



XI CONGRESO LATINOAMERICANO
DE BIOLOGÍA MATEMÁTICA
SoLaBiMa 2019

Universidad Católica del Maule
22-25 de Octubre de 2019, Talca, Chile



Potencialidad metabólica de *Pseudomonas aeruginosa*; Aproximación genómica y proteómica.

Wendy González-Molero*

Centro Nacional de Cálculo Científico (CeCalCULA), Universidad de los Andes, Mérida, 5101, Venezuela.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa, que se caracteriza por su versatilidad metabólica y plasticidad genética, que le permite reproducirse en una amplia gama de ambientes, encontrándose en suelos, aguas, alimentos; así como patógenos o simbiontes en distintas especies de animales y plantas. En los últimos años el interés económico y biotecnológico por esta especie ha aumentado, debido a su aplicabilidad en distintas áreas, como en agricultura, medicina y biotecnología, en el uso como biofertilizantes, control de patógenos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos, producción de toxinas y biorremediación. Para dilucidar el potencial metabólico de esta especie, se realizó una reconstrucción de redes metabólicas basadas en datos genómicos y proteómicos comparándola además con tres especies de *Pseudomonas*: *P. putida*, *P. syringae* y *P. fluorescens* que representan organismos con diferentes estilos de vida, biorremediadora, fitopatógena y rizobacteria respectivamente. A partir de información bibliográfica y bases de datos metabólicas, se evaluaron rutas centrales y rutas secundarias como: producción de toxinas, sideróforos, biopolímeros, fenacinas, biopelículas, degradación de compuestos aromáticos y factores de virulencia, donde se determinaron tres rutas metabólicas fundamentales para el desarrollo y establecimiento de la patogenicidad en esta especie.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, redes metabólicas, genómica, proteómica y metabolismo secundario

Trabajo en conjunto con:

Ascanio Rojas, 1 Centro Nacional de Cálculo Científico (CeCalCULA), Universidad de los Andes, Mérida, 5101, Venezuela.

Héctor Acosta, 2 Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP), Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, 5101, Venezuela.



*1er-email: fabiolamg123@gmail.com

2do-email: bioinfo.cecalcula@gmail.com

3er-email: hectoracosta@ula.ve

INTRODUCCIÓN

P. aeruginosa es un patógeno oportunista, con gran versatilidad metabólica que le permite crecer en diferentes ambientes. Es uno de los mayores responsables de infecciones nosocomiales, afecta principalmente a pacientes inmucomprometidos y con fibrosis quísticas, causando infecciones respiratorias crónicas [1]. Esta especie se ha caracterizado por una alta resistencia a antibióticos y por usar diversos factores de virulencia para su supervivencia, que incluyen la colonización e infección (flagelos, pili y biopelículas), adquisición de nutrientes (fosfolipasas, exoproteasas, sideróforos) y moduladores de la respuesta inmune del hospedador [2]

La necesidad de nuevos métodos que inhiban eficazmente la infección y eviten el desarrollo de resistencia por esta bacteria es de suma importancia. Las técnicas más prometedoras incluyen la terapia dirigida a la inhibición de los factores de virulencia, ya que contribuyen a la supervivencia y desarrollo de la bacteria.

La reconstrucción de las vías metabólicas ha sido durante años un trabajo fundamental de la bioquímica clásica, que se basa generalmente en una descripción química y fisiológica del funcionamiento celular. Donde la información obtenida expresa la capacidad metabólica de una célula u organismo, que a su vez es el resultado de la acción coordinada de las enzimas expresadas bajo ciertas condiciones en un momento dado del ciclo celular, y cada una de las conversiones bioquímicas correspondientes puede identificarse directamente mediante ensayos enzimáticos, o indirectamente, a partir de la secuencia del genoma, por medio de una relación de similitud con proteínas cuya función ha sido dilucidada previamente [3].

Sin embargo, predecir o reconstruir una vía completa para una especie determinada mediante la bioquímica clásica resulta complicado, ya que requiere la disponibilidad de enzimas acoplantes, sustratos y/o productos, así como la infraestructura y equipamiento para medir la actividad enzimática [3].

La biología de sistemas integra los nuevos enfoques experimentales (ómicas) y computacionales para alcanzar el objetivo global de explicar y predecir comportamientos celulares complejos de los sistemas biológicos [4]. La reconstrucción de redes metabólicas en *P. aeruginosa* permitió una integración de datos disponibles en la Web, donde se encontraron diversos factores únicos que contribuyen al establecimiento, desarrollo y patogenicidad que podrían ser utilizados como blancos terapéuticos para combatir infecciones producidas por esta especie, como producción de las fenacinas, sideróforos, toxinas y biopelícula a partir de *Quorum sensing*.

Este enfoque no había sido realizado en forma generalizada y comparativa para esta especie, además, las 3 especies seleccionadas para el estudio comparativo, juegan un papel fundamental en la aplicabilidad de esta investigación, puesto que poseen diferentes formas de vida, por lo que

se estima, que poseen un metabolismo contrastante y acorde a su expresión fenotípica. Se estableció como objetivo general, reconstruir modelos de redes metabólicas secundarias relacionadas a los mecanismos de patogenicidad a partir del genoma y proteoma de *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la secuencia de referencia (RefSeq) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) código de acceso NC_002516 [5]. Para los análisis comparativos con otras especies de *Pseudomonas* se utilizaron las secuencias de referencia de *Pseudomonas putida* KT2440 código de acceso NC_002947.4 [6], *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, código de acceso NC_007005.1 [7] y *Pseudomonas fluorescens* F113 Bajo en código de acceso NC_016830.1 [8].

Para comprobar la potencialidad génica y obtener modelos metabólicos más acertados, se realizó un análisis proteómico comparativo entre las cuatro especies de estudio, mediante la herramienta *Proteome Comparison* de la base de datos *SYSTOMONAS genome DB* [9], que utiliza el algoritmo de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [10] con un *e-value* máximo de 10^{-5} , por lo que aquellas proteínas que muestren alta cobertura, identidad y bajo valores de *e-value* se anotaron como posibles secuencias homólogas. De esta manera se pudo obtener información sobre las proteínas únicas, y compartidas de *P. aeruginosa* con las demás especies.

Para identificar la ruta metabólica a la que pertenece cada enzima, producto o sustrato, se hizo uso de las bases de datos, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, [11] que genera una representación informática de sistemas biológicos. Mediante genomas, reacciones enzimáticas y compuestos químicos, Reactome [12], basado en reacciones, vías y procesos biológicos respaldados por referencias bibliográficas que contienen una verificación experimental del proceso representado, String [13] que tiene como objetivo recopilar e integrar datos de interacciones funcionales entre proteínas expresadas mediante la asociación proteína-proteína conocidas y previstas para un gran número de organismos, BioCyc [14] que predice vías metabólicas a partir del genomas completos de todos los dominios de la vida, incluyendo metabolitos, enzimas, reacciones, operones, sistema de transporte y AmiGO [15] que permite describir genes y productos génicos, basado en ontologías. Con la información obtenida de estas bases de datos y referencias bibliográficas se realizaron tablas de genes, proteínas y reacciones enzimáticas, con el propósito de ordenar cada ruta metabólica.

Para la búsqueda de genes y proteínas de las diferentes rutas metabólicas, tanto en *P. aeruginosa*, como en las demás especies, se utilizó el algoritmo BLAST-nucleótido (BLASTn) y

BLAST-Proteína (BLASTp) del NCBI [10]. Para aquellos marcos abiertos de lectura (CDS del inglés *coding sequence*) que no estaban anotados para ninguna función o gen se realizó una búsqueda en los programas HMMER [16], que se basa en búsquedas de similitud de secuencias de proteínas utilizando métodos probabilísticos de modelos ocultos de Markov y la base de datos de perfiles proteicos Pfam [17] que proporciona información de familias de proteínas curadas y sus perfiles estructurarles mediante el alineamiento de secuencias conocidas, con el fin de identificar posibles patrones, motivos y sitios funcionales que dieran información sobre la función de estas regiones codificantes. Estas búsquedas fueron corroboradas haciendo uso de PSI-BLAST que realiza comparaciones en búsqueda de homólogos con otros organismos.

En el caso de rutas incompletas (donde no se hallaron algunas enzimas), se evaluó los posibles destinos de los sustratos y productos para inferir la participación de estos en otras rutas metabólicas, de esta manera se aseguró que a pesar de ser rutas posiblemente truncadas, pueden tener una funcionalidad en rutas alternas. Todo esto mediante las bases de datos BRENDA (*BRAunschweigENZymeDAtabase*) [18], que proporciona información enzimática y metabólica, basada en literatura primaria y ChEBI [19], basada en datos de compuestos químicos.

La información obtenida se organizó en tablas de presencia o ausencia de genes o proteínas, que sirvió de base para elaborar diagramas de Venn, que permitió agrupar las 4 especies de *Pseudomonas*, según los genes o proteínas compartidas en las diferentes rutas metabólicas. Además, se examinó la organización génica aguas arriba y aguas abajo de los genes de interés (aproximadamente regiones de 5000 pb) con el fin de analizar sitios conservados, grupo de genes, inserciones, deleciones o cualquier modificación genómica que proporcione información sobre las diferencias metabólicas de estas especies.

Finalmente se reconstruyeron rutas metabólicas centrales y secundarias, a partir de modelos disponibles en las bases de datos antes mencionadas y referencias bibliográficas. Donde se conectaron ambas rutas mediante metabolitos y enzimas. En algunos casos se propusieron nuevas aproximaciones teóricas de modelos metabólicos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron 3560 búsquedas en BLASTp y BLASTn, para evaluar 1.780 genes involucrados rutas metabólicas centrales y secundarias. Se descargó de la base de datos de *Systomonas genome DB* un total de 5572 proteínas *P. aeruginosa*, donde 162 proteínas son únicas de esta especie y se encontró que posee 4206 proteínas compartidas con *P. putida* KT2440, 4034 proteínas compartidas con *P. syringae* pv. *syringae* B728a y 4340 proteínas compartidas con *P. fluorescens* SBW25. Finalmente, se reconstruyeron todas las rutas metabólicas, obteniendo un total de 297 enzimas y proteínas

Biosíntesis de Sideróforos:

Los sideróforos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y establecimiento de las bacterias del genero *Pseudomonas*, permitiendo colonizar nuevos ambientes y competir con otros organismos, puesto que son agentes quelantes que secuestran hierro férrico y los transportan al interior celular. En este sentido, se encontró que las especies *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* poseen las enzimas EntB, EntD, EntE y EntF, involucrados en la biosíntesis de enterobactina, un sideróforo inicialmente caracterizado en enterobacterias.

Al evaluar detalladamente esta ruta, se observó la ausencia de la enzima EntA en estas dos especies, que produce 2,3-dihidroxibenzoato, un metabolito fundamental para la formación de la enterobactina. Sin embargo, se determinó que este intermediario en ambas especies puede ser producido por la enzima OpaB involucrada en la degradación de ftalatos, por lo que se estima que estas especies son capaces de producir enterobactina, cuando crece en hidrocarburos o intermediarios de estos compuestos (Figura 1).

Asimismo, todas las especies poseen los genes PchA, PchB, PchD, PchC y PchF para la producción inicial del sideróforo Piocelina. Sin embargo, sólo *P. aeruginosa* posee el gen PchG que le permite el ensamblaje final de este compuesto (Figura 1). A pesar de ello, las demás bacterias tienen la posibilidad de producir ácido aeruginóico, que también es excretado y se cree que tiene propiedades de biocontrol [20].

Se ha determinado que los sideróforos también juegan un papel fundamental en la virulencia de *P. aeruginosa*, pues además de permitir la captación de hierro y disminuir las concentraciones de este compuesto en el hospedador, también actúa como molécula de señal (caso de pioverdina), desencadenando la producción de dos factores de virulencia extracelular, la proteasa PrpL y la exotoxina A [21]. Y en el caso de la piocelina, en infecciones crónicas, modula la respuesta inflamatoria y causa daño a los tejidos [2]

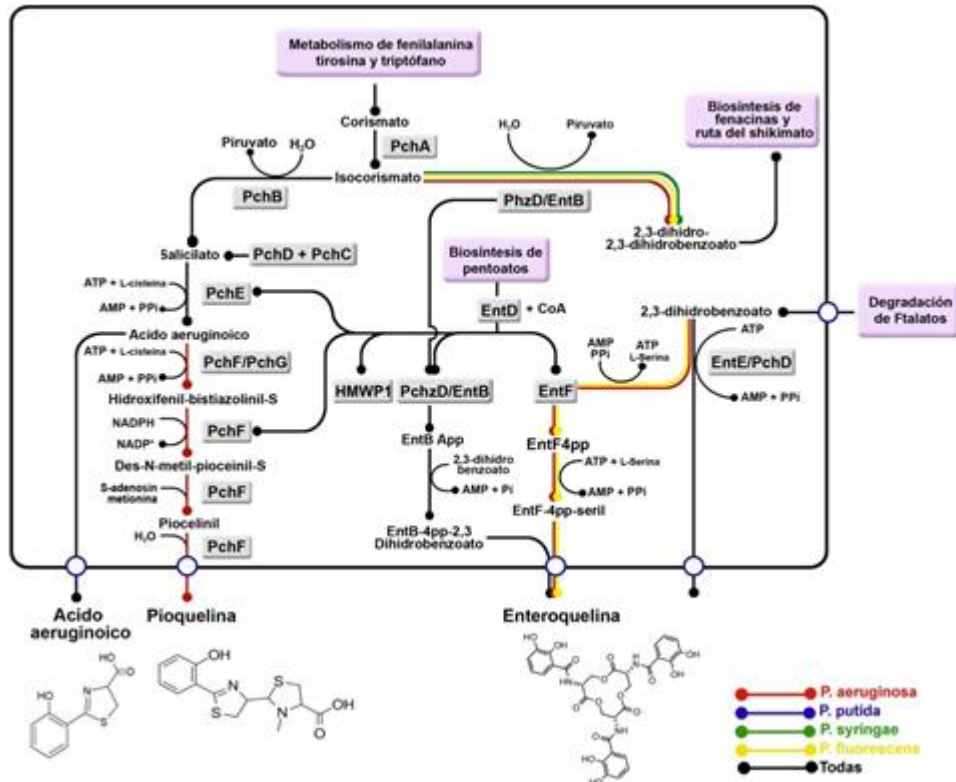


Figura 1. Síntesis de sideróforos, Enterobactina, Pioquelina y Ácido Aeruginóico. PchD/EntB/HMWP1. 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato sintetasa/isocorismatoliasa, EntF. L-serina a seril-AMP, EntD/YbtD. Fosfopantiletiniltransferasa, EntE/PchD. 3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa, PchA. Isocorismatopiruvatoliasa, PchB. Isocorismatopiruvatoliasa, PchE. Ácidodihidroaeruginóicosintetasa, PchF. Metiltransferasa/sintetasa, PchG. Tiazolinilreductasa.

Biosíntesis de Fenacinas:

La producción de fenacinas proporciona características distintivas al género *Pseudomonas*, ya que por ser compuestos heterocíclicos nitrogenados, tienen la capacidad de interferir en diversas funciones biológicas involucradas en la patogenicidad y competencia, que contribuyen al óptimo desarrollo de las especies con capacidad de sintetizar estos compuestos a partir de la ruta del Shikimato. En relación a esto, se encontró que *P. aeruginosa*, puede producir Pilocianina (PYO), 5-metil-fenacina-1-carboxilato (5MPCA), fenacina-1-carboxilato (PCA) y 1-hidroxifenacina (1-OH-PHZ) (Figura 2).

La enzima que produce PYO y 5MPCA, una flavinmonooxigenasa (PhzS), está presente exclusivamente en esta especie, lo que lo hace muy interesante objeto de estudio, ya que se ha demostrado que PYO y 5MPCA, generan diversos efectos fisiopatológicos observados en las vías respiratorias infectadas por *P. aeruginosa*. Algunos de ellos son: regulación del transporte de iones, frecuencia de los latidos ciliares, secreción de moco en las células epiteliales de las vías respiratorias al alterar la concentración citosólica de calcio, control de la presión arterial, flujo sanguíneo y la función inmunológica, estimulando macrófagos alveolares para producir dos quimiotaxinas de neutrófilos, IL-8 y leucotrieno B4, que atraen a los neutrófilos hacia las vías

respiratorias, causando una respuesta inflamatoria y daños en los tejidos mediados por los neutrófilos [22].

Se cree que el rango inusualmente amplio de la actividad biológica asociado a las fenacinas se debe a su capacidad para realizar un ciclo redox en presencia de varios agentes reductores y oxígeno molecular, lo que conduce a la acumulación de superóxido tóxico (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y eventualmente a lesiones de células oxidativas o muerte [23]. También se ha demostrado que la piocianina puede interactuar de forma sinérgica con el sideróforo piocelina y con la transferrina, escindida por proteasas secretadas tanto por *P. aeruginosa* como por neutrófilos en pulmones infectados, para catalizar la formación del radical hidroxilo altamente citotóxico (OH), que daña el endotelio pulmonar [24].

En cuanto a las demás especies, se halló que todas poseen las enzimas PhzC, PhzD, PhzE, PhzF y PhzG, a excepción de *P. putida* que no posee la isocorismatasa (PhzD), estas enzimas producen a partir del corismato el ácido 6-amino-5-oxo-ciclohex-2-ene-1-carboxílico. Sin embargo, la presencia de estos genes no aporta evidencia de la posible producción de fenacinas, por parte de estas bacterias, ya que se sabe, que estas enzimas también están involucradas en otras rutas metabólicas, como la síntesis de sideróforos, metabolismo del Shikimato y metabolismo de aminoácidos.

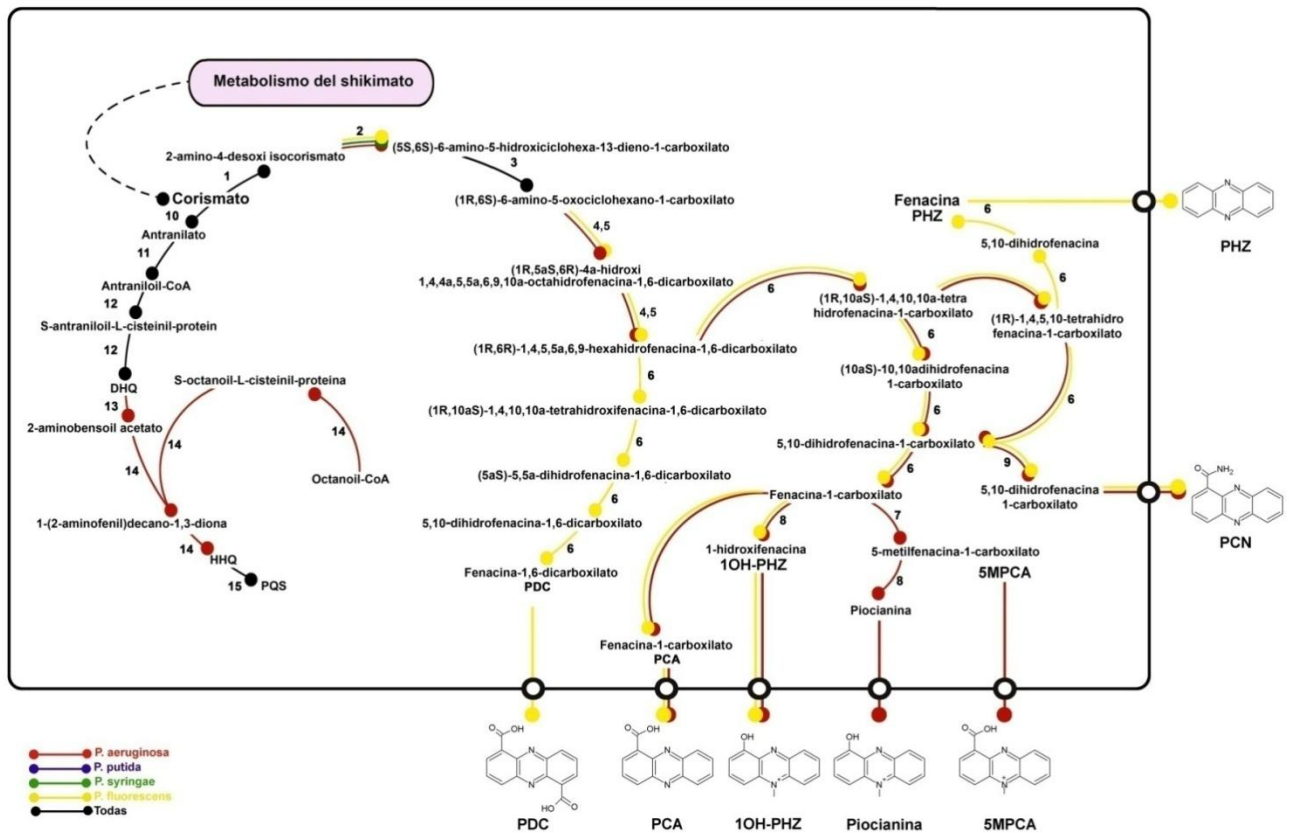


Figura 2. Síntesis de Fenacinas. 1. **PhzE**, Antranilato/para-amino benzoato sintetasa; 2. **PhzD**, isocorismatasa; 3. **PhzF**, trans-2,3-dihidro-3-hidroxiantranilato isomerasa; 4. **PhzB**, 5 **PhzAB**, Sintetasas de fenacinas; 6. **PhzG**, dihidrofenacinadicarboxilatosintasa/piridoxamina 5'-fosfato oxidasa; 7. **PhzM**, metiltransferasa; 8. **PhzS**, 5-metilfenacina-1-carboxilato 1-monooxigenasa; 9. **PhzH**, asparaginasintasa; 10. **PhnAB**, Antranilatosintetasa; 11. **PqsA**, AntranilatoCoAligasa; 12. **PqsD**, antraniloil-CoA antraniloiltransferasa; 13. **PqsE**, 2-aminobenzoilacetil-CoA Tioesterasa; 14. **PqsC/PqsB**, 2-heptil-4(1H)-quinolonasintetasa malonil-CoA; 15. **PqsH**, 2-heptil-3,4-dihidroxiquinolina sintasa; **PCA**, fenacina-1-ácido carboxílico; **PCN**, fenacina-1-carboxamida; **1-OH-PHZ**, 1-hidroxifenacina; **5MPCA**, 5-metil-fenacina-1-carboxilato; **PYO**, Piocianina; **PHZ**, Fenacina; **PDC**, fenacina 1,6-dicarboxílico.

Quórum Sensing y Biopelícula.

El mecanismo más relevante utilizado por esta especie para el desarrollo de la virulencia es la señalización por *quórum sensing* (QS) y producción de biopelículas. El *quórum sensing* es un mecanismo que permite a las bacterias, comunicarse mediante pequeñas moléculas de señalización (autoinductores), para coordinar la expresión génica en respuesta a la densidad poblacional. Dentro de los genes regulados por este mecanismo destacan, la producción de biopelículas, genes de patogenicidad, resistencia, producción de toxinas y biosurfactantes, que varía entre las cuatro especies de estudio, según la capacidad de producir y reconocer distintos autoinductores [25].

El sistema QS de *P. aeruginosa* es altamente complejo y está controlado por los sistemas de acil-homoserinalactona (AHL, que varían según el número de carbonos), sintetetasas (LasI-Las) y RhII-RhIR- LasR, presente en otras especies de *Pseudomonas* y el sistema mediado por la señalización de quinolona único para esta especie. Este sistema produce a partir del corismato, los autoinductores 2-heptil-4-quinolona (HHQ) y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) con las enzimas 2-aminobenzoilacetil-CoA tíoesterasa (PqsE) y 2-heptil-4(1H)-quinolonasintetasa (PqsB) que también representan un excelente blanco de estudio en la virulencia de esta especie, debido a que se sabe que además este sistema regula la producción de sideróforos y fenacinas mencionadas anteriormente.

Además posee una tercera molécula autoinductora, las fenacinas (PHZ), se producen de igual manera a partir del corismato, en las especies estudiadas se encontró que sólo dos de estas (*P. fluorescens* y *P. aeruginosa*) tienen la capacidad de producir distintos tipos de fenacinas. La transcripción de estos genes se produce cuando se transcriben los genes del operón PQS, estimulados por los factores de transcripción PqsR o LasR.

El *quórum sensing* también interviene en la formación de biopelículas, una matriz extracelular polimérica hidratada, autoproducida y compartida por toda la comunidad de células bacterianas que otorga a las bacterias una mejor aptitud ambiental, que puede desencadenar en una mayor resistencia a antibióticos y sustancias tóxicas, limitaciones del agua y depredación [26], [27]. Esta matriz está generalmente compuesta por alginato, polisacáridos (psl), fimbrias, pilis y sistemas de secreción y en el caso de *P. aeruginosa* también poseen ramnolípidos, lectinas y glicolípidos

(pel. Por lo tanto, existen diferencias significativas en cuanto a la composición de la matriz polimérica que conforma la biopelícula secretada por cada una de estas especies.

Estos sistemas han sido el foco de esfuerzos para crear antagonistas de QS que podrían inhibir las infecciones producidas por *P. aeruginosa*. A pesar de esto, la naturaleza de estas rutas bastante compleja, adicionalmente los distintos aislados clínicos presentan diferentes mecanismos de invasión que producen desconcierto a la hora de predecir algún patrón. Entender el funcionamiento de este mecanismo es necesario no solo para entender cómo esta bacteria coloniza al hospedador, sino también para dirigir los esfuerzos de desarrollo de fármacos hacia los objetivos apropiados.

En esta investigación no sólo se evaluaron los genes y proteínas asociados a los factores de virulencia, también se analizó la producción de estos compuestos ligados al metabolismo central, de esta manera se pueden identificar blancos terapéuticos que inhiban solo los factores de virulencia y no que afecten el crecimiento y desarrollo de la especie. Esto resulta de gran importancia, debido a que *P. aeruginosa*, no sólo es una especie patógena, también posee características útiles para la biorremediación y biocontrol de patógenos en plantas convirtiendo a esta especie en un excelente microorganismo para el uso biotecnológico si se elimina su actividad patogénica.

CONCLUSIÓN

Con el uso de ciencias ómicas, biología computacional y enfoques en biología de sistemas se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* posee tres rutas metabólicas con enzimas y proteínas únicas (fenacinas, sideróforos y *Quórum sensing*) que actúan como mecanismos de infección y virulencia, que representan un excelente blanco de estudio para controlar esta especie en pacientes con infecciones intrahospitalarias, fibrosis quística e inmunocomprometidos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warren, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., y Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964.
- [2] Lyczak, J.B., Cannon, C.L. y Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2: 1051–1060.
- [3] Durot, M., Bourguignon, P.Y. y Schachter, V. (2008). Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 33(1):164–90. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00146.x
- [4] Hyduke, D.R., Lewis, N.E. y Palsson, B. (2013). Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism. *Mol Biosyst.* 167–174. doi:10.1039/c2mb25453k
- [5] Pruitt KD, Tatusova T y Maglott DR (2005). NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 33 (Base de Datos): D501–4. doi : 10.1093 / nar / gki025 .
- [6] Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 4: 799–808

- [7] Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., Di Bartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A. y Trong, S., (2005). Comparison of the complete genomesquences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *ProcNatlAcadSci U S A*. 2;102(31):11064-11069.
- [8] Redondo-Nieto, M., Barret, M., Morrissey, J.P., Germaine, K., Martínez-Granero, F., Barahona, E., Navazo, A., Sánchez-Contreras, M., Moynihan, J.A., Giddens, S.R., Coppoolse, E.R., Muriel, C., Stiekema, W.J., Rainey, P.B., Dowling, D., O'Gara, F., Martín, M. y Rivilla, R.(2012) Genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol.* 194(5):1273-4. doi: 10.1128/JB.06601-11.
- [9] Choi, C., Münch, R., Leupold, S., Klein, J., Siegel, I., Thielen, B., Benkert, B., Kucklick, M., Schobert, M., Barthelmes, J., Ebeling, C., Haddad, I., Scheer, M., Grote, A., Hiller, K., Bunk, B., Schreiber, K., Retter, I., Schomburg, D. y Jahn, D. (2007). SYSTOMONAS and integrated database for systems biology analysis of *Pseudomonas*. *NucleicAcids Res.* 35(Base de Datos):D533-7. doi: 10.1093/nar/gkl823.
- [10] Mc Ginnis, S. y Madden, T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools, *NucleicAcids Res.* 32:W20-W25 (Base de Datos)
- [11] Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M. y Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *NucleicAcids Res* vol. 34 (pg. D354-D357) (Base de Datos).doi:10.1093/nar/gkj102.
- [12] Croft, D., Mundo, A.F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M.R., Jassal, B., Jupe, S., Matthews, L., May, B. y Palatnik, S., Rothfels, K., Shamovsky, V., Song, H., Williams, M., Birney, E., Hermjakob, H., Stein, L. y D' Eustachio, P. (2014) . The Reactome pathway knowledge base. *NucleicAcids Res.* 42 (Base de Datos). D472-7. doi:10.1093/nar/gkt1102.
- [13] Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P. Jensen, L.J. y Von Mering, C. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *NucleicAcids Res.* 45(D1):D362-D368. (Base de Datos) doi: 10.1093/nar/gkw937.
- [14] Caspi, R., Billington, R., Fulcher C.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Midford, P.E., Ong, Q., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P. y Karp, P.D. (2018). The Meta Cyc database of metabolic pathways and enzymes. *NucleicAcids Res.* 46(D1); D633-D639. PMID: 29059334
- [15] Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., Shu, S., Marshall, B. y Lewis, S. (2009). AmiGOHub; Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics.* *NucleicAcids Res.* 25(2):288-289. (Base de Datos) doi: 10.1093/bioinformatics/btn615.
- [16] Finn, R.D., Clements, J. y Eddy, S.R. (2011). HMMER Web server: interactive sequence similarity searching. *NucleicAcids Res.* 39W29-37. (Base de Datos) doi: 10.1093/nar/gkr367.
- [17] Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J. y Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *NucleicAcids Res.* 42(Base de Datos). D222-30.doi: 10.1093/nar/gkt1223.
- [18] Schomburg, I., Chang, A., Ebeling, C., Gremse, M., Heldt, C., Huhn, G. y Schomburg, D.(2004). BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments, *NucleicAcids Res.* vol. 32 (pg. D431-D433) (Base de Datos)
- [19] Degtyarenko, K., de Matos, P., Ennis, M., Hastings, J., Zbinden, M., McNaught, A., Alcántara, R., Darsow, M., Guedj, M. y Ashburner, M. (2008). ChEBI: a database and ontology for chemical entities of biological interest. *NucleicAcids Res.*36 (Base de Datos) D344-50.
- [20] Serino, L., Reimmann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V. D. y Hass, D. (1997) Biosynthesis of Pyochelin and Dihydroaeruginic Acid Requires the Iron-Regulated pchDCBA Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, p. 248–257 Vol. 179, No. 10021
- [21] Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I. y Vasil, M.L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. NatlAcadSci. Estados Unidos* . 99, 7072-7077. doi: 10.1073 / pnas.092016999
- [22] Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G. y Thomashow, L.S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 183(21):6454-6465.
- [23] Hassan, H.M. y Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* 141:156–163.
- [24] Britigan B.E., Rasmussen G.T. y Cox C.D. (1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect. Immun.* 65:1071–1076.
- [25] Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. y Salmond, G.P.C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS MicrobiolRev* 25:365-404.
- [26] Heeb, S., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Diggie, S.P., Williams, P. y Cámara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol. Ap.* 35, 247–274. doi: 10.1111 / j.1574-6976.2010.00247.x
- [27] Winsor, G.L, Lam, D.K.W, Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D. y Yu, N.Y. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *NucleicAcids Res.* 39, D596 – D600. doi: 10.1093 / nar / gkq869