sup> Los

mecanismos generales de resistencia mediada por biopelículas que protegen a las bacterias del ataque de antibióticos implican la prevención de la penetración de antibióticos, el microambiente alterado que induce el crecimiento lento de las células de biofilm, la inducción de una respuesta adaptativa al estrés y la diferenciación celular <sup>48</sup> persistente como se muestra en la figura 5.

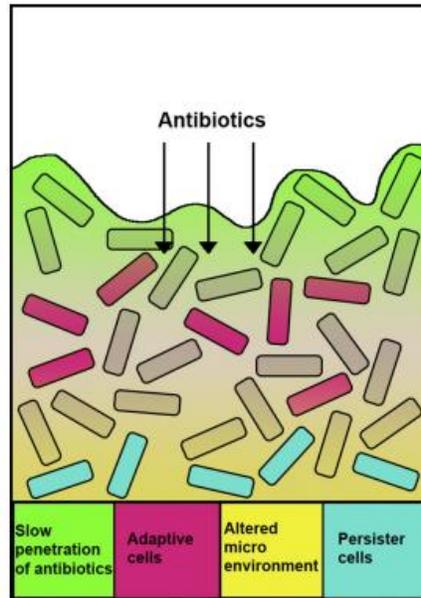


Figura 5. Mecanismos de resistencia a antibióticos mediada por biopelículas. Los antibióticos penetran lentamente en la biopelícula (verde); Algunas células de biofilm expresan una respuesta adaptativa al estrés que permite la supervivencia en condiciones adversas (rosa); El microambiente químico alterado (amarillo) dentro de la biopelícula induce un crecimiento lento de bacterias, lo que reduce la absorción de antibióticos; Se forman células persistentes tolerantes a múltiples fármacos (azul). <sup>48</sup>

### 3.5. Cisteína Sintasa un blanco de inhibición en bacterias

La cisteína es un aminoácido esencial que realiza funciones vitales en la actividad catalítica y la estructura de muchas proteínas. Se requieren residuos de cisteína para proteínas esenciales y ubicuas con grupos de hierro-azufre (Fe-S), incluidos los citocromos y la aconitasa <sup>51,52</sup>. Las proteínas derivadas de cisteína como la tiorredoxina o tioles como el glutatión desempeñan un papel central en la protección de las células contra el estrés oxidativo. Como resultado de su papel crucial en la fisiología celular y la reactividad del grupo SH, el metabolismo de la cisteína está estrictamente controlado en respuesta a las variaciones ambientales <sup>53</sup>. Hay dos vías principales de biosíntesis de cisteína en los microorganismos: la vía de tiolación, que requiere sulfuro y la vía de transulfuración inversa, que convierte la homocisteína en cisteína a través de un intermedio de cistationina <sup>54</sup> (Fig 6) Estas vías solo se encuentran presentes en microorganismos como bacterias y parásitos y organismos como plantas y hongos, en el humano no se encuentra un homólogo de esta enzima y la síntesis de Cisteína se realiza por otro mecanismo.

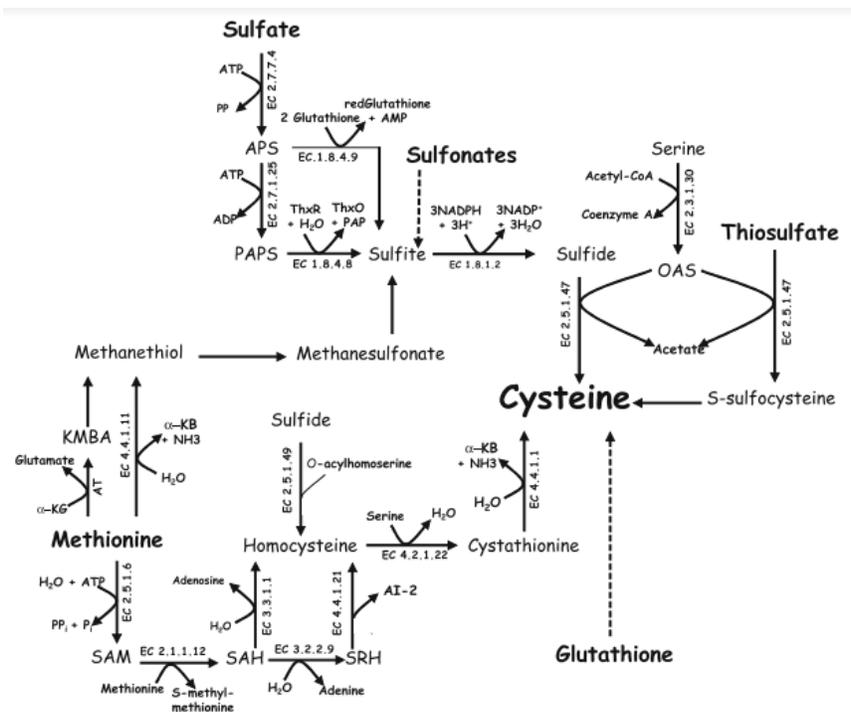


Figura 6. Vías biosintéticas de cisteína.<sup>55</sup>

En cuanto a la vía con más relevancia en este estudio ya que solo se encuentra en bacterias y parásitos, es la *vía de novo* y comprende de dos partes: comienza con serina acetiltransferasa (SAT) para formar O-acetilserina (OAS) a partir de L-serina y acetil coenzima A. Posteriormente, OAS reacciona con sulfuro para producir cisteína en una reacción de transferencia de alanilo mediado por la cisteína sintasa (CS)<sup>22</sup>. OASS es un miembro de la superfamilia de cisteína sintasa, y es una enzima dependiente de 5'-fosfato de piridoxal (PLP) que existe en dos isoformas: OASS-A y OASS-B<sup>53</sup>. OAS es el sustrato preferido para ambas isoformas, pero mientras que el bisulfuro es la única fuente de azufre utilizada por OASS-A, OASS-B puede usar tanto bisulfuro como tiosulfato <sup>53</sup>.

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, la enzima Cisteína Sintasa se puede proponer como posible blanco terapéutico contra infecciones bacterianas ya que cumple con características importantes como no estar presente en el humano y estar implicada en procesos bioquímicos de importancia para la bacteria como la protección al estrés oxidativo, por lo tanto, combinando un enfoque de diseño de fármacos basado en estructura y ligando, y con la ayuda de métodos biotecnológicos, se podría bloquear la funcionalidad de esta enzima vital en microorganismos que obtengan Cisteína por medio de la *vía de novo* y de esta manera obtener un avance importante para el desarrollo de nuevas terapias contra las infecciones de este tipo.

### **3.6. Estudios *in silico* para la identificación de blancos terapéuticos y diseño de medicamentos**

En el proceso de descubrimiento de medicamentos, una de las primeras fases está orientada a la selección de un blanco molecular, es decir la molécula que ha de ser inhibida, en este caso en la bacteria, con el objetivo de ocasionar la muerte de éste sin ocasionar daños secundarios en el

huésped, o si los hay, que éstos sean mínimos o leves. Diversas aproximaciones metodológicas han sido empleadas en la búsqueda de blancos moleculares en microorganismos de importancia médica. Sin embargo, algunas de ellas se han basado en premisas un tanto intuitivas que no tienen en cuenta la complejidad de los sistemas biológicos como el nivel de expresión de la molécula, su participación en un proceso metabólico esencial para el microorganismo, la localización en la célula, etc <sup>56</sup>. Adicionalmente, las estrategias experimentales para evaluar esencialidad mediante delección homóloga de genes, resultan costosos, consumen mucho tiempo y en algunos casos muy difíciles de llevar a cabo debido a limitaciones técnicas y experimentales.

En contraste, la disponibilidad actual de genomas secuenciados de una gran variedad de microorganismos, y los ensayos de expresión evaluando RNAm o la proteína a gran escala, constituyen una fuente importante de información que permitirá la comprensión de nuevos mecanismos moleculares, y constituye una oportunidad sin precedentes en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos <sup>56</sup>. No obstante, la manipulación y extracción de conocimiento útil de estas grandes cantidades de datos requiere del uso de herramientas bioinformáticas y computacionales, que permitan diseñar estrategias novedosas para el desarrollo racional y más efectivo de fármacos anti-*Pseudomonas*. La Bioinformática junto con la Biología de Sistemas son disciplinas bastante prometedoras en el proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos o segundos usos de medicamentos actuales. Estas permiten el análisis masivo y riguroso de procesos celulares realizados por un microorganismo, generando predicciones sobre posibles eventos moleculares con un mayor grado de confiabilidad que lo proveniente por la intuición. Incluso, permiten predecir genes esenciales en todo el genoma de un organismo favoreciendo la selección de aquellas moléculas que puedan ser blancos de la acción de medicamentos, para posteriormente ser evaluadas experimentalmente *in vitro e in vivo*. Estas estrategias quizás permitan mayores tasas de éxito que lo realizado en tamizajes al azar, y por ende la disminución de tiempo y costos en esta fase del proceso de descubrimiento o desarrollo de medicamentos <sup>57</sup>.

## **4. Diseño metodológico**

### **4.1 Tipo de investigación**

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

### **4.2 Enfoque, nivel o alcance de la investigación**

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

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Identificación del gen que codifica para CS en *Pseudomonas aeruginosa*

Para la caracterización molecular e identificación de la CS en *P. aeruginosa*, primero se realizó la búsqueda de la secuencia del gen GENBANK-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y *Pseudomonas* Genome DB (<http://www.pseudomonas.com/>). Para cada secuencia de nucleótidos obtenida se buscaron los marcos de lectura abiertos (ORF) por sus siglas en inglés, para determinar la secuencia codificante por medio de la herramienta ORF Finder del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) y así obtener la secuencia de aminoácidos correspondiente. Así mismo, se realizó la búsqueda de las secuencias de CS ortólogas en otros microorganismos de interés, entre ellos *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* y Cistationina beta sintasa (CBS) en *Homo sapiens*.<sup>22,23</sup>

### 4.3.2 Características generales de la enzima CS en *P. aeruginosa*

Características bioquímicas como punto isoeléctrico (pI), tamaño (Mw), presencia de dominios y motivos de la enzima se obtuvieron mediante el portal bioinformático EXPASY (<https://www.expasy.org/proteomics>) del Instituto de Bioinformática Suizo (SIB), usando las herramientas bioinformáticas como: Compute pI/Mw tool ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) para calcular el pI y Mw, ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) para determinar

los motivos presentes en la secuencia primaria de la enzima CS <sup>58</sup>. Igualmente, se utilizó la base de datos de familias de proteínas pfam ( <https://pfam.xfam.org/>) para determinar la familia a la cual pertenece la enzima CS <sup>59</sup>.

#### **4.3.3 Porcentaje de identidad entre las secuencias de CS de *P. aeruginosa* y ortólogos**

Para determinar porcentajes de identidad entre las secuencias de CS de *P. aeruginosa* y ortólogas presentes en otros organismos incluyendo la CBS humana, además de identificar los motivos y dominios catalíticos de esta familia de enzimas, se realizaron alineamientos múltiples a partir de las secuencias de nucleótidos de CS en *Pseudomonas aeruginosa* y posteriormente entre las secuencias de aminoácidos de las isoformas de CS encontradas en *P. aeruginosa* y las ortólogas en otros organismos de interés anteriormente nombrados, utilizando la herramienta (Clustal W) del paquete Bioedit. <sup>22</sup>

#### **4.3.4 Análisis filogenético molecular**

Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo para cada grupo de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas para estudiar las relaciones evolutivas dentro de las secuencias utilizando la herramienta Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X). La historia evolutiva se infiere utilizando el método de unión de vecinos. El árbol de consenso bootstrap inferido de 10000 repeticiones se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de bootstrap se colapsan. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la

prueba de arranque (10000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio.<sup>60</sup>

#### **4.3.5 Predicción de las estructuras secundaria y terciaria de la enzima CS en *P. aeruginosa***

A partir de la secuencia primaria de CS obtenida, la cual fué confirmada en ExPasy/UniProtKB/Swiss-Prot ([www.expasy.org/swissprot](http://www.expasy.org/swissprot)), una base de datos para el análisis de proteínas que proporciona un alto nivel de integración con otras bases de datos biomoleculares y gran documentación externa, se predijeron las estructuras secundarias y terciarias de la CS en *P. aeruginosa*. Inicialmente, se hizo la predicción de la estructura secundaria mediante el método GOR IV ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html)), el cual permitió determinar el porcentaje de láminas  $\beta$  y alfa hélices que presentaron las tres isoformas de CS en *P. aeruginosa*<sup>61</sup>. Posteriormente, se hizo el modelamiento de la estructura terciaria de cada una de las isoformas de CS mediante el software I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), la calidad de los modelos obtenidos se analizó con base en una medida cuantitativa de confianza dada por los parámetros C-score y TM-score<sup>62</sup>. El C-score, es un puntaje de confianza para estimar la calidad del modelo predicho, los valores aceptables para el puntaje están en el rango de -5 a 2, los valores más altos indican un modelo con una mejor calidad. Por otro lado, el TM-score es una escala para medir la similitud estructural entre el modelo predicho y la estructura nativa de la proteína; los valores  $> 0.5$  indican que el modelo tiene una topología global correcta. Adicionalmente, los modelos predichos se evaluaron y validaron usando los servidores ProSA-web y RAMPAGE<sup>63,64,65</sup>.

## **5. Resultados**

### **5.1. Identificación del gen que codifica CS en *P. aeruginosa***

La búsqueda de las secuencias nucleotídicas de *P. aeruginosa* en la base de datos GenBank, permitió identificar tres secuencias de Cisteína sintasa en este microorganismo. Una secuencia descrita como Cisteína sintasa A [*Pseudomonas aeruginosa* PA01] con 975 nucleótidos, Cisteína sintasa B [*Pseudomonas aeruginosa* PA01] con 900 nucleótidos y por último una tercera de 918 nucleótidos sin clasificación de isoforma. Al realizar una comparación entre las tres secuencias de nucleótidos, se observó que el porcentaje de identidad encontrada entre ellas fue del 30% (Fig 7).

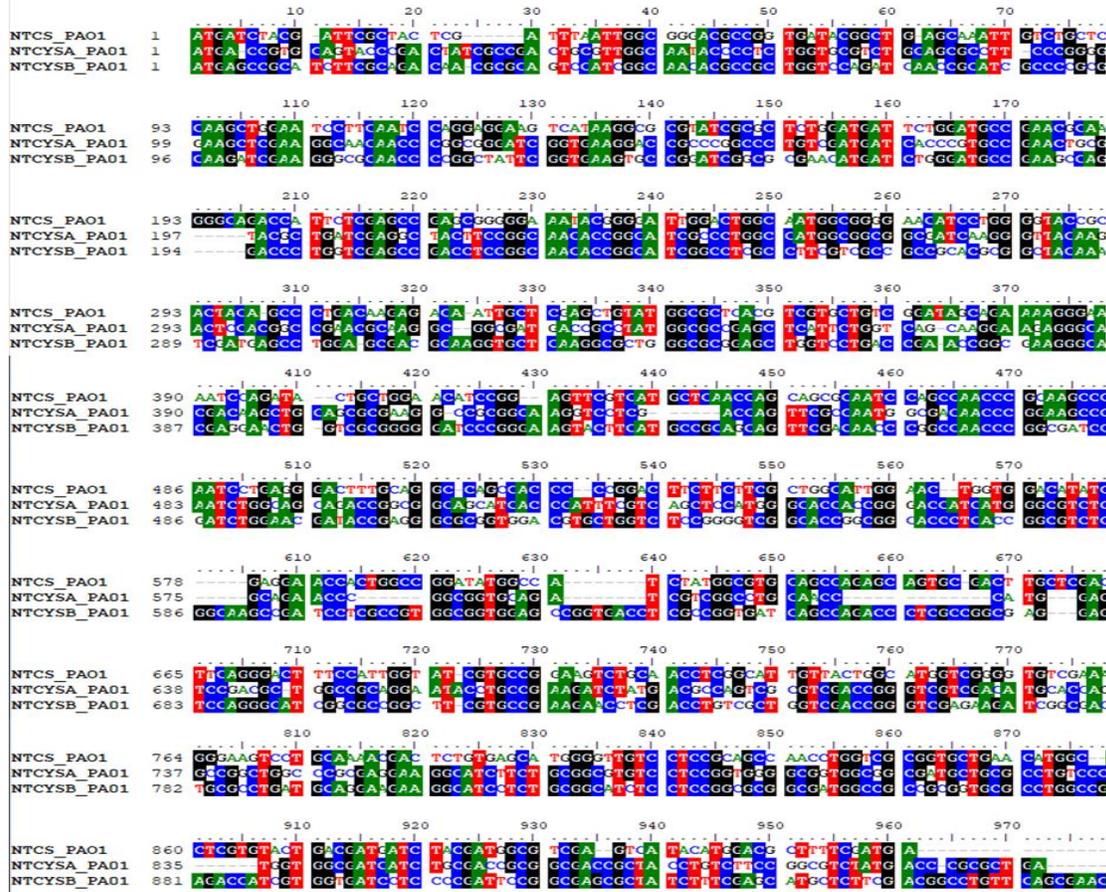


Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de Cisteína Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* descritas en la base de datos GENBANK-NCBI como Cisteína sintasa (NTCS\_PA01), Cisteína sintasa A (NTCYSA\_PA01) y Cisteína sintasa B (NTCYSB\_PA01).

Por otro lado, al buscar los genes dentro del genoma completo de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas* Genome DB (<http://www.pseudomonas.com/>)), se pudo determinar la ubicación de los tres genes encontrados en GENE BANK; es así que el gen CS se ubica entre la posición 2'315.709 y 2'316.626 pb (figura 8I), el gen de Cisteína sintasa B entre la posición 1,020,708 y 1,021,607 pb (figura 8II) y por último el gen Cisteína sintasa A está entre la posición 3'062.939 y 3'063.913 pb (Figura 8 III). Ninguno de los genes que codifican para las tres isoformas de CS se transpone el uno con el otro según las ubicaciones ya mencionadas, se podría decir que poseen una distancia razonable entre una y la otra, por ende, no comparten sus zonas de codificación.

CYSA está ubicada en el operón *cysT-cysW-cysA*, mientras que CYSB se encuentra en el operón *cysM-rumA-relA*.

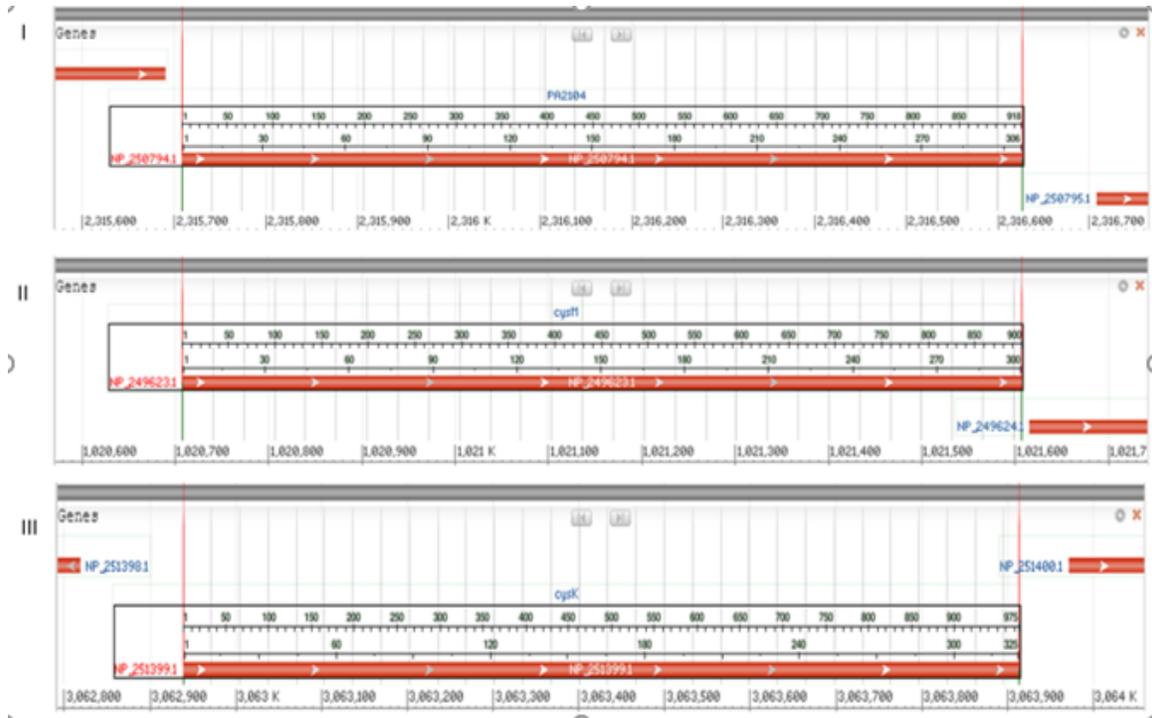


Figura 8. Mapas de ubicación de los genes que codifican para CS dentro del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* (<http://www.pseudomonas.com/>). Las líneas de color rojo muestran la ubicación del gen que codifica para cada una de las enzimas, respectivamente CS (I), CYSB (II) y CYSA (III).

Con la herramienta ORF Finder que ofrece el sitio web de NCBI se realizó la búsqueda de marcos de lectura abiertos (ORF) en las secuencias de aminoácidos de las secuencias de los genes que codificaban para CS en *P. aeruginosa*. En la figura 9 se observan cada uno de los ORF para CS, CSA y CSB, donde en las tres secuencias se evidencia que es posible obtener una proteína completa y funcional, pues tienen su codón de iniciación y de parada en las posiciones correctas y la secuencia de posible traducción no se ve interrumpida de ninguna manera.



Figura 9. Marcos de lectura abierto en el gen que codifica para Cisteina Sintasa (CS) en *Pseudomonas aeruginosa*. Se muestran los marcos de lectura abiertos (ORF) de los genes que codifican para CS (Fig. A), CSA (Fig. B) y CSB (Fig.C). Se ubican en el inicio de las tres secuencias el respectivo codón de iniciación y finaliza con un codón de parada, abarcando la totalidad de las secuencias.

## 5.2. Características generales de la enzima CS en *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (NT\_CYSA) codifica para una proteína de 324 aminoácidos con un peso molecular estimado de 34 kDa y un pI teórico de 6.24, el gen (NT\_CYSB) codifica para una proteína de 299 aminoácidos, cuyo peso molecular es de aproximadamente 32 kDa y un pI teórico de 5.52; finalmente la proteína codificada por (NTCS\_PA01) tiene un tamaño de 305 aa, un peso molecular estimado de 33 KDa y un pI teórico de 5.84. El valor de pI indica que las tres enzimas son de naturaleza ácida, por lo tanto cada una de ellas contienen más residuos de aminoácidos con carga negativa que con carga positiva. El total de carga negativa para CS, CYSA y CYSB es de 30,35 y 38 respectivamente. Los valores calculados para el índice de estabilidad, índice alifático y GRAVY (Gran Promedio de Hidropaticidad), indican que CS, CYSA y CYSB son estables en un amplio rango de temperatura, hidrofílicas y solubles (Tabla 1).

PARÁMETRO	RESULTADO		
	CS	CYSA	CYSB
FÓRMULA MOLECULAR	C1446H2320 N4060430S15	C1510H2474 N4180461S14	C1403H2281 N4090441S16
PUNTO ISOELÉCTRICO TEÓRICO (pI)	5.84	6.24	5.54
PESO MOLECULAR (Da)	32753.69	34309.62	32447.98

No DE RESIDUOS CON CARGA NEGATIVA (Asp+Glu) %	30	35	38
No DE RESIDUOS CON CARGA POSITIVA (Arg+Lys) %	24	34	33
TOTAL DE ÁTOMOS	4617	4877	4550
ÍNDICE DE INESTABILIDAD	38.1	34.49	32.44
ÍNDICE ALIFÁTICO	102.62	94.57	86.82
GRAVY	0.094	-0.037	-0.268

Tabla 1: Características generales para las enzimas CS, CYSA y CYSB

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS	CS		CYSA		CYSB	
	CANTIDAD	(%)	CANTIDAD	(%)	CANTIDAD	(%)
ALA	25	8.4	34	10.5	29	9.7
ARG	16	5.2	15	4.6	23	7.7
ASN	14	4.6	13	4.0	10	3.3
ASP	15	4.9	12	3.7	17	5.7
CYS	3	1.0	2	0.6	3	1.0

GLN	11	3.6	11	3.4	11	3.7
GLU	15	4.9	23	7.1	21	7.0
GLY	33	10.8	35	10.8	30	10.0
HIS	9	3.0	2	0.6	4	1.3
ILE	21	6.9	23	7.1	20	6.7
LEU	35	11.5	29	9.0	25	8.4
LYS	8	2.6	19	5.9	10	3.3
MET	12	3.9	12	3.7	13	4.3
PHE	8	2.6	7	2.2	3	1.0
PRO	15	4.9	19	5.9	15	5.0
SER	24	7.9	19	5.9	18	6.0
THR	8	2.6	18	5.6	17	5.7
TRP	2	0.7	2	0.6	2	0.7
TYR	7	2.3	5	1.5	9	3.0
VAL	24	7.9	24	7.4	19	6.4

Tabla 2: Composición aminoacídica de las enzimas CS, CYSA y CYSB. Se muestran resultados en número y porcentaje para cada uno de los aminoácidos.

Todas las secuencias de CS en *P. aeruginosa* pertenecen a la gran familia de proteínas PLP dependientes como lo confirmaron los resultados obtenidos por medio de la base de datos Pfam, sin embargo cuando se realizó la búsqueda de dominios y motivos propios de ésta gran familia en las proteínas encontradas para *P. aeruginosa* por medio de la herramienta ScanProsite del Expasy.com, sólo se determinó el dominio típico de CS para las secuencias de proteínas CYSA y

I found: 1 hit in 1 sequence  
USERSEQ1 (324 aa)  
MSRIFADNAQSIGNTPLVQINRIAPRGVTILAK**IEGRNPGYSVKCRIGAN**MIWDAEASGRLLKSGMT  
LVEPTSGNTGIGLAFVAAAARGYKLIILTMPASMSLERRKVKALGAELVLTPEAKGKGAIQKAEEL  
VAGDPGKYFMPQQFDNPNANPAIHEKTTGPEIINNDTEGAVDVLVSGVGTGGTLTGVSRYIKNTRGK  
ILAVAVEPVTSPVISQTLAGEEVKPAHKIQGIGAGFVPKNLDSLVDVREKIGDDEAKNMALRLM  
QEEGILCGISSGAAMAAVRLAEEPNIQGKTIIVVILPDSGERYLSMFLFDGLFSEQLTQ

II found: 1 hit in 1 sequence  
USERSEQ1 (299 aa)  
MTVQYPTIADCVGNTPLVRLQRLPGETSNTLLV**KLEGNPAGSVKDRPALSM**ITRAELRGDIRPGD  
TLIEATSGNTGIALAMAAAIGYKMIIMPONSTAERKAAMTAYGAELILVSKKEEGMEGARDLADK  
LQREGRGKVLQDFANGDNPEAHYHSTGPEIWIQQTGGSIHFVSSMGTGTIMGVSRYLKEQNPAVQ  
IVGLQPMEGSAIPGIRRHQPQYLPKIYDASRVDRVDMHQDEAEDIHRLAREEGIFCGVSSGGAV  
AAMLRLSRELENAVLAIIICDRGDRYLSSGVYDPR

III  ScanProsite Results Viewer  
Output format: Graphical view - this view shows ScanProsite results together with ProRule-based predicted intra-domain features [help]  
Hits for all PROSITE (release 2020\_01) motifs on sequence USERSEQ1 :  
no hit!

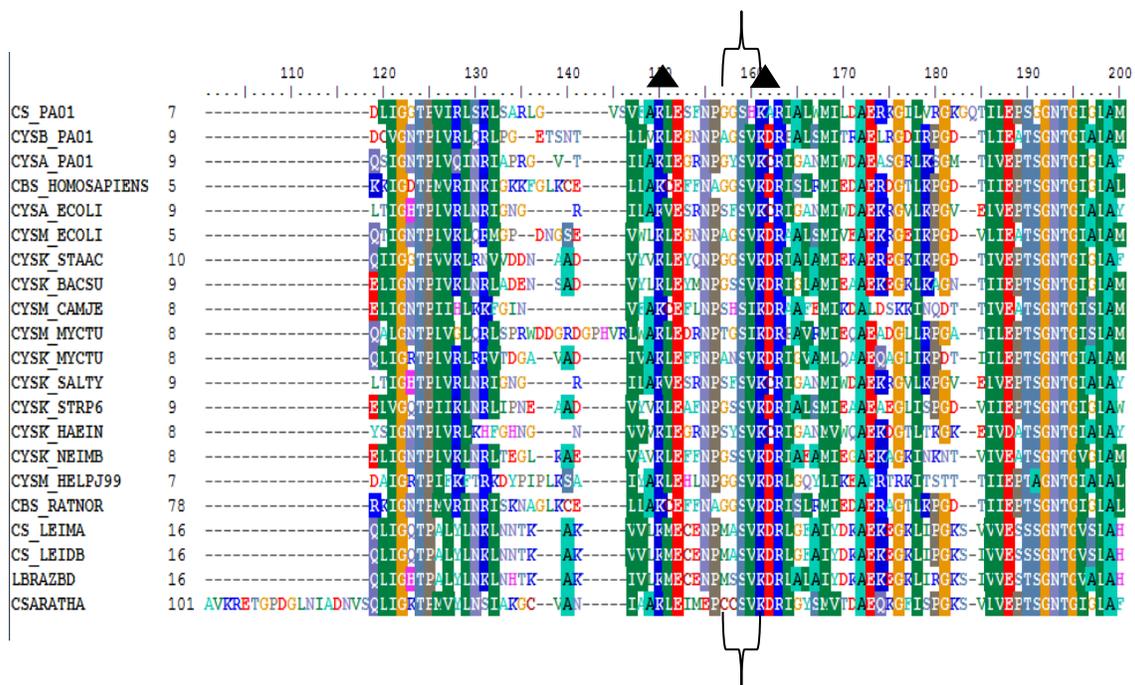
CYSB, la tercera secuencia no mostró ningún hit (Figura 10).

Figura 10: Herramienta ScanProsite. Dominios típicos para CYSA (I) y CYSB (II) se muestran resaltados en amarillo. CS (III) no muestra ningún Hit.

### 5.3 Porcentaje de identidad entre las secuencias de CS de *P. aeruginosa* y ortólogos

La comparación entre las secuencias de proteínas de las CS en *P. aeruginosa* y las secuencias ortólogas en otros microorganismos y la CBS humana permitieron determinar que CysA de *P. aeruginosa* presenta una identidad alta con las secuencias CysA de *E. coli* (70%), CysK de *S. typhimurium* (70%) y CysK de *H. influenzae* (67%). CysB es idéntico a CysM de *E. coli* (70%). Los tres genes exhiben una identidad baja (<40%) con respecto a CβS humana.

Por otro lado, el alineamiento múltiple de secuencias permitió identificar los cuatro residuos de lisina necesarios para la actividad catalítica de la enzima en CYSA\_PA01 y CYSB\_PA01 pero no en CS\_PA01 donde sólo se encontraron 2 de los 4 residuos (Lys33, Lys44), así mismo se observaron sustitución de aminoácidos (Val 41 → His, Asp 41→Ala) en CYSPA01 y (Asp 44→Cys) en CYSA\_PA01 dentro del dominio de unión a fosfato piridoxal (PXXSVKDR)). (Fig 11).



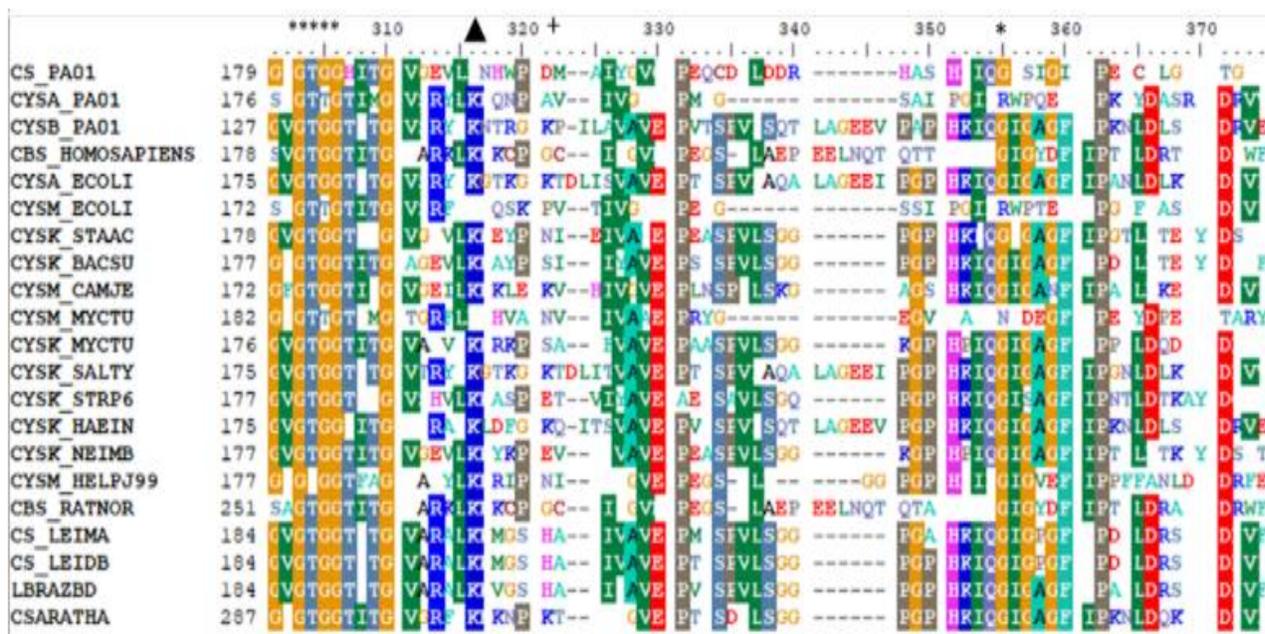
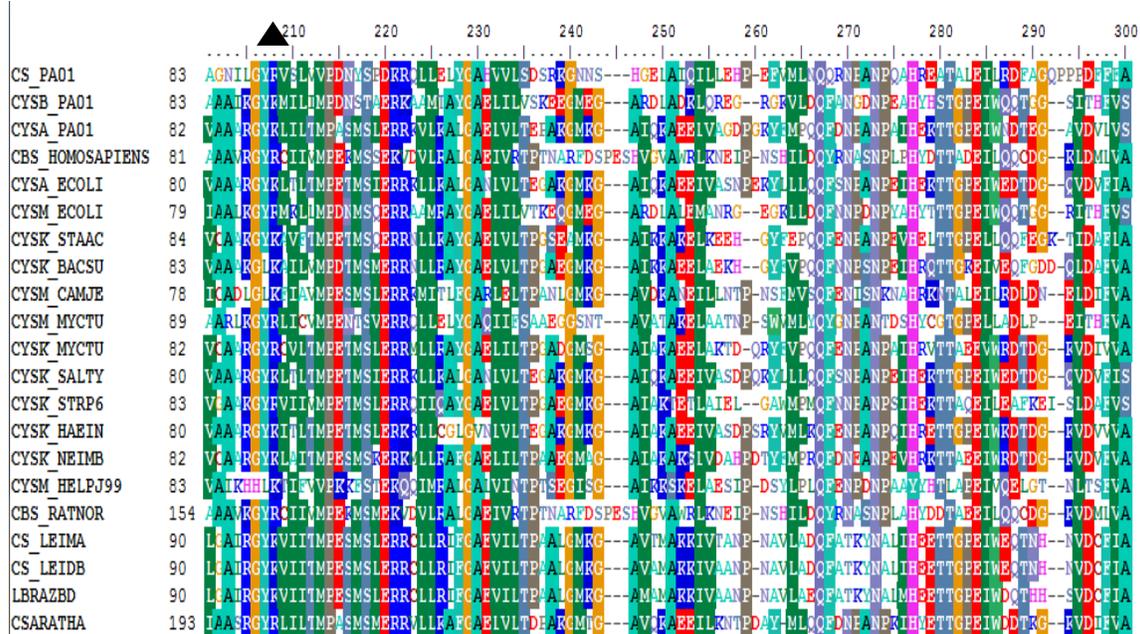


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos deducidas de CS de *Pseudomonas aeruginosa* y otros organismos representativos. Se muestra la identidad (fondo color) de los residuos de aminoácidos. Los corchetes indican los aminoácidos consenso del

motivo de unión a fosfato de piridoxal-PLP (PXXSVKDR) y los residuos de lisina requeridos para la actividad de cisteína sintasa se indican con triángulos. El bucle  $\beta 8 - \beta 9$  en la entrada del sitio activo se indica con un asterisco (\*), y los residuos cargados positivamente implicados en la unión con SAT se indican con (+). *ECOLI*: *Eschericia coli*; *STAAC*: *Staphylococcus aureus*; *BACSU*: *Bacillus subtilis*; *CAMJE*: *Campylobacter jejuni*; *MYCTU*: *Mycobacterium tuberculosis*; *SALTY*: *Salmonella typhimurium*; *STRP6*: *Streptococcus pyogenes*; *HAEIN*: *Haemophilus influenzae*; *NEIMB*: *Neisseria meningitidis*; *HELPJ99*: *Helicobacter pylori*; *RATNOR*: *Rattus norvegicus*; *LEIMA*: *Leishmania major*; *LEIDB*: *Leishmania donovani*.

### 5.3.1 Análisis filogenético de CS en PA

Evolutivamente se muestra una similitud entre las secuencias CS\_PA01 y CYSM\_MYCTU; a su vez se observa un clado con un 100% de identidad para CYSB\_PA01 y CYSM\_ECOLI. CYSA presenta relación más cercana con CYSA de *E. coli* y CYSK de *Salmonella Typhimurium*. Es importante resaltar que ninguna de las tres secuencias presenta alta similitud con Cistationina- $\beta$ -sintasa de *Homo sapiens* cuyo ancestro común está más alejado de las especies actuales dato importante para futuros estudios de CS como blanco de inhibición selectivo en *P. aeruginosa* (Figura 12).

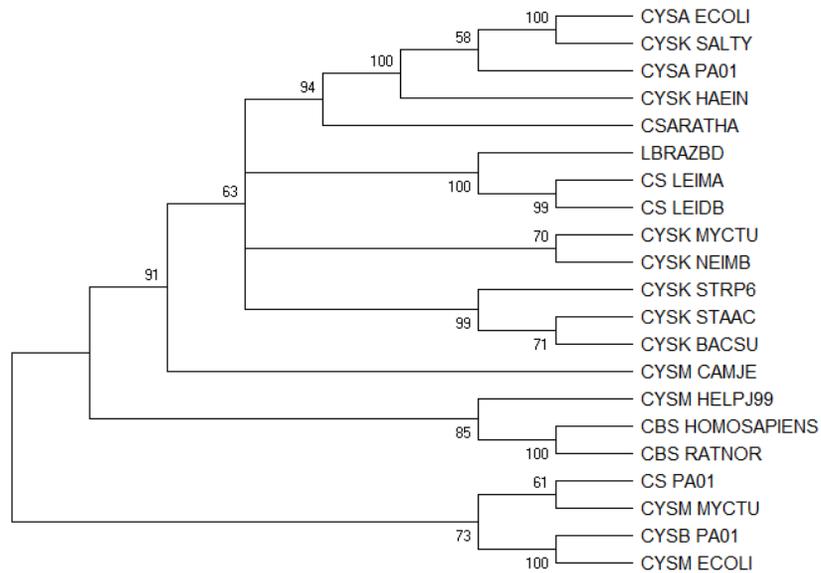


Figura 12. Árbol filogenético de secuencias de proteínas del gen que codifica para CS en *P. aeruginosa* con relación a otros microorganismos. Se utilizó el método de Neighbor-joining para inferir la historia evolutiva de CS en diferentes microorganismos. Los cálculos del árbol filogenético se realizaron con MEGA 7.

#### 5.4. Predicción de estructuras secundaria y terciaria de las CS en *P. aeruginosa*

La estructura secundaria de CYSB mostró en su composición un 33,95% de hélices Alfa, y un 17,28 % de láminas Beta, en el caso de CysB el 32,78 % corresponde a hélice alfa y 22,74 % láminas Beta, por último CS presenta un porcentaje del 32,26% en hélices Alfa y un 20,65% de láminas Beta. Las tres isoformas presentan similitud en su cantidad de láminas alfa con variación menor al 1%, en el caso de láminas Beta.

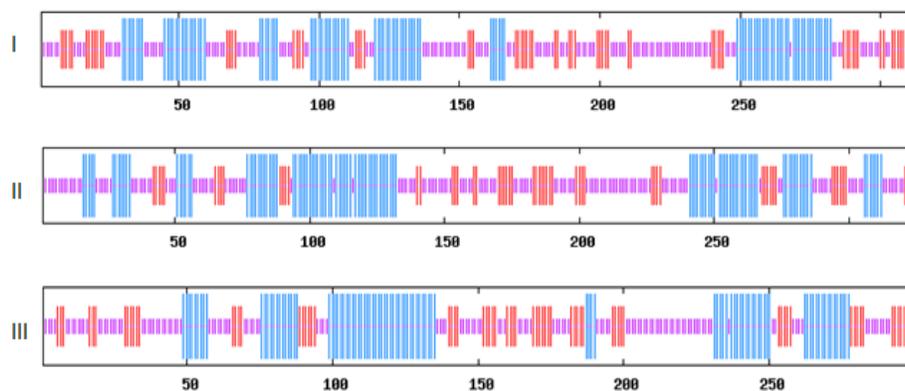


Figura 13. Método de predicción de estructura secundaria GOR IV (visualización gráfica de la predicción); azul: hélice  $\alpha$ ; rojo: cadena extendida (cadena  $\beta$ ); violeta: otros estados (desorganizados), respectivamente CS (I), CSA (II) y CSB (III).

La predicción del modelo tridimensional de cisteína sintasa A (CYSA\_PA01) obtenido mediante la herramienta I-TASSER. El modelo presenta un alto nivel de confianza determinado mediante el C-score: 1,65; TM-score:  $0.95 \pm 0.05$  y RMSD:  $3.0 \pm 2.2 \text{ \AA}$ . TM-align hizo coincidir nuestro modelo cristalográfico con todas las estructuras en la biblioteca PDB, donde se evidenció que los modelos análogos más representativos para esta proteína son O-acetilserina sulfhidrilasa de *salmonella typhimurium* (98,3%), O-acetilserina sulfhidrilasa de *Haemophilus influenzae* (95,3%), O-acetilserina sulfhidrilasa de *Mycobacterium tuberculosis* (92,9%).

El punto isoeléctrico (pI) de 6,24 indica que cisteína sintasa es de naturaleza ácida. CYSA exhibe sitios de unión al ligando (piridoxal fosfato) PLP en los residuos 43,44,74,177,178,179, 180,181,182,183,230,321,274,301,302 y el sitio activo de la enzima se encuentra entre los residuos K44 y K274, formando el bolsillo para la unión al sustrato natural O-Acetil-serina.

CYSB\_PA01 y CS\_PA01 presentan altos niveles de confianza frente a la predicción de modelos cristalográficos, los puntajes de CYSB\_PA01 fueron: C-score: 1,35; TM-score:  $0.90 \pm 0.05$  y RMSD:  $3.5 \pm 2.4 \text{ \AA}$  y para CS\_PA01 fueron: C-score: 1,81; TM-score:  $0.97 \pm 0.05$  y RMSD:  $2.7 \pm 2.0 \text{ \AA}$  . Los residuos de unión a PLP comunes entre las tres secuencias objetivos del estudio se encuentran ubicados en las posiciones 44, 178, 179, 180, 181,182. El valor de pI: 6,24 de CYSB corresponde al mayor valor obtenido. El sitio activo de CS se encuentra en los residuos K46 y K268, pero en el caso de CYSB solo se muestra residuo para sitio activo K259.

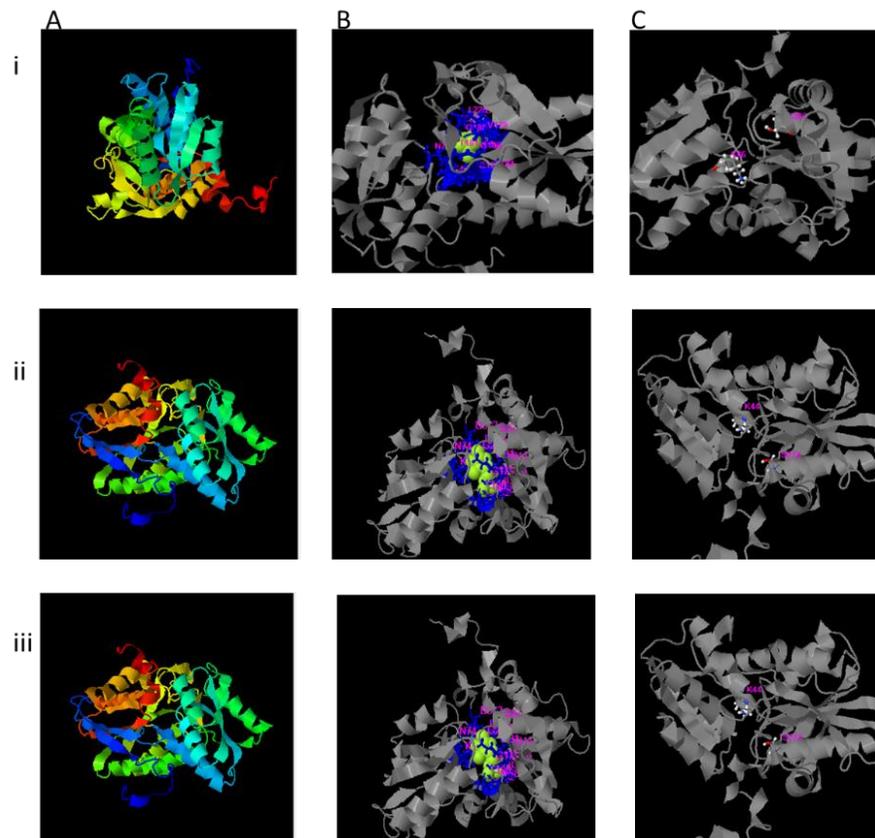


Figura 14. Modelo cristalográfico de la enzima Cisteína sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*. El modelo cristalográfico fue realizado usando la herramienta I-TASSER. (i): Cisteína sintasa, (ii):

Cisteína sintasa A, (iii): Cisteína sintasa B. A. Modelo 3DE de Cisteína sintasa B. Sitios de unión a los ligandos C. Sitio activo de la enzima residuos de Lisina K44, K274

La validación del modelo local, global y de la estructura 3D que se realizó por medio de ProSA-web arrojó puntajes Z óptimos -9.48, -10.04 y -8,97 para CS, CYSA y CYSB respectivamente (Figura 15A). Estos puntajes indican que los modelos tienen una calidad razonablemente buena ya que todos se encuentran dentro del rango de puntajes típicamente encontrados en proteínas nativas ya descritas en PDB y que poseen un tamaño similar. La figura 15B representa la energía en función a la posición de los residuos de aminoácidos, indicando que la estructura no tiene partes problemáticas o erróneas ya que todas las fluctuaciones se encuentran en la parte negativa de la gráfica, lo cual es lo esperado para el correcto y adecuado plegamiento de la proteína. Por último, la validación de la estructura 3D visualizada en Jmol (figura 15C), indicó que la estructura es estable ya que los residuos en ella son de energía negativa (visualizados en color azul) y la cantidad de los residuos de energía positiva (visualizados en color rojo), no son representativos.

En cuanto a la validación de la estabilidad estequiometría de la estructura proteica, el gráfico de Ramachandran mostro que la estructura no tenía una cantidad importante de errores o posiciones inusuales de los aminoácidos en cuanto a las posibles torsiones o giros que podrían tener los ángulos Phi y Psi en la formación de la estructura secundaria de la proteína. La mayoría de residuos se encontraban dentro de las regiones permitidas (rojo) con un porcentaje de 82,7 % para Cisteína sintasa (CS), un 85,8% para CYSA y 80,2 % para CYSB, lo cual es lo ideal ya que valores >80% de estos residuos en estas posiciones indican que la conformación de la proteína es estable. (Figura 16).

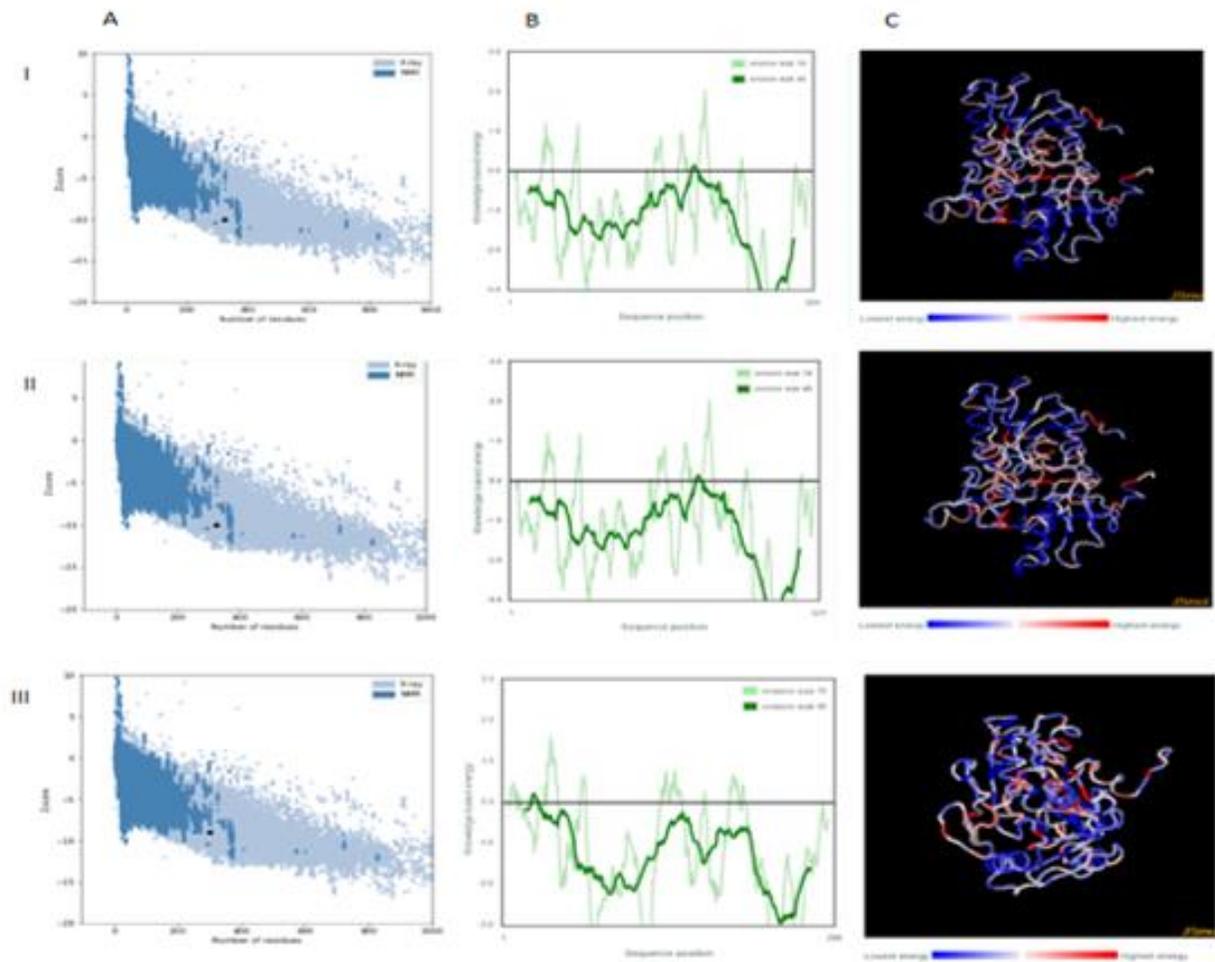


Figura 15. Validación del modelo mediante ProSA-web. Gráfica z-score (A). Gráfico de energía de residuos (B). Visualización de la molécula con mediante Jmol (C). Cisteína sintasa (I), Cisteína sintasa A (II) y Cisteína sintasa B (III).

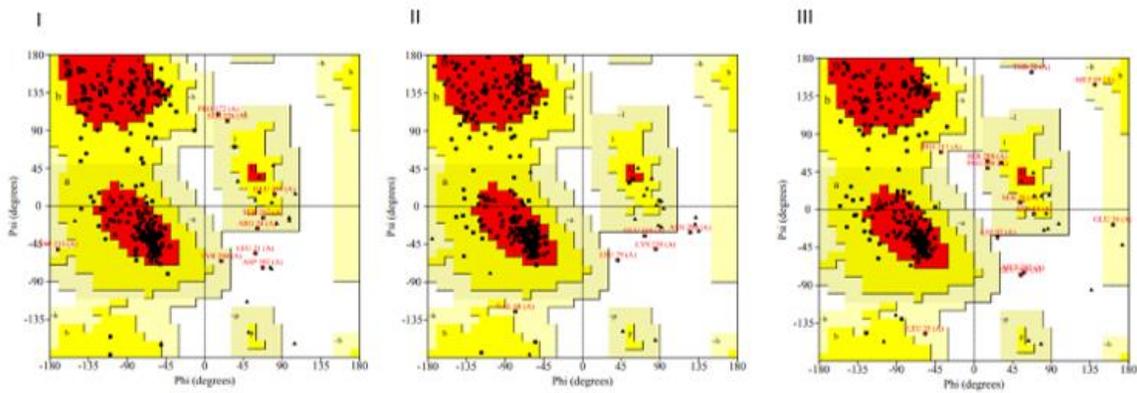


Figura 16. Gráfico de Ramachandran mediante servidor PROCHECK.CS (I), CYSA (II) y CYSB (III). Las regiones más favorecidas se indican en color rojo; las regiones adicionales permitidas y generosas se indican en amarillo y amarillo claro; las regiones no permitidas se indican en color blanco.

## 6. Discusión

En este proyecto, se estudió la enzima cisteína sintasa como un posible blanco de acción prometedor, para el futuro desarrollo de nuevas terapias contra las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando enfoques de predicción computacionales (*in silico*) por medio de bases de datos públicas, así como herramientas de bioinformática para analizar las secuencias de CS en esta bacteria ya que estudios realizados en otras bacterias y parásitos como *E. coli*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, entre otros, han demostrado que la biosíntesis de Cisteína por medio de la reacción de la CS, es vital en la formación de mecanismos de resistencia utilizados en estos microorganismos contra tratamientos comunes.<sup>24,25,28,31,35</sup>

En el genoma de *P. aeruginosa* se encontraron tres genes que codifican para tres posibles isoformas de CS (CysA, CysB y Cys), resultado que contrasta con el hecho de que en bacterias gram negativas donde se ha estudiado esta enzima sólo se han descrito 2 isoformas como por ejemplo en *E. coli* tienen CysM y CysK<sup>66</sup>; *Salmonella* CysE y CysK<sup>67</sup>; *Haemophilus influenzae* CysE y CysK<sup>68</sup>, sin embargo en algunas bacterias se han caracterizado 3 isoformas como *Staphylococcus aureus* (CysM, CysK y SA0112)<sup>69</sup> y como *M. Tuberculosis* (CysK1, CysM y Cysk2)<sup>18</sup> y en todos los casos parecen estar relacionadas con la demanda de Cisteína en estas bacterias, su patogenicidad y su supervivencia frente al estrés oxidativo.

Al igual que en otros microorganismos, las enzimas cisteína sintasa (CYSA y CYSB) de *P. aeruginosa* presenta todos los motivos y dominios característicos para la su función; el sitio activo lo conforman 55 aminoácidos, que también han sido descritos previamente en las enzimas de microorganismos como *E. coli*, *L. major*, *L. braziliensis*<sup>22</sup> y el residuo aminoacídico de Lys 31 invariante en el sitio activo al igual que en las CYSM de *Mycobacterium tuberculosis*

descrito previamente <sup>70</sup>. Así mismo estas enzimas CS de *P. aeruginosa* presentan el motivo de unión a PLP (PXXSVKDR) que se ha descrito característico de esta familia de enzimas (Piridoxal-fosfato dependiente)<sup>70,71</sup>, lo cual confirma que *P. aeruginosa* al igual que otros microorganismos también utiliza la *vía de novo* para la síntesis de la Cisteína <sup>55</sup>.

Por otro lado, es importante resaltar que la secuencia de CYSPAO una de las secuencias encontradas en el genoma de *P. aeruginosa* no presenta todos los motivos y residuos de aminoácidos, sólo se encontraron dos de los 4 residuos necesarios para la actividad catalítica, este hallazgo es importante porque puede estar asociado con la presencia de un pseudogen que codifica para una proteína no funcional como ya ha sido reportado para otros microorganismos como *Trypanosoma rangeli* <sup>22</sup>, en el cual pese a que en su genoma se encontró una secuencia parcial de CS, los análisis bioinformáticos y bioquímicos confirmaron que es un pseudogen que codifica para una secuencia truncada no funcional. De acuerdo con otros estudios (Raj et al. 2012; Schnell et al. 2007; Heine et al. 2004), se puede inferir que algunos microorganismos no forman el complejo de CS, esto se ha atribuido a la hendidura del sitio activo y a las propiedades de unión a péptidos de CysK, por lo cual también es afuncional.

Nuestros hallazgos en cuanto al alineamiento y filogenia, mostraron que la secuencia del gen CysA en *P. aeruginosa* presenta una identidad alta con secuencias de CyK de *E. coli* y CysK de *S. typhimurium* pero existe una homología mucho mayor entre el gen CysB en *P. aeruginosa* y CysM de *E. coli* (70%). Estos resultados también se relacionan con algunos estudios en parásitos como *Trichomonas Vaginalis*, donde la homología con las enzimas de *E. coli* es amplia y de la cual se demostró que claramente también se alinean más ampliamente con los CS tipo B de *S. typhimurium* y *E. coli* que los CS tipo A de los mismos organismos. <sup>71</sup> Esto confirma los resultados de Gareth D et. Al 2006, donde se describe que la enzima de CS en *E. coli* está ampliamente relacionada con muchos microorganismos de importancia <sup>72</sup>. Estos resultados indican la gran similitud que existe principalmente entre el complejo de CS en *P. aeruginosa* y el complejo CS de *E. coli*; Existen informes sobre la patogenicidad y resistencia que le confiere CS a *E. coli* frente a diversas situaciones, y basándonos en la similitud que mostraron sus secuencias con

*P. aeruginosa* podemos darnos un acercamiento en cuanto a la importancia biológica que puede cumplir esta enzima en *P. aeruginosa*.

Por otro lado, se observó que los tres genes de CS en *P. aeruginosa* con respecto a la CβS humana, tenían baja homología, lo que indica que existe menos del 50% de similitud con el homólogo más cercano de CS en el *Homo sapiens* la enzima CBS, estos resultados se correlacionan con los resultados de investigaciones con parásitos donde se evidenció que la CS de parásitos como *L. braziliensis* y *T. cruzi*<sup>23</sup> presentan un porcentaje de similitud baja con la enzima ortóloga humana, lo que sugiere que CS en microorganismos de importancia médica puede llegar a ser un buen blanco terapéutico a estudiar.

La validación de los modelos 3DE de las enzimas mediante el análisis con PROCHECK mostró que CysA y CysB son estequiométricamente estables y que estos modelos pueden servir para la búsqueda de posibles inhibidores de esas enzimas mediante herramientas bioinformáticas como el docking molecular, al igual que como se ha planteado en estudios previos realizados con la CS en parásitos como *Trichomonas vaginalis*<sup>71</sup> donde los valores de los residuos de las regiones más favorecidas (92.9%) son muy cercanos a los evidenciados en los resultados de nuestro estudio, principalmente en CysA donde el valor fue de 85,8%.

Los resultados obtenidos y la similitud de esta estructura con otras ya caracterizadas van por buen camino debido a su alto puntaje en los diferentes parámetros y su estabilidad demostrada. Gracias a este estudio y los aportes generados, se abre un camino para el estudio *in vitro* de CS en *P. aeruginosa* con el fin de validar esta enzima como un nuevo blanco terapéutico.

Nuestros análisis constituyen una base importante y fundamental sobre la cual se pueden desarrollar a futuro estudios enfocados en la búsqueda racional de medicamentos contra este patógeno, ya que este tipo de caracterización *in silico*, brindan conocimientos y herramientas que se pueden emplear en metodologías computacionales adicionales como el Docking Molecular

para encontrar posibles inhibidores de esta enzima (CSPA01) y de esta manera desarrollar nuevas terapias alternativas contra infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

## 7. Conclusiones

1. El análisis bioinformática y comparativo de la enzima Cisteína Sintasa en la bacteria *P. aeruginosa*, indicó que esta puede tener una alta estabilidad y funcionalidad en este microorganismo, sugiriendo que la vía biosintética *de novo* está presente en este microorganismo como vía para la síntesis de Cisteína.

2. Cisteína sintasa tiene una gran proyección como blanco farmacológico, pues presenta todas las características estructurales descritas en otros microorganismos, además porque la similitud con respecto a su homólogo más cercano en el humano la CBS es muy baja.

3. La búsqueda y caracterización de blancos farmacológicos a partir de la bioinformática abre una ventana de posibilidades, para el desarrollo de nuevas terapias ya que permite conocer las características moleculares y bioquímicas del blanco y además predecir y orientar, como pueden interaccionar los candidatos farmacológicos y sus respectivos sitios de unión a una proteína.

## 8. Referencias bibliográficas

1. Gellatly S. & Hancock R. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. (2013). 67: 159–173.
2. Villa M., Cortés A., Leal L., Meneses A. & Meléndez P. Resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* in Colombian hospitals. *Rev. chil. infectol.* (2013). 30 (6): 605-610.
3. 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.
4. Díaz A., Vivas R., Puerta L., Ahumado M., Arévalo L., Cabrales R & Herrera A. Biofilms like expression of quorum sensing mechanism: A revision. *Av Periodon Implantol.* (2011). Vol 23, 3: 195-201.
5. Hernández A., Yagüe G., García E., Simón M., Moreno L., Canteras M., & Gómez, J. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Rev Esp Quimioter.* (2018) ; 31 (2): 123-130.
6. Zowalaty M., Thani A., Webster T., Zowalaty A., Schweizer H., Nasrallah G., Marei H., & Ashour H. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* (2015). 10 (10), 1683–1706.
7. Centers for Disease Control and Prevention. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. [Internet]. [Revisado marzo 2019]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>

8. Maimone S. PSEUDOMONAS AERUGINOSA. COdeINEP control de infecciones y epidemiologia. [Internet] 2004 [Revisado en noviembre 2019]. Available from: <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/PSEUDOMONAS-AERUGINOSA.pdf>
9. Peñaloza H., Noguera L., Riedel C & Bueno S. Expanding the Current Knowledge About the Role of Interleukin-10 to Major Concerning Bacteria. *Front Microbiol.* (2018); 9 : 2047.
10. Christophe B., Agnès R & Jean-Marc G. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* (2008) 322 : 249–289.
11. Sturgill G., Toutain C., Komperda J., O’Toole G & Rather P. Role of CysE in production of an extracellular signaling molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: loss of CysE enhances biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* (2004) 186 : 7610–7617.
12. Singh P., Brooks J., Ray V., Mandel M & Visick K. CysK plays a role in biofilm formation and colonization by *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol.* (2015) ; 81 : 5223–5234.
13. Diner E., Beck C., Webb J., Low D & Hayes C. Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI). (2012). *Genes Dev* 26, 515
14. Kaundal S., Uttam M & Thakur K. Dual Role of a Biosynthetic Enzyme, CysK, in Contact Dependent Growth Inhibition in Bacteria. *PLoS ONE* (2016). 11 (7) : e0159844.
15. Turnbull A & Surette MG. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* (2010) ; 161 : 643–650.
16. Turnbull A & Surette MG. L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology.* (2008) ; 154 : 3410–3419.
17. Becker MA., Kredich NM & Tomkins GM. The purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase-A from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol Chem.* (1969). 10 ; 244 (9) : 2418-27.
18. Ågren D., Schnell R & Schneider. The C-terminal of CysM from *Mycobacterium tuberculosis* protects the aminoacrylate intermediate and is involved in sulfur donor selectivity. *FEBS Letters* 583 (2009) 330–336.

19. Brunner K., Maric S., Reshma R., Almqvist H., Seashore-Ludlow B., Gustavsson A., Poyraz Ö., Yogeeswari P., Lundbäck T., Vallin M., Sriram D., Schnell R & Schneider G. Inhibitors of the Cysteine Synthase CysM with Antibacterial Potency against Dormant Mycobacterium tuberculosis. *J Med Chem.* (2016). 59 (14) : 6848-5.
20. James K., Lithgow., Emma J., Hayhurst., Gerald Cohen., Aharonowitz Y & Simon J. Role of a Cysteine Synthase in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* (2004) 186 (6) : 1579-90.
21. Campanini B., Pieroni M., Raboni S., Bettati S., Benoni R., Pecchini C., Costantino G & Mozzarelli A. Inhibitors of the sulfur assimilation pathway in bacterial pathogens as enhancers of antibiotic therapy. *Curr Med Chem.* (2015) ; 22 : 187–213.
22. Romero I., Téllez J., Yamanaka L.E., Steindel M., Romanha A.J., & Grisard E.C. Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. *Parasites & vectors.* (2014). : 7, 197.
23. Romero I., Téllez J., Romanha A.J., Steindel M., & Grisard E.C. Upregulation of Cysteine Synthase and Cystathionine  $\beta$ -Synthase Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* (2015). 59 (8) : 4770–4781.
24. Téllez J., Romero I., Soares M., Steindel M & Romanha A. Knockdown of Host Antioxidant Defense Genes Enhances the Effect of Glucantime on Intracellular *Leishmania braziliensis* in Human Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* (2017) 27 ; 61 (7).
25. Gillin, F & Diamond S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp. Parasitol.* (1981) 52, 9–17.
26. Fahey R., Newton G., Arrick B., Overdank-Bogart T & Aley S. *Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science.* (1984). 224, 70–72.
27. Nagpal I., Raj I., Subbarao N & Gourinath S. Virtual screening, identification and in vitro testing of novel inhibitors of O-acetyl-L- serine sulfhydrylase of *Entamoeba histolytica*. (2012). *PLoS ONE* 7:e30305.

28. A. Yagci. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clin Microbiol Infect* (2010) ; 16: 1770–1775
29. Tanya Strateva & Ivan Mitov. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* (2011) 61:717–732
30. Cabrera Y. Adaptación de *Pseudomonas aeruginosa* a la infección crónica en fibrosis quística: identificación de cepas con peptidoglicano de reducida capacidad inflamatoria y/o resistencia a la lisozima. Universitat de les illes balears. (2015).
31. Callicó A., Cedré B., Sifontes S., Torres V., Pino Y., Callís A & Sara C. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor* 1 Año 13 No. 3
32. Tanya S & Ivan M. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* (2011) 61:717–732.
33. Moradali M., Ghods S & Bernd H. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2017). 15 ; 7 : 39
34. Garcia M., Morelloc E., Garnierd J., Barraultd C., Garniera M., Burucoaa C., Lecrona J., Si-Tahar M., Bernardd F & Charles Bodet. *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. (2018). VOL. 9, NO. 1, 1163–1175.
35. WHO. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Ginebra. (2011). [Internet]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf)
36. Parkins M., Somayaji R & Waters V. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* (2018). 31:e00019-18.
37. Ossa A., Echeverri L., Santos Z., García M., Agudelo Y., Ramírez F & Ospina S. Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente en un hospital de alta complejidad. *Rev Chilena Infectol* (2014). 31 (4): 393-399.

38. Restrepo J., Macias I & Ochoa F. Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio*. (2016) ; 20 (2) : 77-83
39. Larry M., Bush M & Perez M. Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados. Last full review/revision. (2018). [Internet]. [Consultado diciembre 2019]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>
40. Dias V., Resende J., Bastos A., Bastos L., Bastos V. Epidemiological, Physiological, and Molecular Characteristics of a Brazilian Collection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. (2017) 23 (7) : 852-863.
41. Jason C., Gallagher J & Satlin. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Multicenter Study. Ceftolozane-Tazobactam for MDR *Pseudomonas*. *Open Forum Infectious Diseases*. (2018).
42. Montravers P., Harpan A & Elise Guivarc. Current and Future Considerations for the Treatment of Hospital-Acquired Pneumonia. *Adv Ther*. (2016). 33 : 151 – 166.
43. Bodia M & Garnacho J. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. *Med Intensiva*. (2007). 31 (2) : 83 - 7.
44. Pintado V. Fármacos antiguos y nuevos en el tratamiento de la infección por bacterias multirresistentes. *Rev Esp Quimioter* (2016) 29 (Suppl. 1) : 39 - 42.
45. Righi E., Peri A., Harris P., Wailan A., Liborio M., Lane S & Paterson D. Global prevalence of carbapenem resistance in neutropenic patients and association with mortality and carbapenem use: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (2017). Volume 72, Issue 3 : 668–677.
46. Heba Y., Al Dawodeyah., Obeidat N., Qatouseh L & Shehabi A. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *GERMS*. (2018). 8 (1) : 31 - 40.
47. Elena B., Fuente B., Núñez E & W.Hancock. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*. (2011). Vol 19, Issue 8 : 419-426.

48. Pang Z., Raudonis R., Glick B., Lin T & Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* (2019) 37 (1) : 177 - 192.
49. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* (2003) 5 (13) : 1213 - 9.
50. Sandoval M. & Aldana. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *WIREs Syst Biol Med.* (2016) 8 : 253 – 267.
51. Beinert, H & Kiley P. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol* (1999). 3 : 152 – 157.
52. Cortes J., Cuervo S., Urdaneta A., Potdevin G., Arroyo P & Bermúdez D. Identifying and controlling a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a Latin-American cancer centre and its associated risk factors. *Braz J Infect Dis.* (2009) 13 (2) : 99 - 103.
53. Dewick P. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach.* Editorial WILEY. Ed. 2 [Internet]. [Consultado noviembre 2019]. Available from: <https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=A4zptjOJfKQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Medicinal+natural+products:+a+biosynthetic+approach&ots=whkrLXOIYg&sig=U5As6CERLHXFLtNuec7QTZ6zj24#v=onepage&q=Medicinal%20natural%20products%3A%20a%20biosynthetic%20approach&f=false>
54. Mukai T., Crnkovic A., Umehara T., Ivanova NN., Kyrpides NC & Söll D. RNAdependent cysteine biosynthesis in bacteria and archaea. *mBio.* (2017). 8 : e00561 - 17.
55. Guédon E & Martin I. Cysteine Metabolism and Its Regulation in Bacteria. In: Wendisch V.F. (eds) *Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering.* (2006) *Microbiology Monographs*, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg.
56. Ochoa R., Flórez A., Muskus C. DETECCIÓN IN SILICO DE SEGUNDOS USOS DE MEDICAMENTOS CON POTENCIAL ACCIÓN LEISHMANICIDA. *Rev. ing. biomed.* (2011). vol.5 no.10

57. Schechner V., Nobre V., Kaye K., Leshno M., Giladi M & Rohner P. Gram negative bacteremia upon hospital admission: when should *Pseudomonas aeruginosa* be suspected?. *Clin Infect Dis.* (2009) ; 48 : 580 – 586.
58. Artimo P, Jonnalagedda M & Arnold K. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* (2012) 40 (Web Server issue) : 597 – 603.
59. El-Gebali S, Mistry J & Bateman A. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47 : 427 – 432.
60. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* (2018) 35 (6) : 1547 – 1549.
61. Vasfi M., Mehdi M., Mohammad R., Mohammad M., Dadashpour D., Navid & Alamian S. Sequencing and In Silico Multi-aspect Analysis of S1 Glycoprotein in 793/B Serotype of Infectious Bronchitis Virus Isolated From Iran in 2003 and 2011. *Archives of Razi Institute.* (2018) 73. 183-198.
62. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J & Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* (2015) 12 (1) : 7–8.
63. Markus W., Manfred J & Sippl. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Research.* (2007). Volume 35, Issue 2 : 407 – 410.
64. Kwofie S., Enninful K & Yussif J. Molecular Informatics Studies of the Iron-Dependent Regulator (ideR) Reveal Potential Novel Anti-*Mycobacterium ulcerans* Natural Product-Derived Compounds. *Molecules.* (2019) 24 (12) : 2299.
65. Bhattacharya M., Hota A & Kar A. In silico structural and functional modelling of Antifreeze protein (AFP) sequences of Ocean pout (*Zoarces americanus*, Bloch & Schneider 1801). *J Genet Eng Biotechnol.* (2018) 16 (2) : 721–730.
66. Ting W & Thomas S. Three-stage Assembly of the Cysteine Synthase Complex from *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* (2012). Vol. 287 N. 6, pp. 4360–4367.

67. Abhishek K., Mary K & Sangaralingam K. Two Distinct Assembly States of Cysteine Regulatory Complex of Salmonella typhimurium are Regulated by Enzyme-Substrate Cognate Pairs. *Biochemistry*. (2017). Vol. 56 No. 18 pp. 2385 - 2399.
68. Enea S., Barbara C., Stefano B., Samanta R., Steven L., Paul F. & Andrea M. A Two-step Process Controls the Formation of the Bienenzyme Cysteine Synthase Complex. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (2010) Vol. 285 No. 17 pp. 12813–1282.
69. Olga S., Olivier P., Jean-Yves C., Antoine D., Tarek M & Isabelle Martin-V. CymR, the master regulator of cysteine metabolism in *Staphylococcus aureus*, controls host sulphur source utilization and plays a role in biofilm formation. *Molecular Microbiology* (2009). 73 (2): 194–211
70. Katharina B., Selma M., Rudraraju S., Helena A., Brinton S., Anna-Lena G., Ömer P., Perumal Y., Thomas L., Michaela V., Dharmarajan S., Robert S & Gunter S. Inhibitors of the Cysteine Synthase CysM with Antibacterial Potency against Dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* (2016). 59 : 6848–6859.
71. Satendra S., Gaurav S., Rohit F., Atul K., Budhayash G & Sunil K. Molecular Dynamic Simulation and Inhibitor Prediction of Cysteine Synthase Structured Model as a Potential Drug Target for Trichomoniasis. *BioMed Research International*. (2013). 15pg.
72. Roberto B., Omar D., Gianluca P., Christopher S., Nina F., Andrea M., Stefano B & Barbara C. Modulation of *E. coli* serine acetyltransferase catalytic activity in the cysteine synthase complex. *Research Letter*. (2017).