UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Reutilización de herbicidas que inhiben la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) como nuevos agentes antimicrobianos contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Fernando Israel Minuche López

Nicole Alejandra Vásconez López

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Julio – 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de junio de 2025

Firmado electrónicamente por:
MARIO DANIEL GARCIA SOLIS
Validar únicamente con FirmaEC

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Fernando Israel Minuche López y Nicole Alejandra Vásconez López, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Fernando Israel Minuche López
1805802400
AUTOR



Nicole Alejandra Vásconez López
1850095710
AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Fernando Israel Minuche López
1805802400
AUTOR



Nicole Alejandra Vásconez López
1850095710
AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LANDER VINICIO PEREZ ALDAS
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
ALEX FABIAN VALENCIA SILVA
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. Alex Fabián Valencia Silva

1803121084

Firmado electrónicamente por:
WILLIAM RICARDO CALERO CACERES
Validar únicamente con FirmaEC

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

1714348859

Ambato, 07 de julio de 2025

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación es la culminación de casi cinco años de vida universitaria, una etapa que nunca olvidaré. Nada de esto habría sido posible sin mis padres, quienes han sido el motor de mi vida, me han apoyado, aconsejado, escuchado y nunca me han dejado solo. Este logro no es otra cosa que el fruto de todo el amor que han depositado en mí. Agradezco a Dios por haberme dado a los mejores padres que podía haber deseado. Quiero seguir haciéndolos sentir orgullosos hasta el último día que los tenga a mi lado.

También este trabajo se lo dedico a mi hermano Alejo, quien ha sido mi inspiración y modelo a seguir desde que tengo memoria. Tu apoyo ha sido indispensable para lograr esto y, créeme, que, a pesar de la distancia, estás presente en cada paso que doy; estás presente en lo que soy.

A mi familia en general, que me ha aceptado con mis virtudes y defectos, que ha demostrado su amor hacia mí de tantas formas que me sería imposible explicar todas. Los amo infinitamente. Sé que siempre contaré con ustedes, en las buenas y en las malas.

Finalmente, lo dedico a la memoria de mi segunda madre, mi mamita Rosa, quien, aunque ya no esté, la llevo presente en mi día a día. Sé que estaría muy orgullosa de mí, de ver cómo su karisito ha crecido y del hombre en el que se ha convertido. Me faltará vida para agradecerte por todo lo que hiciste por mí. Te extraño demasiado. Te amo y te amaré por siempre, mi viejita.

Fernando Israel Minuche López

DEDICATORIA

"Si Dios puso sueños en tu corazón, también te dará las fuerzas para lograrlos"

A mis padres por su amor tan genuino y sincero que me lo demuestran día a día en cada cosa que hacen por mí.

A mi hermano por su apoyo incondicional y por ser mi compañía más bonita en estos 22 años.

A mi familia porque su cariño siempre está presente a pesar de la distancia.

A mis amigos por ser el regalo más lindo que me dejó la universidad.

Con todo mi amor y gratitud, a todos ustedes porque han sido mi inspiración, mi fortaleza y la razón que me impulsó a seguir adelante a lo largo de este camino.

Nicole Alejandra Vásconez López

AGRADECIMIENTO

Durante este camino universitario, muchas personas han dejado su huella en mí. Estoy profundamente agradecido con cada una de ellas; a continuación, nombraré a quienes han sido parte importante de esta etapa de mi vida.

Mil veces agradeceré a mis padres y, aun así, no serán suficientes.
A Janeth, mi mamá, quien, a pesar de las adversidades de la vida, los altos y bajos, siempre ha estado para mí con una palabra de aliento, un abrazo o un beso. Te amo mucho, madre, ojalá me duraras para siempre.
A Kleber, mi papá, por tu positivismo incluso en las circunstancias más difíciles, por enseñarme a confiar en Dios incondicionalmente y por tu preocupación por mi bienestar. Espero algún día ser un padre, hijo, esposo y hombre tan bueno como tú.
Agradezco a mis hermanos Alejandro, Gabriel y Daniela, quienes, con sus chistes, burlas, peleas y consejos, han sido un pilar fundamental en mi vida. Los amo, hermanos.
A mi tía, Nelly. Por su preocupación, comprensión, apoyo y, simplemente, por quererme como a un hijo más. De todo corazón, gracias, tía querida.
A mi gata, un regalo del cielo que hizo más llevaderos los días difíciles y fue también mi compañía en las noches de desvelo a lo largo de mi vida universitaria.

A mis incondicionales Jael, Vale, Paúl, gracias por demostrarme que existen las amistades verdaderas, por siempre acompañarme y apoyarme; por sus chistes, experiencias vividas y todo lo que hemos pasado juntos. Son recuerdos que atesoraré para siempre, mis burritos. No sé qué nos tenga la vida a cada uno, pero sin importar dónde estemos, deseo seguir siendo parte de sus vidas.

A Christian, que, aunque su estancia en la carrera fue corta, es una de las amistades más importantes que conservo. Gracias a ti y a tus padres por abrirme las puertas de su hogar y hacerme parte de ella, gestos que aprecio de corazón.

A mis amigos que en algún momento compartimos aulas, pasillos y laboratorios: Elizabeth, Víctor, Madeleine, Paula, Belén, Leslie, Juan, Sebastián, Johanna, Ángel, Angie, Jennifer, Yadira, Pamela, Ivanova, Daniela, Kevin, Paola. Gracias por brindarme su amistad y por haber formado parte de mi vida universitaria.

A Sebas, Pinky, Gaby y Stephy, quienes, más que amigos, han sido como mis hermanos en muchas ocasiones. Espero seguir contando con su cariño por muchos años más.

A mis compañeros de laboratorio quienes hicieron de mi experiencia allí un recuerdo imborrable. y en especial a Vivi. Gracias por haberme permitido aprender de ti y por enseñarme con paciencia y dedicación por más que a veces sea difícil hacerlo.

A mi tutor, PhD. Mario García, por su paciencia, guía, apoyo constante durante la realización de este proyecto y por haberme permitido aprender de él. Gracias por su confianza y haber visto en mí más allá de lo visible. Me llevo de usted y la Dra. Liliana Cerda conocimiento valioso que sin duda me será útil en mi vida profesional y personal.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mi mejor amiga, compañera, confidente y consejera: Nicole. Por tu amistad, un regalo que valoro profundamente; por tu paciencia, tu comprensión, tus jalones de orejas. Valoro mucho que estés en mi vida y gracias por haber sido la mejor compañera que pude haber tenido en la realización de este proyecto.

De todo corazón, Fernando

AGRADECIMIENTO

A Dios, por su amor incondicional, por la vida que me regaló y por haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí junto a personas tan maravillosas.

A mi mami, por ser un ejemplo de lucha y valentía; una mujer fuerte y trabajadora que siempre busca lo mejor para nuestra familia. Por siempre apoyarme y estar para mí a pesar de mis errores, por ser mi mejor amiga y sobre todo por tu amor y tus enseñanzas, ya que sin ellas no sería la persona que soy ahora. A mi papi, por enseñarme que la mejor herramienta en la vida es ser una buena persona. Por todas tus bromas, peleas y ocurrencias que alegran mis días. Por tu amor incondicional, por cuidarme y por siempre ir por mí hasta donde yo estuviera. A mi hermano, por todos los momentos de risas, vergüenzas, peleas, tristezas e idas a comer que hemos compartido. Por buscar la manera de ayudarme y darme ánimos a pesar de la distancia. Por ser mi confidente y por confiar en mí.

A mis abuelitos, por estar pendientes de mí, por todos sus cuidados y su amor. A mi familia, por la unión tan grande que tenemos que hace que enfrentar cualquier dificultad se vuelva más sencillo. A mis dos perritos, por la alegría con la que me reciben al llegar a casa y porque con su amor tan puro hacen mi vida más feliz.

A mi tutor, el Dr. Mario García, por enseñarme y guiarme en este proceso. Por su paciencia, su apoyo y sobre todo por confiar en mí y darme la oportunidad de seguir aprendiendo cosas nuevas. De igual manera, a la Dra. Liliana Cerda, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme ser parte de esta linda familia. Son profesionales y seres humanos a quienes admiro profundamente.

A mis compañeros de laboratorio, por su calidad humana y por siempre estar prestos a ayudar. Agradezco especialmente a Alex por todas sus enseñanzas y a Vivian por su ayuda, sus consejos, sus regaños, los momentos de risas en el laboratorio y por su linda amistad. Son excelentes profesionales, pero sobre todo maravillosas personas.

A mi compañero de tesis y mejor amigo Fernando, porque, a pesar de que esto fue inesperado para ambos, nada habría sido lo mismo sin ti. En este camino me enseñaste el valor de la paciencia, empatía, comunicación, compromiso y especialmente, trabajo en equipo. Aunque, con miles de desacuerdos lo estamos logrando juntos. Gracias por confiar en mí, por mostrarme a ese Fer que pocos conocen y especialmente, por demostrarme que la amistad verdadera si existe y puede crecer incluso en medio del caos.

A mi mejor amiga, Melanie, gracias por apoyarme, entenderme y estar para mí todos estos años. Por enseñarme que no es necesario vernos seguido para saber que siempre podremos contar la una con la otra. Gracias por abrirme las puertas de tu hogar y hacerme sentir en familia. Te quiero mucho.

A mi grupo de amigos (somos tres ni al caso), Jae, Pol y Vale, por su amistad sincera, por sus ocurrencias y por todos los momentos que compartimos desde el inicio de este viaje. A mis inges de confianza, Eri, Made P. y Angelito, aunque la carrera nos llevó por caminos un poco distintos, agradezco mucho el haber coincidido con ustedes y contar con su linda amistad. A Ulises, Made G., Víctor, Sebas, Joha, Jenny, Paula, Roger, Aileen, Chris, Richi, Kevo, Les, Julio y Pancho por permitirme ser parte de sus vidas y hacer que esta etapa esté llena de recuerdos inolvidables.

A mis profesores, quienes con paciencia y sabiduría despertaron en mí la curiosidad por aprender. Gracias por su guía constante en mi formación y por contribuir en mi desarrollo personal y académico.

Con mucho amor, Nicole

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ..... **ii**

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ..... **iii**

DERECHOS DE AUTOR ..... **iv**

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... **v**

DEDICATORIA ..... **vi**

DEDICATORIA ..... **vii**

AGRADECIMIENTO ..... **viii**

AGRADECIMIENTO ..... **ix**

ÍNDICE DE TABLAS ..... **xiii**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **xiv**

RESUMEN EJECUTIVO ..... **xv**

ABSTRACT ..... **xvi**

CAPÍTULO I **1**

MARCO TEÓRICO **1**

1.1 Antecedentes investigativos 1

1.1.1 Generalidades 1

1.1.2 Resistencia Antimicrobiana: bases, mecanismos y patógenos prioritarios 2

1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiología 3

1.1.4 Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* 4

1.1.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa* 6

1.1.6 Estrategias terapéuticas actuales frente a *Pseudomonas aeruginosa* y perspectivas hacia nuevas dianas antimicrobianas 9

1.1.7 Enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) 10

1.1.8 Inhibición de la enzima AHAS 12

1.2 Objetivos 16

1.2.1 Objetivo General 16

1.2.2 Objetivos Específicos 16

CAPÍTULO II **17**

METODOLOGÍA **17**

2.1 Materiales 17

2.2 Métodos 21

2.2.1 Diseño del vector pET-30a(+)_PaAHAS para la producción de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*AHAS). 21

2.2.1.1 Búsqueda de secuencias *Pa*AHAS 21

2.2.1.2 Alineamiento de secuencias *Pa*AHAS 21

2.2.1.3 Clonación de *Pa*AHAS en el vector pET-30a(+)_PaAHAS 22

2.2.1.4 Transformación de las células competentes *E. coli* BL21 22

2.2.1.5 Expresión de *Pa*AHAS 23

2.2.1.6 Purificación de PaAHAS 24

2.2.2 Determinación de las constantes de inhibición de Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam frente a la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PaAHAS). 24

2.2.3 Determinación de las constantes mínimas inhibitorias del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de los herbicidas comerciales Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam. 25

2.2.3.1 Análisis de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* frente a Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam. 25

2.2.3.2 Cultivo de bacterias patógenas 25

2.2.3.3 Preparación del inóculo de *P. aeruginosa* 26

2.2.3.4 Ensayo de susceptibilidad microbiana por difusión en disco 26

2.2.3.5 Ensayo de susceptibilidad microbiana por microdilución 27

CAPÍTULO III **28**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **28**

3.1 Análisis y discusión de resultados 28

3.1.1 Búsqueda de la secuencia de *Pa*AHAS 28

3.1.2 Purificación de la enzima *Pa*AHAS 32

3.1.3 Determinación de las constantes de inhibición (K_i) de *Pa*AHAS 34

3.1.4 Análisis de susceptibilidad antimicrobiana mediante ensayos de difusión en disco 37

3.1.5 Determinación de las constantes mínimas inhibitorias (MIC_{50}) de *Pseudomonas aeruginosa cepa ATCC 25668* 41

CAPÍTULO IV 45

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 46

4.1 Conclusiones 46

4.2 Recomendaciones 47

MATERIALES DE REFERENCIA 48

Referencias Bibliográficas 48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales factores patogénicos de Pseudomonas aeruginosa y tratamientos asociados..... 5
Tabla 2. Lista de reactivos, material de laboratorio, equipos y recursos tecnológicos empleados..... 17
Tabla 3. Composición de los medios de cultivo SOC y Luria Bertani (LB)..... 23
Tabla 4. Medio de cultivo M9..... 26
Tabla 5. Constantes de inhibición (K_i) de herbicidas comerciales frente a AHAS de distintos organismos..... 35
Tabla 6. Puntos de corte del diámetro del halo de inhibición (mm) de Pseudomonas aeruginosa ATCC 25668 frente a diferentes inhibidores..... 38
Tabla 7. Constantes Mínimas Inhibitorias (MIC_{50}) de diferentes compuestos antimicrobianos frente a AHAS de otros organismos..... 44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana en Pseudomonas aeruginosa. 8
Figura 2. Vía de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. 11
Figura 3. Ejemplos de las estructuras químicas de las cinco clases diferentes de herbicidas AHAS.. 13
Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad catalítica de AHAS III de las cepas PAO1 y PA14 de Pseudomonas aeruginosa. 29
Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de PaAHAS con sus homólogos de bacteria, planta y levadura. 31
Figura 6. Purificación de la enzima PaAHAS. 33
Figura 7. Porcentaje de actividad enzimática vs concentración de herbicida. 36

RESUMEN EJECUTIVO

En los últimos años, *Pseudomonas aeruginosa* se ha consolidado como un patógeno de relevancia clínica debido a su creciente resistencia a los antimicrobianos, razón por la cual forma parte del grupo ESKAPE, uno de los mayores desafíos clínicos en la salud pública mundial. Ante esta problemática, la búsqueda de nuevas terapias que permitan superar la resistencia bacteriana se ha convertido en una prioridad. Dado lo anterior, la enzima acetohidroxiácido sintasa, involucrada en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y ausente en animales, emerge como una diana terapéutica atractiva para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. La presente investigación propone la reutilización de herbicidas comerciales clorimuron etil, penoxsulam, metosulam y florasulam como potenciales inhibidores de la enzima *Pa*AHAS de *P. aeruginosa*. Para ello, se diseñó un vector para la expresión recombinante de la enzima en *E. coli* BL21, seguida de su purificación mediante cromatografía de afinidad y filtración en gel. Posteriormente, se determinaron las constantes de inhibición de los herbicidas frente a *Pa*AHAS mediante ensayos espectrofotométricos. Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos contra la cepa *P. aeruginosa* ATCC 25668 a través de ensayos de difusión en disco y microdilución en medio M9. Los resultados demostraron que florasulam presentó la mayor afinidad hacia la enzima *Pa*AHAS, mientras que clorimuron etil y florasulam evidenciaron actividad antimicrobiana significativa. Estos hallazgos respaldan el potencial de reutilizar inhibidores de acetohidroxiácido sintasa como una estrategia terapéutica innovadora frente a infecciones causadas por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, acetohidroxiácido sintasa (AHAS), herbicidas, inhibición enzimática, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

In recent years, *Pseudomonas aeruginosa* has become established as a clinically relevant pathogen due to its increasing resistance to antimicrobials, which has placed it within the ESKAPE group, one of the greatest clinical challenges in global public health. Faced with this problem, the search for new therapies capable of overcoming bacterial resistance has become a priority. In this context, the enzyme acetohydroxyacid synthase, which is involved in the synthesis of branched-chain amino acids and is absent in animals, emerges as an attractive therapeutic target for the development of new antimicrobials. This research proposes the repurposing of commercial herbicides clorimuron ethyl, penoxsulam, metosulam, and florasulam, as potential inhibitors of the *Pa*AHAS enzyme of *P. aeruginosa*. To this end, a vector was designed for the recombinant expression of the enzyme in *E. coli* BL21, followed by its purification through affinity chromatography and gel filtration. Subsequently, the inhibition constants of the herbicides against *Pa*AHAS were determined using spectrophotometric assays. Finally, the antimicrobial activity of the compounds against the *P. aeruginosa* ATCC 25668 strain was evaluated through disc diffusion and microdilution assays in M9 minimal medium. The results showed that florasulam exhibited the highest affinity for the *Pa*AHAS enzyme, while clorimuron ethyl and florasulam demonstrated significant antimicrobial activity. These findings support the potential of repurposing AHAS inhibitors as an innovative therapeutic strategy against infections caused by multidrug resistant *P. aeruginosa* strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, acetohydroxyacid synthase (AHAS), herbicides, enzyme inhibition, antimicrobial resistance.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Generalidades

Cada año, millones de personas se ven afectadas por infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista responsable del 8.9 % de las infecciones del torrente sanguíneo en entornos hospitalarios. Su alta resistencia a múltiples fármacos (MDR) contribuye a tasas de mortalidad que alcanzan el 30 % en casos de bacteriemias **(Sendra et al., 2024)**. Debido a su importancia clínica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado a *P. aeruginosa* como uno de los 15 patógenos prioritarios a nivel global **(WHO, 2024)**.

La creciente prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos ha puesto en evidencia la necesidad de explorar nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), esencial para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), ha demostrado un gran potencial como diana para el desarrollo de compuestos con actividad antimicrobiana ya que el bloqueo de su actividad inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos *in vitro* e *in vivo* **(García et al., 2018)**. Por lo tanto, la enzima AHAS podría permitir desarrollar nuevas soluciones que aborden la resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* de manera específica y efectiva.

Existen cinco familias de herbicidas con la capacidad de inhibir la enzima AHAS mediante un mecanismo no competitivo, bloqueando el canal de acceso del sustrato hacia el sitio activo e impidiendo la biosíntesis de BCAAs, aminoácidos esenciales para el microorganismo **(García et al., 2017)**. Los herbicidas comerciales, Clorimuron etil (CE), Penoxsulam (PS), Metosulam (MT) y Florasulam (FS), han mostrado una potente acción inhibidora de AHAS, siendo eficaces contra bacterias resistentes a antibióticos **(Lonhienne et al., 2022)**. Estos hallazgos sugieren que los herbicidas inhibidores de AHAS tienen un potencial significativo en el desarrollo de nuevos tratamientos contra infecciones causadas por *P. aeruginosa*. En base a lo expuesto, es necesario investigar la efectividad de estos compuestos en modelos experimentales.

1.1.2 Resistencia Antimicrobiana: bases, mecanismos y patógenos prioritarios

El descubrimiento y aplicación de los antibióticos constituyen uno de los mayores avances en la medicina moderna, ya que han posibilitado el desarrollo seguro de procedimientos complejos como intervenciones quirúrgicas, trasplantes de órganos y tratamientos oncológicos basados en quimioterapia **(Aminov, 2010)**. Sin embargo, con el tiempo, la aparición de nuevas clases de antibióticos empezó a disminuir, al mismo tiempo que las tasas de resistencia bacteriana iban en aumento. Como consecuencia, la resistencia a los antimicrobianos es ahora una amenaza tangible que compromete la eficacia de los tratamientos médicos a nivel global **(Boucher et al., 2009)**.

A pesar de la relevancia de esta problemática y de los esfuerzos por contener su avance, existen múltiples desafíos que dificultan el control efectivo de la resistencia antimicrobiana. Uno de los más importantes es el uso inadecuado y excesivo de antibióticos. La prescripción innecesaria en el ámbito médico, junto con la automedicación y el libre acceso a estos fármacos, contribuyen significativamente a acelerar los procesos de selección de cepas resistentes **(Hutchings et al., 2019)**. Esta situación se intensifica cuando el uso irracional de estos compuestos excede su capacidad de acción, creando un entorno propicio para que las bacterias patógenas desarrollen mecanismos de defensa **(Tang et al., 2023)**. Entre estos se destacan tres procesos principales: (i) la adquisición de genes de resistencia; (ii) mutaciones en los genes diana de los antibióticos; y (iii) la sobreexpresión de mecanismos intrínsecos de resistencia, como bombas de eflujo o enzimas inactivadoras de antibióticos, fortaleciendo aún más la capacidad de las bacterias para evadir tratamientos previamente efectivos **(Brown & Wright, 2016)**.

Gran parte de los casos de resistencia antimicrobiana a nivel mundial se concentra en un grupo particular de bacterias conocido como patógenos ESKAPE, que incluye a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y diversas especies del orden *Enterobacterales*. Estos microorganismos representan una amenaza crítica no solo en contextos clínicos, sino que también tienen un impacto considerable en ámbitos comunitarios, ambientales y agroindustriales, debido a su capacidad para adaptarse, persistir y diseminar genes de resistencia en diversos ecosistemas **(Miller & Arias, 2024)**. Dentro de este grupo *P. aeruginosa* destaca por ser un patógeno desafiante, por su perfil de resistencia y su relevancia clínica, participando de manera predominante en infecciones crónicas de difícil manejo, tanto en la comunidad como en entornos hospitalarios. Donde su impacto es particularmente grave en pacientes inmunodeprimidos o con barreras físicas comprometidas **(Driscoll et al., 2007; Qin et al., 2022)**.

1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiología

P. aeruginosa destaca por su alta incidencia en infecciones relacionadas con la atención médica, implicada comúnmente en cuadros clínicos como neumonía, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto urinario y bacteriemias. Se estima que su prevalencia entre todas las infecciones nosocomiales oscila entre el 7.1 % y el 7.3 % **(Magill et al., 2015)**. La neumonía constituye su manifestación clínica más frecuente, siendo además el bacilo gramnegativo predominante en los casos de neumonía adquirida en el hospital. Dentro de esta patología, la neumonía asociada a la asistencia sanitaria y la neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) son una carga considerable para los sistemas de salud, ya que representan hasta el 22 % de todas las infecciones nosocomiales **(Kalil et al., 2016)**. Entre los agentes etiológicos involucrados, *P. aeruginosa* es el segundo más frecuente asociado a NAV, con una tasa de aislamiento que varía entre el 10 % y el 20 % **(Weiner et al., 2019)**. Además, se estima que la tasa de mortalidad vinculada a NAV por *P. aeruginosa* es de 32 % a 42.8 % **(Micek et al., 2015)**.

Asimismo, *P. aeruginosa* también es causante de infecciones del tracto urinario (ITU), especialmente aquellas asociadas al uso de catéteres (CAUTI), representando aproximadamente el 10 % de todos los CAUTI y hasta el 16 % de ITU en pacientes de la unidad de cuidados intensivos **(Rosenthal et al., 2016)**. La infección urinaria nosocomial, causada por *P. aeruginosa*, se asocia con una elevada morbilidad y puede evolucionar hacia complicaciones graves como bacteriemia. Además, se ha observado una alta frecuencia de resistencia a múltiples antimicrobianos en este tipo de infecciones, lo que complica aún más su tratamiento **(Kitagawa et al., 2019)**.

Otro tipo de infección nosocomial relevante asociada a *P. aeruginosa* es la infección del sitio quirúrgico (ISQ). Datos reportados por la Red Nacional de Seguridad en la Atención Médica de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), indican que el 5.7 % de las ISQ registradas fueron atribuibles a este patógeno, con mayor frecuencia tras cirugías mamarias y cardíacas **(Weiner et al., 2019)**. Cabe destacar, que la presencia de *P. aeruginosa* en este tipo de infecciones se asocia con un pronóstico menos favorable. Un estudio retrospectivo realizado en un hospital universitario durante un período de siete años reveló que los pacientes sometidos a cirugía cardíaca que desarrollaron infecciones por este microorganismo presentaron un aumento significativo en la tasa de mortalidad **(Massart et al., 2022)**.

Finalmente, entre las infecciones más graves asociadas a *P. aeruginosa* se encuentran las del torrente sanguíneo (ITS). Se estima que las tasas de mortalidad atribuidas a bacteriemias por esta bacteria oscilan entre el 43.2 % y el 58.8 % **(Thaden et al., 2017)**. Del mismo modo, las ITS originadas por este patógeno muestran una mayor frecuencia de adquisición intrahospitalaria en comparación con otras bacterias gramnegativas. Estudios revelan que, el 51 % de las ITS por *P. aeruginosa* fueron adquiridas en el hospital, frente al 27 % en el resto de las bacterias gramnegativas **(Reynolds & Kollef, 2021)**. Asimismo, se estima que este microorganismo es responsable del 4 % de todas las infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con el uso de vías centrales, lo que refuerza su papel como un agente oportunista relevante en pacientes inmunocomprometidos **(Weiner et al., 2019)**.

1.1.4 Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es capaz de adaptarse a entornos adversos dentro del huésped mediante la producción de diversos factores de virulencia que facilitan la infección y el desarrollo de enfermedades **(Vidaillac & Chotirmall, 2021)**. Uno de ellos es el lipopolisacárido (LPS), un componente estructural esencial que protege la membrana externa y contribuye a la evasión del sistema inmune. Además, el LPS está relacionado con la resistencia a antibióticos y la formación de biopelículas. Por otro lado, las proteínas de membrana externa (OMP) favorecen el transporte de nutrientes, la adhesión y la resistencia antimicrobiana **(Qin et al., 2022)**. El flagelo y los pili son estructuras clave asociadas a la motilidad y virulencia. El flagelo facilita el movimiento en medios líquidos y contribuye a la adhesión inicial, mientras que los pili permiten el desplazamiento sobre superficies y favorecen la formación de biopelículas. Ambos factores desempeñan un papel importante en la colonización, persistencia y evasión del sistema inmunológico del hospedador **(Driscoll et al., 2007)**.

Asimismo, *P. aeruginosa* puede modular la respuesta inmunitaria del huésped a través de distintos sistemas de secreción (T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T5SS y T6SS), que permiten la liberación de toxinas, facilitando el escape inmunitario y la colonización bacteriana. Los exopolisacáridos, como el alginato, Psl y Pel, contribuyen a la formación de biopelículas y dificultan la eliminación bacteriana. En cuanto a toxinas, el sistema de secreción tipo III (T3SS) inyecta citotoxinas como ExoU, ExoT, ExoS y ExoY, que interfieren con la fagocitosis y dificultan la eliminación de la bacteria. La exotoxina A (ETA) inhibe la síntesis de proteínas del huésped, mientras que la piocianina daña los tejidos y afecta la función de los órganos. Otras enzimas líticas, como elastasas (LasA y LasB), proteasas, lipasas y fosfolipasas, degradan componentes celulares y modulan la virulencia. Por otro lado, las enzimas antioxidantes, como las catalasas y superóxido dismutasas, neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro

de los fagocitos, favoreciendo la persistencia de *P. aeruginosa* en el huésped **(Filloux, 2011; Jurado et al., 2021; Qin et al., 2022).**

La Tabla 1 presenta información detallada sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa* y las estrategias terapéuticas actualmente disponibles para su control.

Tabla 1.

Principales factores patogénicos de Pseudomonas aeruginosa y tratamientos asociados.

Factor patogénico	***Función biológica***	***Estrategia terapéutica***
Proteasas	Elevada actividad proteolítica, lo que les permite degradar proteínas del huésped y contribuir al daño tisular durante la infección.	Inhibidores de proteasa
Toxinas	*P. aeruginosa* produce una variedad de toxinas extracelulares que pueden causar acidosis, necrosis hepática, edema pulmonar, insuficiencia circulatoria, entre otros.	Bacteriófagos
LPS	Este componente puede ser detectado por los receptores de reconocimiento de patrones del huésped, desencadenando así la respuesta inflamatoria e inmunitaria.	Anticuerpo
Pili y fimbrias	Brindan adherencia y motilidad durante la colonización en el huésped.	Bacteriófagos
Flagelos	Proporcionan motilidad y su orientación hacia estímulos químicos.	Bacteriófagos

Sideróforos	Facilitan la captación de hierro y la expresión de otros factores de virulencia como la formación de biofilms.	Antibióticos
Ureasa	Hidroliza la urea, generando amoníaco y dióxido de carbono y se relaciona con infecciones del tracto urinario.	Ninguno
Proteínas de la membrana externa	Esenciales en la adherencia bacteriana, secreción de factores de virulencia y reconocimiento celular.	Receptor potencial para la internalización del huésped

Nota: Información obtenida de Qin et al., (2022).

1.1.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*

Los principales mecanismos utilizados por *P. aeruginosa* para contrarrestar el ataque de antibióticos se clasifican en tres grupos principales: resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa **(Breidenstein et al., 2011)**.

La *resistencia intrínseca* de esta bacteria se debe a la baja permeabilidad de su membrana externa, a la expresión de bombas de eflujo que expulsan los antibióticos fuera de la célula y a la síntesis de enzimas capaces de inactivar estos compuestos (detoxificación). Por otra parte, la *resistencia adquirida* se desarrolla a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia o cambios mutacionales que afectan la unión de los compuestos antimicrobianos a su diana terapéutica o que producen cambios estructurales que permiten la acción de los mecanismos de resistencia intrínsecos. En cuanto a la *resistencia adaptativa*, esta se relaciona con la capacidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas, estructuras que funcionan como una barrera protectora al dificultar la penetración de los antibióticos. Dentro de estas biopelículas pueden surgir células persistentes con alta tolerancia a múltiples fármacos, lo que contribuye a infecciones prolongadas y recurrentes en distintos entornos clínicos **(Pang et al., 2019; Qin et al., 2022)**. Estos mecanismos, combinados con la expresión de factores de virulencia permiten a *P. aeruginosa* evadir varias clases de antibióticos, como cefalosporinas de primera y segunda generación (cefazolina, cefalexina, cefuroxima); aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, estreptomicina) y quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacino) de segunda y tercera generación y carbapenémicos (meropenem, imipenem, doripenem) y polimixinas (polimixina B,

colistina) de última generación, consolidándolo como uno de los patógenos más difíciles de erradicar en entornos hospitalarios **(De Oliveira et al., 2020)**. La resistencia a los carbapenémicos es particularmente preocupante, ya que estos antibióticos se consideran una de las últimas líneas de tratamiento para infecciones graves, limitando las opciones terapéuticas disponibles frente a infecciones por esta bacteria **(Mancuso et al., 2021)**.

En la Figura 1 se esquematizan estos mecanismos de resistencia, evidenciando cómo cada estrategia contribuye a la supervivencia de la bacteria en entornos clínicos y a su alta resistencia a tratamientos convencionales. La interacción entre factores genéticos, proteínas de membrana y bombas de eflujo, así como la transferencia horizontal de genes de resistencia (THG), constituyen una de las principales amenazas en el manejo clínico de infecciones por *P. aeruginosa*.

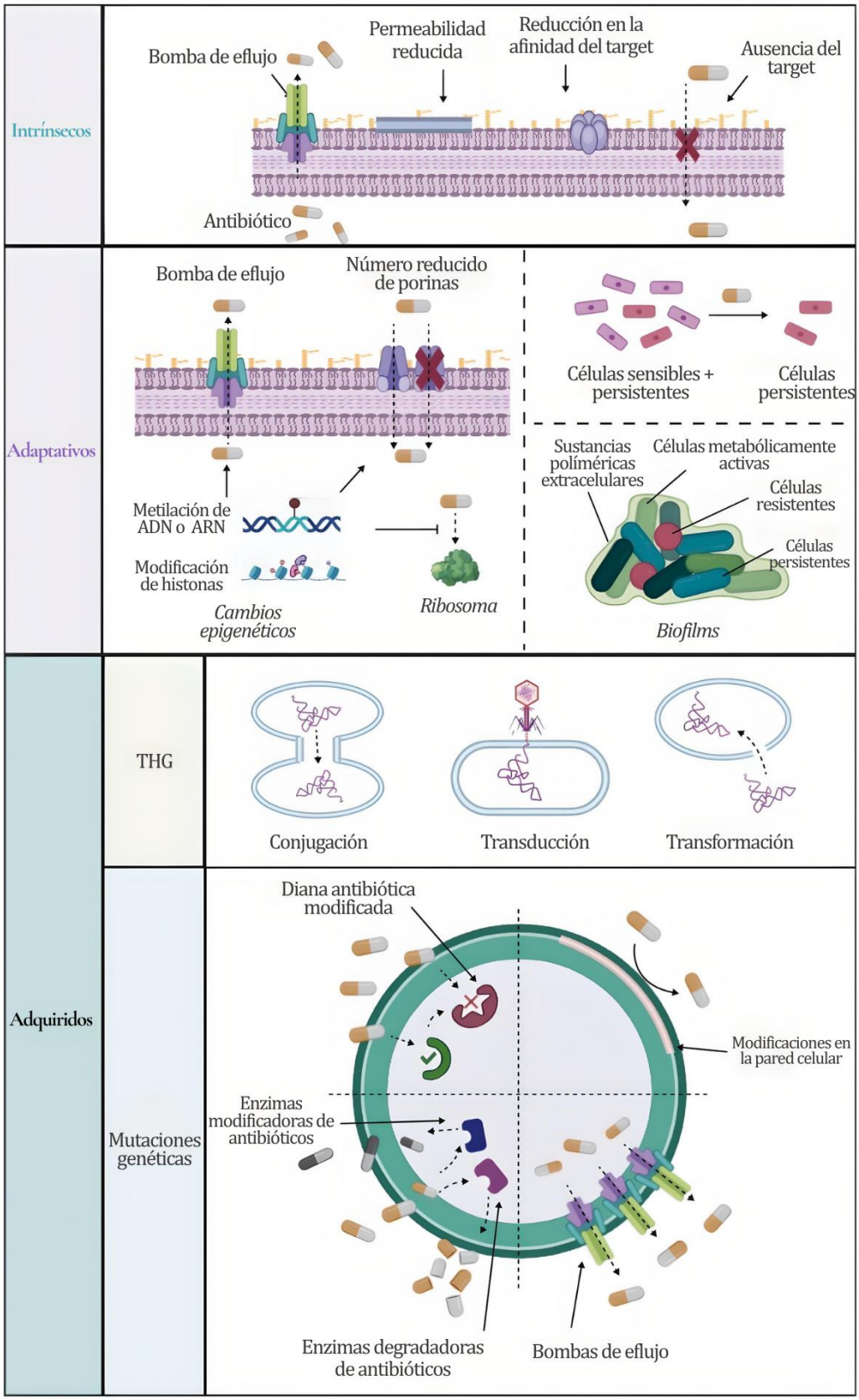

Figura 1. *Mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana en Pseudomonas aeruginosa. Adaptado de Ho et al., (2024).*

1.1.6 Estrategias terapéuticas actuales frente a *Pseudomonas aeruginosa* y perspectivas hacia nuevas dianas antimicrobianas

El tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* continúa siendo un desafío a nivel mundial, debido a sus múltiples mecanismos de defensa frente a los antibióticos, que le confieren una resistencia intrínseca a diversos fármacos, como la ampicilina, la cefalexina y las tetraciclinas **(Lister et al., 2009)**. Esta capacidad ha reducido la eficacia de numerosos tratamientos convencionales, incluso aquellos que combinan diferentes familias de antimicrobianos, lo que ha limitado significativamente las opciones terapéuticas disponibles **(Qin et al., 2022)**.

Frente a esta problemática, las opciones terapéuticas para tratar infecciones causadas por *P. aeruginosa* continúan basándose en una selección limitada de antibióticos, que incluye β-lactámicos como ceftazidima, cefepime y piperacilina-tazobactam. Los carbapenémicos, como imipenem y meropenem, son utilizados como alternativa de amplio espectro, aunque el desarrollo de carbapenemasas ha comprometido su efectividad en cepas multirresistentes **(Pang et al., 2019)**. Asimismo, aminoglucósidos como amikacina y tobramicina, y fluoroquinolonas como ciprofloxacina y levofloxacina, continúan siendo empleados, especialmente en tratamientos combinados. En casos de infecciones causadas por cepas extremadamente resistentes (XDR), se recurre a polimixinas como colistina, a pesar de su toxicidad, y a nuevas moléculas como cefiderocol, un sideróforo sintético que utiliza sistemas de captación de hierro bacterianos para facilitar su entrada al interior celular **(WHO, 2022)**.

A pesar de estos avances, las limitaciones terapéuticas persisten, ya que *P. aeruginosa* presenta adaptabilidad genética y metabólica, lo que le permite resistir o evadir la acción de múltiples antimicrobianos **(Reynolds & Kollef, 2021)**. Además, la formación de biopelículas en dispositivos médicos y tejidos lesionados reduce la penetración de fármacos, dificultando su erradicación completa. Por ello, se han explorado terapias alternativas como el uso de bacteriófagos, inhibidores de detección quórum, anticuerpos monoclonales, nanopartículas y péptidos antimicrobianos **(Brown & Wright, 2016)**. No obstante, muchas de estas estrategias aún se encuentran en etapas preclínicas o su implementación clínica aún es limitada **(ECDC, 2023)**.

En este contexto, se ha incrementado el interés por identificar nuevas dianas moleculares que puedan ser utilizadas para desarrollar antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes a los

convencionales. Una de las rutas metabólicas esenciales para la supervivencia bacteriana es la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), proceso en el cual participa la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) **(Duggleby & Pang, 2000)**. Esta enzima cataliza la primera reacción de la síntesis de valina, leucina e isoleucina, y ha sido tradicionalmente blanco de herbicidas agrícolas. Diversos estudios han evidenciado que la inhibición de AHAS no solo compromete el crecimiento bacteriano, sino que también presenta un potencial selectivo, ya que esta vía metabólica no está presente en humanos **(Lee et al., 2013; García et al., 2018)**.

1.1.7 Enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS)

La enzima AHAS cataliza la primera reacción en la biosíntesis de BCAAs, valina, leucina e isoleucina presente únicamente en plantas y microorganismos **(Duggleby & Pang, 2000)**. La reacción inicia con la descarboxilación de una molécula de piruvato por acción del cofactor difosfato de tiamina (ThDP), que da lugar al intermediario 2-(α-hidroxietil)-ThDP (HEThDP). Este paso es irreversible y dependiente de la formación de un enlace covalente entre el carbonilo del piruvato y el carbono C2 del anillo tiazolio del ThDP **(Alvarado et al., 2019)**. Esta actividad es propia de la subfamilia de enzimas piruvato oxidasas (PO) a la cual pertenece AHAS **(Tittmann et al., 2003).** Después, el intermediario HEThDP reacciona con una segunda molécula de piruvato o 2-cetobutirato para producir (S)-2-acetolactato o (S)-2-aceto-2-hidroxibutirato, respectivamente. Tanto la valina como la leucina se biosintetizan a partir de (S)-2-acetolactato, mientras que la isoleucina se biosintetiza a partir de (S)-2-aceto-2-hidroxibutirato (Figura 2) **(Duggleby & Pang, 2000; Duggleby, 2005)**. La actividad de AHAS depende de dos cofactores adicionales, ion magnesio (Mg^{2+}) y dinucleótido de flavina adenina (FAD). Ambos cofactores cumplen roles clave y son necesarios para la mantener la actividad y estructura de la enzima. Por ejemplo, el ion Mg^{2+} forma múltiples interacciones no covalentes y enlaces de coordinación con los grupos fosfato del ThDP y el polipéptido. De esta forma, el ión Mg^{2+} ancla el cofactor ThDP al sitio activo. Por su parte, el FAD brinda estabilidad estructural a la enzima ya que adopta una estructura totalmente extendida que permite la formación de un gran número de contactos con residuos que conforman el dominio β de AHAS. Además, el anillo de flavina está orientado hacia el sitio activo, con lo cual FAD modula la unión del sustrato y regula la actividad de AHAS mediante un proceso de oxidación-reducción del cofactor **(Lonhienne et al., 2017)**. En isoformas bacterianas, el FAD protege a la AHAS del daño oxidativo **(Liu et al., 2016; Barak & Chipman, 2012)**.

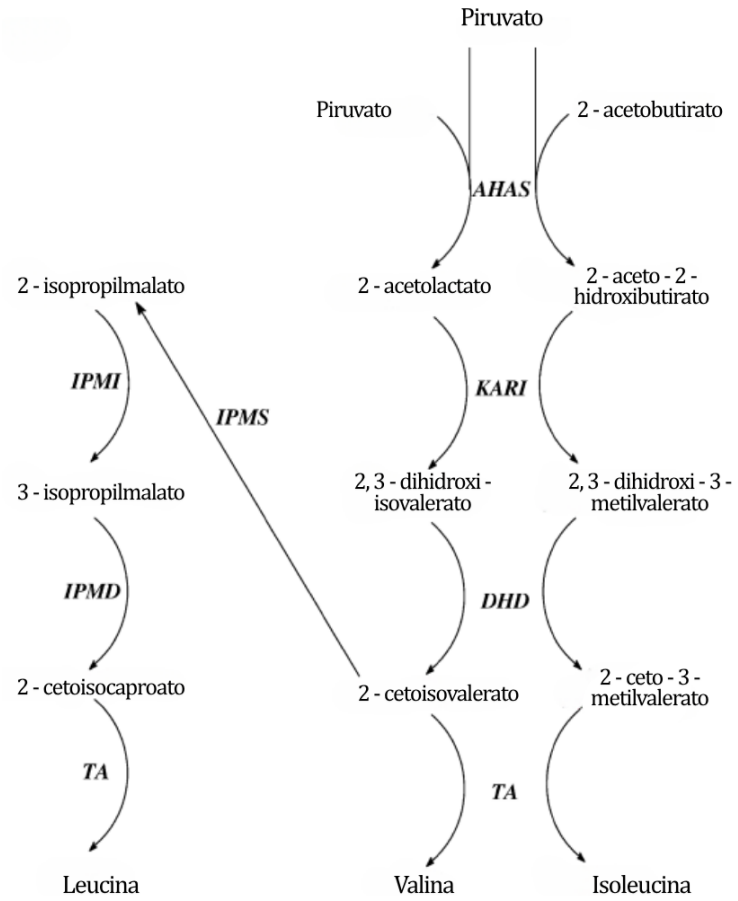

Figura 2. *Vía de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Las abreviaturas utilizadas son: KARI, cetolácido reductoisomerasa; DHD, dihidroxiácido deshidratasa; TA, transaminasa; IPMS, 2-isopropilmalato sintasa; IPMI, isopropilmalato isomerasa; IPMD, 3-isopropilmalato deshidrogenas. Adaptado de Duggleby & Pang, (2000).*

A nivel estructural, la enzima AHAS está compuesta por una subunidad catalítica (CSU) y una subunidad reguladora (RSU). La CSU, alberga el sitio activo y los cofactores de la enzima y es un homodímero, donde cada monómero está compuesto de tres dominios α, β y γ. La estructura primaria de la CSU es altamente conservada con una peso molecular entre 60 y 70 kDa **(Barak & Chipman, 2012)**. Por otro lado, la RSU cuenta con un dominio N-terminal y otro C-terminal, modula la actividad de la CSU y es sensible a inhibición por retroalimentación. En contraste, la RSU tiene un bajo nivel de conservación entre especies y puede ser un monómero (plantas) u homodímero (bacterias y hongos) con un peso molecular de entre 9.5 y 50 kDa **(Barak & Chipman, 2012)**. La RSU contiene un dominio ACT por medio del cual esta subunidad interactúa con la CSU. En plantas se ha observado la presencia de dos dominios ACT en un solo polipéptido debido a una duplicación del gen que codifica a la RSU, mientras que en microorganismos cada monómero contiene solo un dominio ACT. La CSU y RSU forman un complejo multimérico conformado por 4 CSU y entre 4 y 8 RSU, que presenta una estructura

global que se asemeja a la de una cruz maltesa, y cuya asociación es dependiente de ATP **(Lonhienne et al., 2020)**.

En cuanto a la genética, muchas bacterias grampositivas poseen una sola isoenzima de AHAS, mientras que algunas gramnegativas, como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, producen tres variantes de AHAS (AHAS I, II y III) que son codificadas por los pares de genes *ilvBN*, *ilvGMEDA* e *ilvIH* respectivamente. Estas isoenzimas presentan diferencias en sus propiedades bioquímicas, incluyendo la sensibilidad a la inhibición por valina, la especificidad de sustrato, la afinidad por los cofactores, y los mecanismos de regulación de su expresión **(Barak & Chipman, 2012).**

En hongos, existe sólo una isoenzima AHAS ubicada en la mitocondria que es codificada por el gen *ilv2* **(Duggleby & Pang, 2000)**. En levaduras, su expresión está regulada por dos mecanismos, el control general de aminoácidos dependiente de GCN4 y la regulación multivalente específica que responde a altas concentraciones de los tres aminoácidos de cadena ramificada **(Lonhienne et al., 2017)**. En plantas, los primeros genes de AHAS fueron aislados a partir de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* utilizando el gen de levadura *ilv2* como sonda de hibridación **(Lonhienne et al., 2020)**. Desde entonces, se han identificado y caracterizado varios genes de AHAS en diferentes especies vegetales. En todas ellas, al menos un gen de AHAS se expresa de manera constitutiva y actúa en el cloroplasto, aunque el nivel de expresión varía según el tejido y la etapa de desarrollo. Los niveles más altos de transcripción y actividad de AHAS se observan en tejidos meristemáticos con alta actividad metabólica **(Ouellet et al., 1992)**. Tanto en hongos como en plantas, la enzima AHAS contiene un péptido señal que permite su transporte a su sitio de acción.

Debido a la importancia que tiene AHAS en la síntesis de aminoácidos, lo vuelve un *target* ideal para el uso de diversos inhibidores con potencial actividad herbicida y antimicrobiana.

1.1.8 Inhibición de la enzima AHAS

Entre los inhibidores de la enzima AHAS se encuentran varios herbicidas comerciales que se insertaron en el mercado hace aproximadamente 60 años. Actualmente, se han descrito cinco clases químicas de inhibidores diferentes, que son: sulfonilureas (SUs), imidazolinonas (IMIs), triazolopirimidinas (TPs), pirimidinilbenzoatos (PYBs), y sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (SCTs) (Figura 3) **(García et al., 2017)**. Las SUs e IMIs fueron utilizadas por primera vez de manera comercial a principios de la década de 1980 y, posteriormente, se han añadido al mercado las TPs, los PYBs y las SCTs. Desde la

introducción de estos herbicidas en la década de 1980 hasta el año 2022, se han identificado 197 aislados de resistencia al sitio de acción de la enzima AHAS en plantas **(Lonhienne et al., 2022)**.

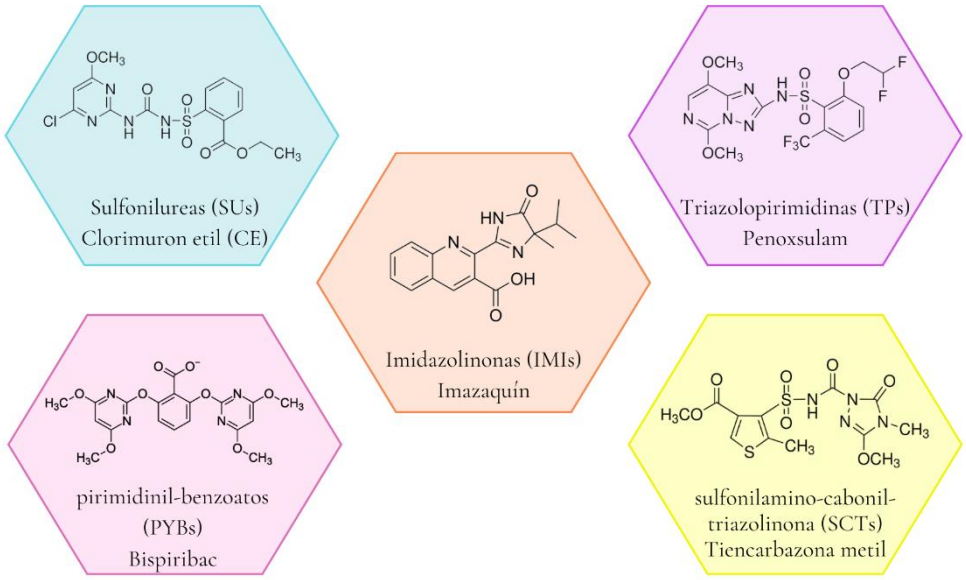

Figura 3. *Ejemplos de las estructuras químicas de las cinco clases diferentes de herbicidas AHAS. SUs (CE), IMIs (Imazaquín), TPs (PS), PYBs (Bispiribac) y SCTs (Tiencarbazona metil). Adaptado de* ***García et al., (2017)****.*

Los herbicidas que inhiben la enzima AHAS actúan de dos formas: i) bloqueando físicamente el acceso del sustrato al sitio activo, y ii) desencadenando una cascada de reacciones oxidativas que dañan irreversiblemente la enzima. La unión de la enzima a las cinco clases de herbicidas comerciales ha sido caracterizada mediante la determinación de múltiples estructuras cristalinas de complejos AHAS-inhibidor. Esta información ha sido clave para comprender el mecanismo de inhibición de AHAS de levaduras, plantas y bacterias. Además, mediante las estructuras cristalinas, se ha logrado determinar que la afinidad de la enzima por los diferentes herbicidas comerciales puede diferir sustancialmente dependiendo del organismo, ya que existen sustituciones puntuales en los residuos que componen el sitio de unión de los herbicidas que impiden la formación de interacciones no covalentes clave para su unión o que inducen impedimentos estéricos **(García et al., 2017; Lonhienne et al., 2018; Lonhienne et al., 2022)**.

Como se mencionó anteriormente, la unión del herbicida al sitio catalítico inicia una serie de eventos que conducen a la oxidación de dos cofactores clave, ThDP y FAD, resultando en la pérdida completa de la actividad enzimática. Se cree que esto ocurre debido a que el sitio de unión de los herbicidas en la AHAS también es un punto de control para la regulación de la síntesis de BCAAs mediante derivados

solubles de quinona que pueden oxidar el cofactor FAD en la enzima, inactivándola. Esta inactivación permite a la célula ajustar la producción de BCAAs según sus necesidades. Sin embargo, durante la inhibición por herbicidas comerciales, AHAS se inactiva debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que atacan los cofactores FAD y ThDP **(Lonhienne, 2017)**. La reactivación de la enzima requiere la re-reducción del FAD por un mecanismo similar al de la enzima piruvato oxidasa, un proceso relativamente lento que contribuye a la regulación negativa de AHAS, además del intercambio del cofactor ThDP oxidado por uno intacto.

En general, los herbicidas comerciales han demostrado ser potentes inhibidores de la enzima AHAS. Una de las formas más comunes de evaluar la eficacia de un inhibidor enzimático es mediante la determinación de la constante de inhibición (K_i), la cual representa la afinidad del inhibidor por la enzima: un valor menor de K_i, indica que el compuesto es más efectivo para bloquear la actividad enzimática. Por ejemplo, en la AHAS de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*AHAS), CE es el inhibidor más efectivo dentro de la familia SU, con un valor de la constante de inhibición (K_i) de 3.3 nM **(Duggleby et al., 2003)**. De manera similar, en *Arabidopsis thaliana* (*At*AHAS), CE presenta un K_i de 74.7 nM **(García et al., 2017)**. Dentro de la familia de las TPs, PS ha demostrado una fuerte inhibición de AHAS en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y *C. albicans*, con valores de K_i de 1.9, 2.2 y 2 nM, respectivamente **(Lonhienne et al., 2018;García et al., 2018)**. Por su parte, el FS también ha mostrado una notable capacidad inhibitoria de AHAS de *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus*, con K_i de 10.1 nM y 14.4 nM, respectivamente **(García et al., 2018; Low et al., 2021)**. Finalmente, MT ha presentado una alta inhibición de AHAS fúngicas, con valores de K_i de 0.8 nM, 1.4 nM, 32 nM para las AHAS de *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. auris*, respectivamente **(Agnew et al., 2020; Low et al., 2021; García et al., 2018)**.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, estos herbicidas muestran una excelente correlación entre la inhibición de AHAS y la inhibición del crecimiento celular. PS mostró una inhibición extremadamente potente del crecimiento celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, con valores de MIC_{50} de 0.03 µg/mL (62.06 nM) y 1 µg/mL (2.07 µM), respectivamente **(García et al., 2018)**. FS también mostró actividad antimicrobiana contra *A. fumigatus, A. niger* y *A. flavus*, con valores de MIC superiores a 100 µg/mL. Sin embargo, presentó mayor eficiencia frente a *Mycobacterium tuberculosis* (0.19 µg/mL) y *C. albicans* (5.92 µg/mL) **(García et al., 2018; Low et al., 2021; Wun et al., 2025)**. En el caso de MT, la MIC frente a *A. fumigatus* fue de 25 µg/mL, mientras que en *C. auris* alcanzó una MIC_{50} de 0.332 µM **(Agnew et al., 2020; Low et al., 2021)**. La inhibición del crecimiento de aislados clínicos de *P. aeruginosa* por un panel de distintas SUs mostró que CE fue el compuesto más potente, con una MIC_{50} de CE osciló entre 15.6 y 62.5 µM (6.5 y 25.9 µg/mL) **(Kreisberg et al., 2013)**. Además, metsulfurón

metil (una SU) fue capaz de prolongar la supervivencia de ratones infectados con *P. aeruginosa* y reducir la carga del patógeno en el tejido pulmonar. De esta forma, se ha planteado como hipótesis la posibilidad de que los herbicidas pertenecientes a la familia TP, como PS, MT y FS podrían servir como base para el desarrollo de compuestos más efectivos contra *P. aeruginosa*.

Considerando estos antecedentes, la presente investigación se centra en evaluar la inhibición de la enzima *Pa*AHAS utilizando los herbicidas CE, PS, MT y FS como posibles agentes antimicrobianos contra *P. aeruginosa*. La hipótesis planteada sugiere que estos compuestos inhibirán su crecimiento mediante el bloqueo de la enzima AHAS, generando una deficiencia crítica de aminoácidos esenciales. Esta investigación contribuirá a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para combatir infecciones por cepas multirresistentes, mejorando así la efectividad de los tratamientos y disminuyendo la mortalidad asociada a infecciones hospitalarias.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Reutilizar herbicidas que inhiben la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) como nuevos agentes antimicrobianos contra *Pseudomonas aeruginosa.*

1.2.2 Objetivos Específicos

Diseñar el vector pET-30a(+)_PaAHAS para la producción de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*AHAS).

Determinar las constantes de inhibición de los herbicidas comerciales Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam frente a la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*AHAS).

Determinar las constantes mínimas inhibitorias del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de los herbicidas comerciales Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En la Tabla 2, se enlistan los reactivos, materiales y equipos que se utilizaron durante la investigación.

Tabla 2.

Lista de reactivos, material de laboratorio, equipos y recursos tecnológicos empleados.

Material	Cantidad
Reactivos	
E. coli BL21	100 µL
pET-30a(+)_PaAHAS	50 – 100 ng
Agua destilada	50 mL
Glucosa	20 mL
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	1 g
Triptona	20 g
Cloruro de potasio (KCl)	1 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	2.4 g
Agar	20 g
Kanamicina	50 µg/mL

IPTG	0.5 mM
Alcohol etílico	50 mL
Tris	50 mM
Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)	10 mM
Difosfato de tiamina (ThDP)	1 mM
Dinucleótido de flavina y adenina (FAD)	10 µM
Imidazol	20 mM
Tritón X-100	30 mL
PMSF	1 mM
Piruvato sódico	50 mM
DTT	1 mM
Tampón KPO_4	50 mM
Piruvato	50 mM
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	10 mM
Creatina	10 mM
1-naftol	20 mM
Clorimuron etil	25 mg
Penoxsulam	25 mg
Metosulam	25 mg
Florasulam	25 mg
Tris HCl	50 mL
EDTA	25 mL
Hidróxido de sodio (NaOH)	5 mL
Dodecilsulfato sódico (SDS)	25 g
Glicerol	5 mL

Acrilamida	100 g

Material de laboratorio

Guantes de nitrilo	25
Gradillas	3
Frascos de tapa azul	3
Matraz Erlenmeyer	5
Probetas	2
Micropipetas	3
Balones de aforo	2
Papel absorbente	1
Puntas para micropipetas	3
Papel filtro	1
Papel aluminio	1
Papel film	1
Tubos Falcon	3
Tubos Eppendorf	50
Vasos de precipitación	5
Pipetas	3
Cajas Petri de vidrio	10
Mechero	1
Espátulas estériles	2
Columna HisTrap HP	1
Columna de filtración en gel PD-10	1

Equipos

Microondas	1
Micropipeta manual	1
Centrífuga	1
Incubadora	1
Refrigerador	1
Ultra congelador	1
Cámara de flujo laminar	1
Baño Termostático	1
Autoclave	1
Agitador incubador orbital	1
FPLC	1
Balanza analítica	1
Cámara de electroforesis	1
Sonicador	1
Plancha de agitación	1
Plancha de calentamiento	1
pH metro	1
Vortex	1
Espectrofotómetro	1

Recursos tecnológicos	
GenBank	1
Addgene	1
IDT	1
Gene Universal	1
Scopus	1
ProQuest	1

2.2 Métodos

Se implementaron los siguientes protocolos para la producción y purificación de la enzima *Pa*AHAS, la evaluación de su inhibición mediante herbicidas y la realización de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

2.2.1 Diseño del vector pET-30a(+)_PaAHAS para la producción de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*AHAS).

2.2.1.1 Búsqueda de secuencias *Pa*AHAS

La búsqueda de la secuencia de la subunidad catalítica de AHAS de *P. aeruginosa* (*Pa*AHAS), codificada por el gen ilvl, se realizó mediante la base de datos del GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), similar a lo publicado previamente **(Low et al., 2021)**.

2.2.1.2 Alineamiento de secuencias *Pa*AHAS

La estructura primaria de las secuencias de *Pa*AHAS identificadas en la base de datos del GenBank se analizaron mediante alineamiento múltiple de secuencias con ClustalOmega (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo) con el fin de identificar mutaciones puntuales que podrían afectar la actividad e inhibición de la enzima y así definir la secuencia de *Pa*AHAS que se

empleará para síntesis y clonación. Además, se realizaron alineamientos entre las secuencias de *Pa*AHAS con sus homólogos de bacteria, *E. coli* AHAS (*Ec*AHAS), planta, *A. thaliana* AHAS (*At*AHAS), y levadura, *S. cerevisiae* (*Sc*AHAS). En este caso, se analizaron el grado de identidad de las secuencias y el grado de conservación del sitio de unión de inhibidores **(García et al., 2018)**.

2.2.1.3 Clonación de *Pa*AHAS en el vector pET-30a(+)_PaAHAS

La síntesis y clonación de *Pa*AHAS en el vector pET-30a(+) se realizó mediante los servicios de Gene Universal (https://www.geneuniversal.com/). Con el fin de facilitar la clonación y expresión de la enzima, se analizó la secuencia de *Pa*AHAS con respecto a la presencia de péptido señal, codones raros, y se añadió una cola de histidinas y un codón de paro en el extremo C-terminal. La secuencia de *Pa*AHAS se optimizó para su expresión en *E. coli* BL21 mediante la herramienta de optimización de codones de IDT (https://www.idtdna.com/pages). Finalmente, se introdujeron los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I en los extremos N y C terminal, respectivamente, similar a lo reportado previamente **(Low et al., 2021)**. El producto final fue el plásmido pET-30a(+)_PaAHAS.

2.2.1.4 Transformación de las células competentes *E. coli* BL21

El plásmido pET30a(+)_PaAHAS fue transformado en *E. coli* BL21 químicamente competentes mediante choque térmico (Cohen et al., 1972). En primer lugar, se tomaron 100 µL de células competentes (conservadas a -80ºC), se descongelaron en hielo por 30 minutos, se agregaron 50 – 100 ng de plásmido y se incubaron en hielo por otros 30 minutos. Pasado este tiempo, el choque térmico se realizó con un baño termostático a 42ºC por 90 segundos, y 4ºC por 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 900 µL de caldo SOC (Tabla 3) y se incubaron a 37ºC por 1 hora con agitación constante de 220 rpm. Finalmente, 50, 100 y 200 µL de células transformadas se inocularon en agar LB (Tabla 2) suplementado con kanamicina y se incubaron a 37ºC de 16 a 18 h **(Cerda-Mejía, 2016)**.

Tabla 3.

Composición de los medios de cultivo SOC y Luria Bertani (LB).

Reactivo	Cantidad por L de medio de cultivo SOC	Cantidad por L de medio de cultivo LB
Extracto de levadura	5 g	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.584 g	10 g
Triptona	20 g	10 g
Agar	-	20 g
Solución de glucosa 20 %	20 mL	-
Cloruro de potasio (KCl)	0.186 g	-
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	2.4 g	-

Nota: Ajustar el pH del medio SOC y LB a 7.5 y a 7.0 respectivamente con hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. Para la elaboración de medios líquidos se omitió la adición de Agar. Obtenido de Sigma-Aldrich, (2013).

2.2.1.5 Expresión de *Pa*AHAS

La expresión de la CSU de *Pa*AHAS en *E. coli* BL21 se llevó a cabo según lo reportado previamente **(García et al., 2018; Lonhienne et al., 2022)**, pero con algunas modificaciones. Se cultivó una sola colonia durante 16 h a 37 °C en 100 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL). A continuación, se transfirió un total de 25 mL de este cultivo a 500 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubó a 37 °C con agitación constante (200 opm). Cuando la DO_{600} alcance 0.8, se indujo la expresión de *Pa*AHAS con 0,5 mM de IPTG, y las células se incubaron durante 18 h a 18 °C con agitación (200 opm). Las células se recogieron por centrifugación a 5100 × g y 4 °C durante 10 min, y la pasta celular se congeló y se almacenó a -80 °C. Todas las operaciones posteriores se realizaron a 4 °C, protegiendo la enzima de la luz en la medida de lo posible.

2.2.1.6 Purificación de PaAHAS

La purificación de la CSU de *Pa*AHAS se realizó de forma similar a lo reportado para *At*AHAS y *Candida albicans* AHAS (*Ca*AHAS) **(García et al., 2018**; **Lonhienne et al., 2022)**. La pasta celular se descongeló y se resuspendió en 50 mM Tris (pH 7.9), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ThDP, 10 µM FAD y 20 mM imidazol (Tampón A) en una relación de 6 mL de solución tampón por cada gramo de células. Para la lisis, se añadió 0.3 % de Tritón X-100 y PMSF 1 mM. La suspensión celular se incubó en hielo durante 15 min con agitación leve y luego se homogenizó en un sonificador Benchmark Pulse 150 durante 12 × 10 s a ciclo de trabajo constante, con intervalos de descanso de 10 s. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 39 100 × g durante 60 min. El sobrenadante se cargó en una columna HisTrap HP (Cytiva) previamente equilibrada con tampón A, utilizando un sistema FPLC ÄKTA Start (Cytiva). Una vez cargado el sobrenadante, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna (cv) empleando tampón A. Posteriormente, la enzima se eluyó con 50 mM Tris (pH 7.9), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ThDP, 10 µM FAD y 300 mM imidazol (tampón B). Se recogió el flujo en fracciones de 1 mL y las fracciones que contengan la proteína se agruparon y se les añadió 50 mM de piruvato sódico, 250 mM de NaCl y 1 mM de DTT. La proteína se incubó en hielo durante 10 minutos y luego se cargó en una columna de filtración en gel PD-10 (Cytiva) previamente equilibrada con 50 mM de tampón KPO_4 (pH 7.2), 10 mM $MgCl_2$, 10 µM FAD y 1 mM DTT (tampón GF). La proteína se eluyó con 3.5 mL de tampón GF y el flujo se recogió en fracciones de 1 mL. Las fracciones que contengan la proteína se agruparon y se almacenaron en alícuotas de 50 µL a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el método BCA, empleando una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA). Se analizaron muestras colectadas durante el curso de la purificación mediante SDS – PAGE.

2.2.2 Determinación de las constantes de inhibición de Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam frente a la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PaAHAS).

Se determinaron las constantes de inhibición (K_i) de cuatro herbicidas comerciales, Clorimuron etil (CE), Penoxsulam (PS), Metosulam (MT) y Florasulam (FS), los cuales son excelentes inhibidores de AHAS de plantas y hongos **(García et al., 2018; Lonhienne et al., 2022; Low et al., 2021)**. La determinación de K_i se realizó en un rango de 10 – 12 diferentes concentraciones de inhibidor, incluyendo una reacción sin inhibidor, a concentraciones saturantes de sustrato (>200 mM). El valor de K_i se determinó por regresión lineal mediante la ecuación 1 (Eq. 1) para inhibidores de unión media o débil **(Chang & Duggleby, 1998)**.

$$V_i = \frac{V_o}{1+\frac{[I]}{K_i}} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

La determinación de las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la enzima *Pa*AHAS, empleando piruvato como sustrato, se realizó mediante la evaluación del producto de la reacción, 2-acetolactato, a través del método de Singh **(Singh et al., 1988)**. En síntesis, 50 nM de enzima se incubaron en presencia de inhibidor y concentraciones saturantes de piruvato, a 30 °C en un periodo de 15 min. La solución de reacción estuvo además compuesta por 200 mM KPO_4 (pH 7.2), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ThDP y 10 µM FAD. La reacción fue detenida mediante la adición de H_2SO_4 al 10 % (v/v), para conseguir una concentración final del 1%. En este paso, el 2-acetolactato producido se decarboxiló para producir acetoína después de su incubación a 60 °C en un periodo de 15 min. La acetoína formada se cuantificó a través de la absorbancia (535 nm) generada por el complejo coloreado formado tras la incubación de la solución con creatina (0.17 % p/v) y 1-naftol (1.7 % p/v) a 60 °C en un periodo de 15 min. El coeficiente de extinción que se empleó para determinar la concentración del producto coloreado será 22700 $M^{-1}.cm^{-1}$ **(Chang & Duggleby, 1997)**.

2.2.3 Determinación de las constantes mínimas inhibitorias del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de los herbicidas comerciales Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam.

2.2.3.1 Análisis de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* frente a Clorimuron etil, Penoxsulam, Metosulam y Florasulam.

Las bacterias patógenas utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el Dr. Mario García, docente - investigador de la UTA.

2.2.3.2 Cultivo de bacterias patógenas

Los análisis de susceptibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* ATCC 25668 frente a los herbicidas comerciales, CE, PS, MT y FS, se realizaron empleando cultivos frescos inoculados en caldo M9 cuya composición mínima de sales minerales no proporciona péptidos o aminoácidos libres que podrían evadir la inhibición de la ruta biosintética de los BCAAs **(Wiegand et al., 2008 ; García et al., 2018)**.

2.2.3.3 Preparación del inóculo de *P. aeruginosa*

El inóculo empleado para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se obtuvo por un método similar al reportado por **(García et al. 2018)**. En síntesis, una muestra de un stock de glicerol conservados a -80 °C se inoculará en agar LB y se incubaron durante una noche a 37 °C. Una colonia aislada se transfirió a 50 mL de caldo LB y se incubó por una noche a 37 °C con agitación constante (200 rpm). Posteriormente, 15 mL del cultivo resultante se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL caldo M9 estéril mediante vórtex. Este paso se repitió una vez más. Finalmente, el cultivo se ajustó a una densidad celular de $1x10^7 – 1x10^8$ (UFC/mL) empleando la escala McFarland.

2.2.3.4 Ensayo de susceptibilidad microbiana por difusión en disco

El ensayo de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco se realizó en placas petri con agar M9 (Tabla 4) inoculado con 100 µL de un cultivo fresco (24 a 48 h) de *P. aeruginosa* **(Wiegand et al., 2008).** Luego, se agregó 10 uL de una solución de herbicida disuelto en DMSO en diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 µM) sobre discos de papel estériles, los cuales se colocaron en la superficie del agar. Se empleó ampicilina (AMP), kanamicina (KAN), cloranfenicol (CHL), amikacina (AK), ciprofloxacina (CIP) y piperacilina – tazobactam (TZP) como control positivo y DMSO como control negativo. Las placas inoculadas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y la actividad antibacteriana fue evaluada de acuerdo con el diámetro del halo de inhibición que se formó alrededor del disco **(Lee et al., 2012)**.

Tabla 4.

Medio de cultivo M9.

Reactivo	Cantidad por L de medio de cultivo (mL)
Solución salina M9 5X	200
ddH_2O	800
Sulfato de magnesio 1M ($MgSO_4$)	2
Cloruro de Calcio 1M ($CaCl_2$)	0.1
Solución de glucosa 40 %	10

Solución salina M9 5X	
Reactivo	**Cantidad por L de ddH_2O (g)**
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	64
KH_2PO_4	15
NaCl	2.5
NH_4Cl	5

Nota: Información obtenida de IGEM, (2013).

2.2.3.5 Ensayo de susceptibilidad microbiana por microdilución

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los herbicidas comerciales, se evaluó su actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución de acuerdo con el propuesto por **(Wiegand et al., 2008)**. Para la microdilución se emplearon placas de microtitulación de 96 pocillos estériles, donde las células se incubaron en medio M9. El MIC_{50} se determinó mediante la función de Gompertz **(García et al., 2018)**.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

La presente investigación evaluó el potencial antimicrobiano de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS como alternativa terapéutica frente a *P. aeruginosa*. Para ello, se emplearon los compuestos CE, PS, MT y FS, comúnmente utilizados en el control de malezas. A partir de la expresión recombinante y purificación de la enzima *Pa*AHAS, se realizaron ensayos de actividad enzimática, determinación de constantes de inhibición (K_i) y pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC_{50}). Los resultados obtenidos fueron analizados para establecer la eficacia comparativa de cada herbicida, así como su viabilidad como base para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas dirigidas a cepas multirresistentes.

3.1.1 Búsqueda de la secuencia de *Pa*AHAS

La identificación precisa de dianas terapéuticas a nivel molecular constituye un paso fundamental en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos **(Yang et al., 2021)**. Con este propósito, se recurrió al uso de herramientas bioinformáticas con el fin de localizar, comparar y optimizar la secuencia codificante de la enzima *Pa*AHAS. Mediante la base de datos GenBank del NCBI, se recuperaron dos secuencias de 574 aminoácidos correspondientes a la subunidad catalítica de AHAS III, codificada por el gen *ilvl*, provenientes de las cepas PAO1 (NCBI: WKE13979.1) y PA14 (NCBI: UXO62839.1) de *P. aeruginosa.* Estas cepas son ampliamente utilizadas como referencia en investigación de laboratorio, debido a que se conoce su genoma completo, facilitando el descubrimiento de nuevos fármacos **(Grace et al., 2022)**. Además, existe información previa sobre la inhibición del crecimiento de estas dos cepas por un panel de distintos herbicidas de la familia SU **(Kreisberg et al., 2013)**.

El alineamiento múltiple de ambas secuencias reveló una identidad del 100% (Figura 4). Por consiguiente, la expresión y purificación de cualquiera de estas dos secuencias y los análisis de inhibición de la actividad enzimática por herbicidas comerciales podría ser validada al menos para estas dos cepas de *P. aeruginosa*. Para fines de este estudio, se utilizó la secuencia de aminoácidos

correspondiente a la subunidad catalítica de AHAS III de *P. aeruginosa* PA14 para el diseño del vector de expresión necesario para la producción de la enzima y los análisis de inhibición enzimática.

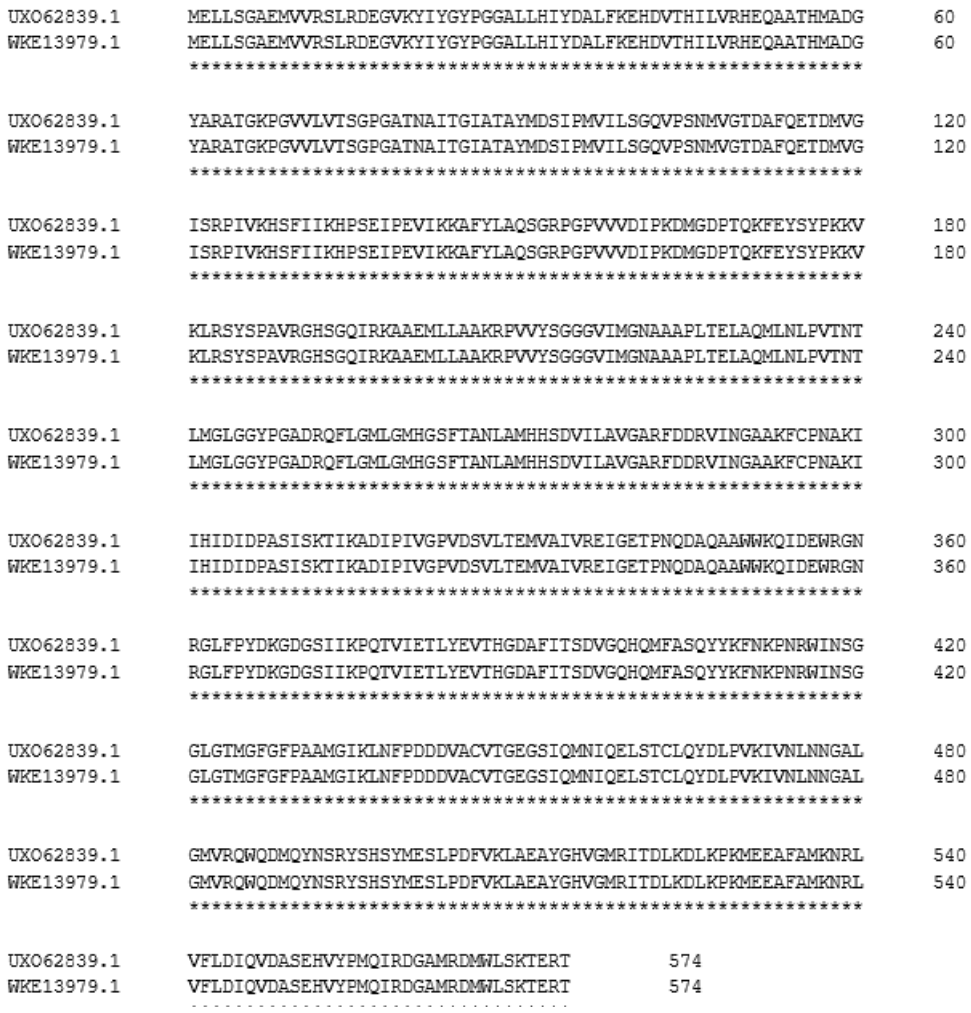

Figura 4. *Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad catalítica de AHAS III de las cepas PAO1 y PA14 de Pseudomonas aeruginosa.*

Posteriormente, se realizó un alineamiento comparativo de la secuencia de *Pa*AHAS con sus homólogos de planta (*At*AHAS), levadura (*Sc*AHAS) y bacteria (*Ec*AHAS). A diferencia de las secuencias homologas de *At*AHAS y *Sc*AHAS, que comparten un 40.81% y 42.91% de identidad, respectivamente; *Pa*AHAS no cuenta con un péptido señal, lo que se confirmó con la plataforma SignalIP 5.0. En contraste, el alineamiento entre *Pa*AHAS y *Ec*AHAS mostró que ambas enzimas tienen una longitud similar. Además, el alineamiento múltiple de secuencias permitió observar que el sitio de unión a herbicidas en *Pa*AHAS está altamente conservado con respecto a las secuencias de *At*AHAS, *Sc*AHAS y *Ec*AHAS. No obstante, se identificaron dos sustituciones puntuales en aminoácidos que forman parte

del brazo C-terminal que podrían afectar el acoplamiento de los herbicidas en la enzima (Figura 5). Estas sustituciones se localizan en los residuos 558 y 559 que codifican para una arginina y un aspartato, respectivamente. En la posición 558 equivalente en cada una de las enzimas homólogas a *Pa*AHAS, la arginina es reemplazada por tres aminoácidos distintos, serina (*At*AHAS), glicina (*Sc*AHAS) y prolina (*Ec*AHAS). Por otra parte, en la posición 559 las tres enzimas homólogas presentan la sustitución aspartato por glicina.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment


PaAHAS      ------------------------------------------------------------          0
EcAHAS      ------------------------------------------------------------          0
AtAHAS      ------------------MAAATTTTTT--SSSISFSTKPSPSSSKSPLPISRFSLPFSL          40
ScAHAS      MIRQSTLKNFAIKRCFQHIAYRNTPAMRSVALAQRFYSSSSRYYSASPLPASKRPEP---          57


PaAHAS      ------------------------------------------------------MEL          3
EcAHAS      ---------------------------------------M----ASSGTTSTRKR          12
AtAHAS      NPNKSSSSSRRRGIKSSSPSSISAVLNTTTNVTTTPSPTKPTKPE----TFISRFAPDQP          96
ScAHAS      -------------------------APSFNVDPLEQPAEPSKLAKKLRAEPDMDTSFVG          91

                                  G28 A29
                                   | |
PaAHAS      LSGAEMVVRSLRDEGVKYIYGYPGGALLHIYDALFKEHDVTHILVRHEQAATHMADGYAR          63
EcAHAS      FTGAEFIVHFLEQQGIKIVTGIPGGSILPVYDALSQSTQIRHILARHEQGAGFIAQGMAR          72
AtAHAS      RKGADILVEALERQGVETVFAYPGGASMEIHQALTRSSSIRNVLPRHEQGGVFAAEGYAR          156
ScAHAS      LTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGYPGGAILPVYDAIHNSDKFNFVLPKHEQGAGHMAEGYAR          151
             .*.::. . :  :.:. : . ***: : :::*: .. ..  :* :***.. . *:* **

                                                  V103 P104  M107
                                                   | |    |
PaAHAS      ATGKPGVVLVTSGPGATNAITGIATAYMDSIPMVILSGQVPSNMVGTDAFQETDMVGISR          123
EcAHAS      TDGKPAVCMACSGPGATNLVTAIADARLDSIPLICITGQVPASMIGTDAFQEVDTYGISI          132
AtAHAS      SSGKPGICIATSGPGATNLVSGLADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTR          216
ScAHAS      ASGKPGVVLVTSGPGATNVVTPMADAFADGIPMVVFTGQVPTSAIGTDAFQEADVVGISR          211
            : ***.: :. ******* :: :* *  *.:*:: ::****   :*******.    ::
                                                  K163
                                                   |
PaAHAS      PIVKHSFIIKHPSEIPEVIKKAFYLAQSGRPGPVVVDIPKDMGDPTQKFEYSY---PKKV          180
EcAHAS      PITKHNYLVRHIEELPQVMSDAFRIAQSGRPGPVWIDIPKDVQTAVFEIET-----QPAM          187
AtAHAS      SITKHNYLVMDVEDIPRIIEEAFFLATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNW-----EQAM          271
ScAHAS      SCTKWNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGPVLVDLPKDVTAAILRNPIPTKTTLPSN          271
              .* . ::   .::*  :..** :* ******* :*:***:

PaAHAS      KLRSYSPA--VRGHSGQIRKAAEMLLAAKRPVVYSGGGVIMGN-AAAPLTELAQMLNLPV          237
EcAHAS      AEKAA---AP-AFSEESIRDAAAMINAAKRPVLYLGGGVIN---APARVRELAEKAQLPT          240
AtAHAS      RLPGYMSRMPKPPEDSHLEQIVRLISESKKPVLYVGGGCLN---SSDELGRFVELTGIPV          328
ScAHAS      ALNQLTSRAQDEFVMQSINKAADLINLAKKPVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPV          331
                         :.. . ::  :*:**:* *.* :    .   : .: :   :*.
```

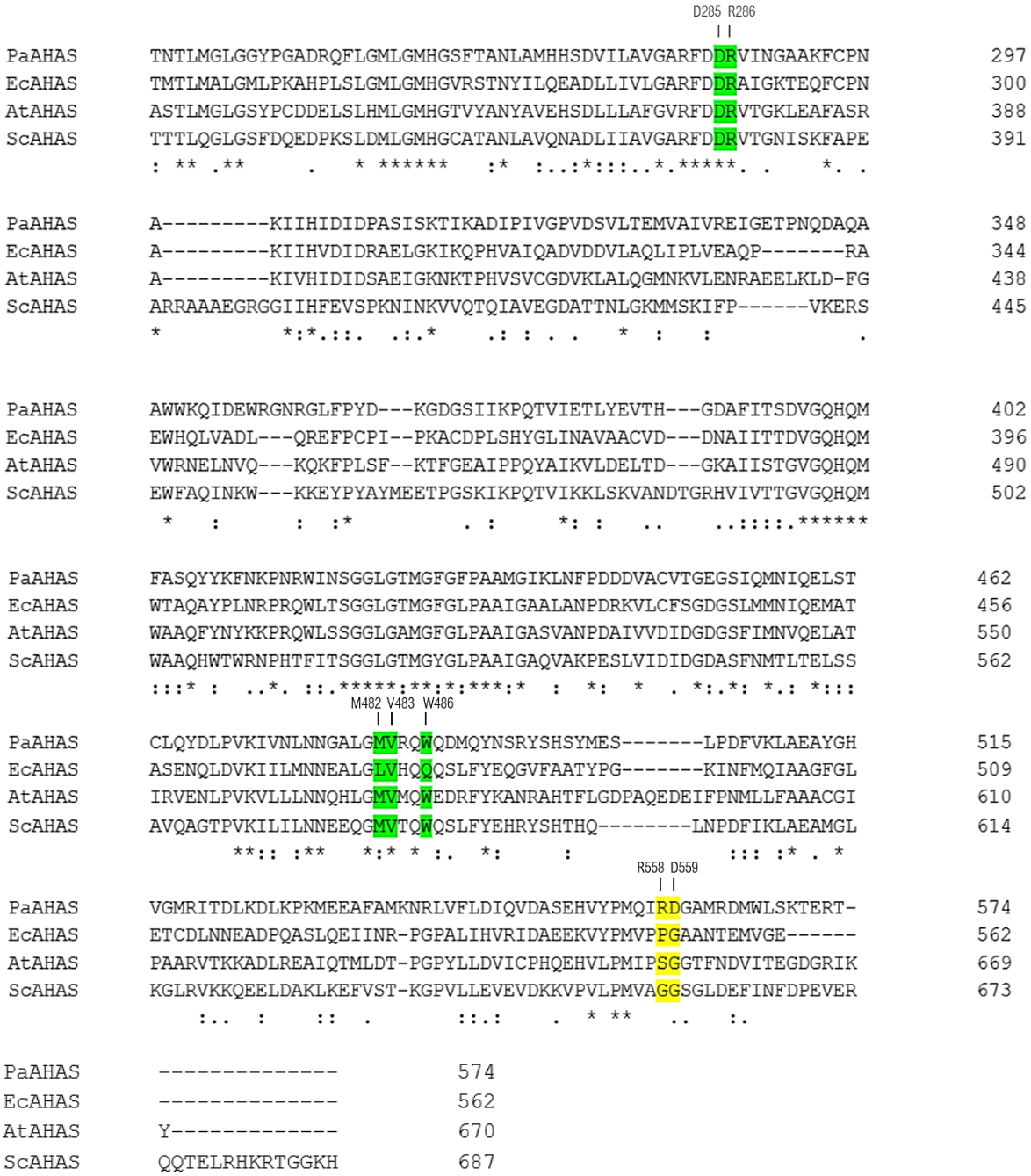

Figura 5. *Alineamiento múltiple de secuencias de PaAHAS con sus homólogos de bacteria, planta y levadura. El alineamiento de secuencias de PaAHAS con sus homólogos de bacteria (EcAHAS), planta (AtAHAS) y levadura (ScAHAS), muestra que el sitio de unión a herbicidas en PaAHAS es altamente conservado (regiones de color verde), excepto por las substituciones* R558S y D559G *(regiones de color amarillo).*

Con estos resultados, previo al diseño del vector de expresión, se realizó una optimización de codones del gen que codifica para la subunidad catalítica de *Pa*AHAS con el fin de favorecer la expresión de la

enzima en *E. coli* **(Fu et al., 2020)**. La optimización de codones se realizó empleando la herramienta de optimización de IDT. Además, se incorporaron sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* en los extremos N- y C-terminal, respectivamente, para facilitar su clonación en el vector, además de una cola de 6xHis y un codón de terminación de la traducción de la proteína en el organismo huésped. Finalmente, la secuencia optimizada fue clonada en el plásmido pET-30a(+) mediante un servicio de síntesis y clonación externo.

3.1.2 Purificación de la enzima *Pa*AHAS

Como se mencionó anteriormente, el diseño del vector de expresión de la enzima *Pa*AHAS incluyó una cola de 6 histidinas en el extremo C- terminal con el propósito de facilitar su purificación mediante cromatografía líquida de afinidad **(Spriestersbach et al., 2015)**. Para ello, se empleó una columna Ni – NTA, la cual contiene iones de níquel inmovilizados por el ligando quelante ácido nitrilotriacético (NTA). Este compuesto posee cuatro sitios de unión que estabilizan el metal, minimizando su lixiviación durante el proceso. La interacción entre la proteína y la resina se da a través de los átomos de nitrógeno no protonados del anillo imidazol de las histidinas, que se unen específicamente al níquel presente en la columna **(Zhou et al., 2024)**.

En la Figura 6A se observa el cromatograma de purificación de *Pa*AHAS, donde la altura y área bajo la curva son proporcionales a la concentración de proteínas presentes en la muestra. Posterior a la elución de la proteína, la línea de lectura de la absorbancia no vuelve a ser basal, lo cual se atribuye a la alta concentración de imidazol presente en el buffer de elución. Este compuesto desplaza la cola de histidinas de la enzima desde la resina Ni-NTA durante la elución al competir por los sitios de unión metálicos, facilitando así su liberación de la matriz cromatográfica **(He et al., 2015)**. La enzima purificada fue posteriormente sometida a un paso de intercambio de buffer empleando una columna de filtración en gel. La concentración de *Pa*AHAS en las fracciones resultantes, determinada mediante el método de Biuret, fue de 0.71 mg/mL, considerando un volumen inicial de 57 mL.

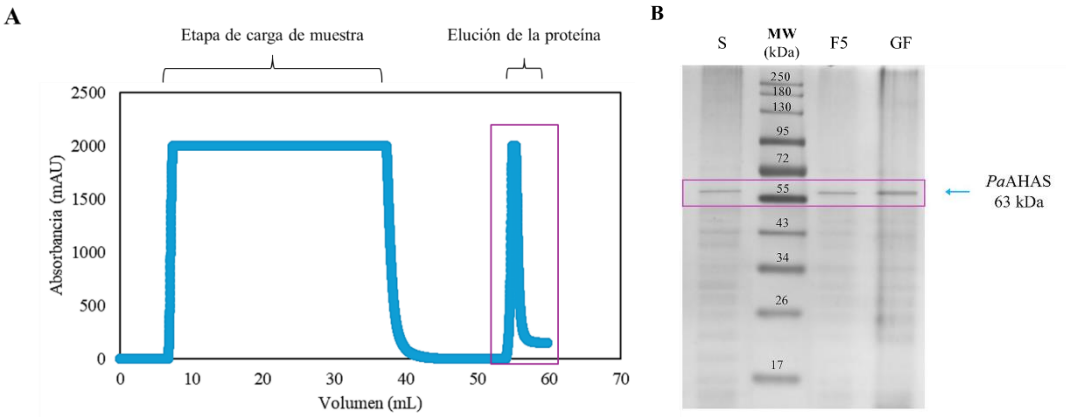

Figura 6. *Purificación de la enzima PaAHAS.* ***A*** *Cromatograma de la purificación de PaAHAS mediante cromatografía de afinidad (Ni-NTA). El rectángulo muestra el pico de elución de PaAHAS* ***B*** *Análisis SDS-PAGE de PaAHAS. S representa al sobrenadante del extracto celular, MW al marcador de peso molecular, F5 a la fracción con mayor contenido de proteína y GF muestras obtenidas tras la filtración en gel. Cada muestra a excepción del marcador de peso molecular se diluyó en 10 uL de buffer de carga 3X y se cargó 15 uL de muestra en el gel 10% de SDS-PAGE. Luego de la separación, el gel fue tratado con azul de Coomassie para la visualización de las proteínas. La flecha indica la posición de PaAHAS.*

Una vez purificada la proteína, se analizó su pureza y calidad mediante SDS-PAGE, en donde la intensidad de las bandas del gel se relaciona directamente con la concentración de proteína presente en la muestra. Como se puede observar en la Figura 6B, el primer carril corresponde al sobrenadante, que comprende la fracción soluble del citoplasma, donde se observa número considerable de bandas. Esto se debe a la alta densidad de proteínas nativas de *E. coli* involucradas en el metabolismo básico, la traducción, el transporte y la regulación celular. **Rosano & Ceccarelli, (2014)** destacan que *E. coli* produce una gran cantidad de proteínas funcionales en condiciones normales de crecimiento, y que muchas de ellas se conservan tras la lisis celular. Además, cuando se induce la expresión de una proteína recombinante, el sistema de la célula se ve alterado, lo que puede inducir la expresión de chaperonas, proteasas o proteínas de estrés, contribuyendo a la diversidad de bandas observadas en el gel. Además, se observa la presencia de una banda intensa por encima de la banda de 55 kDa del marcador de peso molecular, la cual se presume corresponde a *Pa*AHAS (63 kDa). El tercer carril corresponde a la fracción de elución 5 (F5), obtenida mediante cromatografía de afinidad, donde se observó una banda de ~63 kDa consistente con el peso molecular de *Pa*AHAS, junto a otras bandas menores. Esta co-elución puede deberse a la retención inespecífica de proteínas bacterianas con residuos de histidina superficiales o a productos de degradación de la proteína recombinante **(Baneyx, 1999)**. Además, concentraciones subóptimas de imidazol durante el lavado pueden permitir que proteínas de afinidad débil permanezcan unidas a la matriz. Finalmente, la muestra GF, obtenida tras filtración en gel de la

enzima con una resina de Sephadex G-25, mostró una banda predominante de 63 kDa, correspondiente a la proteína de interés, acompañada de pocas bandas adicionales. Aunque estas proteínas co-purificadas no afectan la estructura ni función de *Pa*AHAS, no permiten determinar con claridad la concentración final de la enzima por métodos colorimétricos **(Scopes, 1994)**. Por lo cual, es necesario aplicar técnicas de análisis de imágenes para determinar la concentración real de la enzima mediante la correlación entre la intensidad de las bandas presentes en el gel y la concentración de proteína presente en la muestra determinada analíticamente.

3.1.3 Determinación de las constantes de inhibición (K_i) de *Pa*AHAS

La determinación de las constantes de inhibición (K_i) fue de gran relevancia en este estudio, ya que permitió establecer comparaciones cuantitativas entre distintos herbicidas con potencial antimicrobiano. Este enfoque no solo permitió jerarquizar la afinidad de cada compuesto por la enzima *Pa*AHAS, sino que también ofreció evidencia funcional sobre su capacidad inhibitoria **(Kreisberg et al., 2013)**. Los valores de K_i determinados para la inhibición de *Pa*AHAS en presencia de CE, PS, MT y FS, así como su comparación con enzimas homólogas de otros organismos, permitió contextualizar su eficacia relativa y especificidad inhibitoria en *P. aeruginosa* (Tabla 5).

Como se observa en la Tabla 5, el herbicida con mayor afinidad hacia *Pa*AHAS fue Florasulam (FS), perteneciente a la familia de las triazolopirimidinas, con un valor de K_i de 3.96 ± 1.9nM. Seguido por Penoxsulam (PS) con un K_i de 7.84 ± 1.15nM, aproximadamente el doble que FS. La sulfonilurea Clorimuron etil (CE) presentó un K_i de 24.20 ± 1.9nM, 6 veces más alto a comparación con FS. Por último, el inhibidor con menor afinidad hacia la enzima fue Metosulam (MT), con un K_i de 34.51 ± 2.21nM, aproximadamente 9 veces mayor que FS.

Tabla 5.

Constantes de inhibición (K_i) de herbicidas comerciales frente a AHAS de distintos organismos.

Herbicida	***K_i (nM)***						
	PaAHAS*	***MtbAHAS***	***CaAHAS***	***CnAHAS***	***AfuAHAS***	***AtAHAS***	***ScAHAS***
CE	24.20 ± 1.9	1100 ± 0.3	24.3 ± 2.5	119.7 ± 4.2	23.4 ± 1.3	74.7 ± 6.1	3.3
PS	7.84 ± 1.15	110 ± 10	2.4 ± 0.3	331.1 ± 20.0	1.8 ± 0.9	1.9 ± 0.9	2.2 ± 0.4
FS	3.96 ± 0.14	230 ± 30	10.1 ± 1.7	590 ± 41.0	14.4 ± 2.7	-	-
MT	34.51 ± 2.21	20 ± 10	0.8 ± 0.1	65.4 ± 4.9	1.4 ± 0.2	-	-

Nota: *Los valores de R^2 de para la determinación de los K_i de AHAS de *P. aeruginosa* fueron: CE: 0.976; PS: 0.925; FS: 0.996; MT: 0.987; (-): No determinado. Los datos de *Ca*AHAS, *Cn*AHAS, *Afu*AHAS, *At*AHAS, *Sc*AHAS y *Mtb*AHAS fueron obtenidos de García et al., (2018); Low et al., (2021); García et al., (2017); Pang et al., (2003); Wun et al., (2025); Lonhienne et al., (2018). ± corresponde al error estándar de la media (SEM).

Los coeficientes de determinación (R^2) fueron mayores a 0.92 en todos los casos, indicando un buen ajuste de los datos al modelo de inhibición **(Chang & Duggleby, 1998)**. El menor R^2 fue de PS (0.925), reflejando una mayor variabilidad experimental respecto a los otros herbicidas.

La Figura 7 representa la relación entre la concentración de herbicida y la actividad enzimática. Se observó que FS y PS inducen una inhibición significativa incluso a bajas concentraciones, mientras que CE y MT requieren dosis considerablemente mayores para lograr un efecto similar.

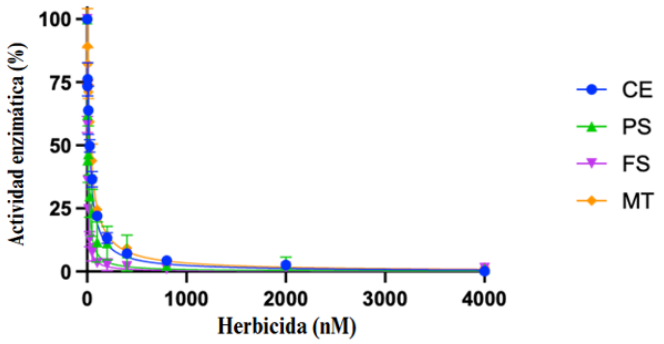

Figura 7. *Porcentaje de actividad enzimática vs concentración de herbicida. CE: clorimuron etil; PS: penoxsulam; FS: florasulam; MT: metosulam. Las curvas muestran la actividad enzimática residual (%) en función de la concentración de inhibidor (nM). Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas independientes. Los datos evidencian que FS y PS inducen una inhibición más potente a bajas concentraciones, mientras que CE y MT requieren mayores concentraciones para lograr el mismo efecto.*

La enzima *Pa*AHAS exhibe alta sensibilidad frente a CE (24.20 ± 1.9), al igual que *Ca*AHAS (24.3 ± 2.5 nM), *Afu*AHAS (23.4 ± 1.3 nM) *y Sc*AHAS (3.3 nM), sugiriendo modos de unión similares en las cuatro enzimas **(Pang et al., 2003)**. En contraste, la inhibición es menos marcada en *Mtb*AHAS (1100 ± 0.3 nM), *At*AHAS (74.7 ± 6.1 nM) y *Cn*AHAS (119.7 ± 4.2 nM), aunque confirma la capacidad de CE para interactuar con diversas variantes de esta enzima. Esto sugiere que, debido a su capacidad de inhibir AHAS de distintos organismos, el compuesto podría tener efecto sobre otras formas de la enzima presentes en otros organismos patógenos o plantas de interés **(Gressel, 2011)**. Un patrón similar se observa con PS y FS. Estos compuestos presentan mayor potencia inhibitoria en comparación con CE., confirmando una mayor afinidad de ambos herbicidas frente a las enzimas de *Pa*AHAS (7.84 ± 1.15 y 3.96 ± 0.14 µM), *Ca*AHAS (2.4 ± 0.3; 10.1 ± 1.7 µM), *Afu*AHAS (3.96 ± 0.14; 10.1 ± 1.7 µM), *Mtb*AHAS (110±10; 230±30 µM), *At*AHAS (1.9 ± 0.9 µM) y *Sc*AHAS (2.2 ± 0.4 µM). A diferencia de

*Cn*AHAS (331.1 ± 20.0; 590 ± 41.0 μM) evidenciando su baja sensibilidad natural a ciertos herbicidas, lo que podría incluir a PS y FS **(García et al., 2018)**.

MT presentó gran eficacia frente a *Ca*AHAS *y Afu*AHAS (0.8 ± 0.1; 1.4 ± 0.2 respectivamente). Sin embargo, en *Pa*AHAS, *Cn*AHAS, *Mtb*AHAS la K_i fue significativamente mayor (34.51 ± 2.21; 65.4 ± 4.9; 20 ± 10 μM). Estas diferencias podrían deberse a: (i) variaciones en residuos clave, (ii) un canal de unión más estrecho en la subunidad catalítica de la enzima y (iii) menor complementariedad estructural en hongos, bacterias y levaduras **(García et al., 2018; Wun et al., 2025; Gedi & Yoon, 2012)**. Asimismo, esto puede ocurrir por consecuencia de mutaciones individuales en el sitio de unión al herbicida, tales como P197S, W574L o S653N, asociadas a factores de resistencia de AHAS, ya que modifican la estructura del canal de acceso o formación de enlaces con herbicidas **(Lee et al., 2011; McCourt et al., 2006)**.

3.1.4 Análisis de susceptibilidad antimicrobiana mediante ensayos de difusión en disco

La determinación del perfil de sensibilidad de *P. aeruginosa* ATCC 25668 se realizó empleando la técnica de difusión en disco. Este método se fundamenta en el principio de difusión radial de los compuestos antimicrobianos desde el disco hacia el agar, generando un gradiente de concentración que se manifiesta mediante la formación de zonas de inhibición del crecimiento bacteriano. La medición del diámetro de estos halos proporciona información cuantitativa sobre la eficacia del compuesto, donde diámetros mayores indican mayor potencia inhibitoria **(Gajic et al., 2022)**.

Para la interpretación de los resultados, se aplicaron los criterios de sensibilidad establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizando como controles de referencia tres antibióticos de primera línea: piperacilina – tazobactam (TZP), amikacina (AK) y ciprofloxacina (CIP) **(Wood et al., 2023)**. Estos fármacos mostraron una alta eficiencia frente a *P. aeruginosa* con halos de inhibición de 43 mm, 38 mm y 45 mm respectivamente y sirvieron como parámetro comparativo para estimar la actividad de otros compuestos antimicrobianos. La selección de estos controles se basó en su relevancia clínica actual y en su inclusión en las guías CLSI para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* **(CLSI, 2025)**.

Los resultados que se muestran en la Tabla 6 evidencian la actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos utilizados y su clasificación en comparación con antibióticos de referencia. Entre los

herbicidas evaluados, CE destacó significativamente con un halo de inhibición de 29 mm, clasificado como susceptible en TZP, AK y CIP. Este resultado sugiere que, CE podría tener una eficiencia comparable a los antibióticos convencionales frente a cepas sensibles de *P. aeruginosa*. Esto concuerda con la investigación realizada por **Kreisberg et al., (2013)** en donde se destaca el potencial antimicrobiano de herbicidas pertenecientes a la familia SU, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además, estudios realizados en *C. albicans* demostraron que CE tiene una potente actividad antifúngica gracias a su potencial inhibidor de la enzima AHAS, blanco altamente conservando en hongos y bacterias **(García et al., 2018)**.

Tabla 6.

Puntos de corte del diámetro del halo de inhibición (mm) de Pseudomonas aeruginosa ATCC 25668 frente a diferentes inhibidores.

Compuesto/Dosis (ug)	***Diámetro del halo (mm)***	***Antibiótico de referencia***		
		Amikacina	***Ciprofloxacina***	***Piperacilina-tazobactam***
AK/ 30	38	S	-	-
CIP/ 5	45	-	S	-
TZP/ 110	43	-	-	S
CE/ 331.86	29	S	S	S
PS/ 386.70	14	R	R	R
FS/ 287.42	16	I	R	R
MT/ 207. 48	0	R	R	R
AMP/ 800	34	S	S	S
KAN/ 4.10	15	I	R	R
CHL/ 400	20	S	I	I

Nota: (-): No aplica. AK: Amikacina; CIP: Ciprofloxacina; TZP: Piperacilina – Tazobactam; CE: Clorimuron Etil; PS: Penoxsulam; FS: Florasulam; MT: Metosulam; AMP: Ampicilina; KAN: Kanamicina; CHL: Cloranfenicol. Clasificación de susceptibilidad según criterios de referencia CLSI, (2025) para *P. aeruginosa.* R = Resistente, I = Intermedio y S = Susceptible.

Por otro lado, los herbicidas FS y PS, mostraron halos de inhibición menores, de 16 mm y 14 mm respectivamente. En contraste con los antibióticos de referencia, FS se clasificó como intermedio para AK, mientras que, se consideró resistente frente a los otros dos compuestos. Por su parte, PS fue

clasificado como resistente frente a los tres fármacos. La diferencia en la susceptibilidad de estos herbicidas, pertenecientes a la misma familia, puede atribuirse a varios factores. Sin embargo, la variación en los sustituyentes de los anillos aromáticos y heterocíclicos presentes en la estructura de estos herbicidas no es una de ellas, ya que como se indicó anteriormente estos dos herbicidas presentaron gran afinidad por la enzima AHAS **(Low et al., 2021)**. Caso contrario de lo que ocurre con MT, que no presentó un halo de inhibición. Este resultado es consistente con el mayor valor de K_i observado en el estudio enzimático y coincide con investigaciones que señalan una menor afinidad de MT hacia AHAS bacterianas en comparación con las de hongos o plantas **(Agnew et al., 2020)**. La baja actividad inhibitoria de estos tres compuestos sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* puede deberse a los diversos mecanismos de resistencia intrínseca de esta bacteria, como una limitada penetración del compuesto a través de la membrana externa. Esto concuerda con lo propuesto por **Pang et al., (2019)** quien menciona que este patógeno presentan una barrera de permeabilidad altamente selectiva que dificulta el acceso de compuestos hidrofóbicos o de gran tamaño molecular. Además, otro factor importante es la presencia de bombas de eflujo que reducen la concentración intracelular efectiva del herbicida **(Breidenstein et al., 2011)**.

Respecto a los antibióticos no incluidos en la guía del CLSI para *P. aeruginosa,* como la ampicilina (AMP), kanamicina (KAN) y cloranfenicol (CHL). Se observó que, aunque AMP y CHL presentaron halos de inhibición de 34 mm y 20 mm, respectivamente, las concentraciones requeridas fueron significativamente mayores que los antibióticos de referencia. En el caso de los β-lactámicos, AMP y TZP, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular de péptidoglicano mediante la unión covalente de proteínas de unión a penicilinas, esenciales para la bacteria **(Wood et al., 2023)**. *P. aeruginosa* posee un gen *amp*C inducible, que codifica la enzima β-lactamasa, capaz de romper el enlace amida del anillo β-lactámico, inactivando estos antibióticos **(Wright, 2005)**. Además, se ha descubierto que ciertos aislados de *P. aeruginosa* producen β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) confiriendo alto grado de resistencia a la mayoría de los antibióticos β-lactámicos, incluidas las penicilinas, las cefalosporinas y el aztreonam **(Deepti & Deepthi, 2010)**. Para contrarrestar la resistencia causada por la β-lactamasa, se han implementado inhibidores de esta enzima, como el tazobactam, los cuales han demostrado mejorar significativamente la efectividad de los antibióticos β-lactámicos en terapias combinadas **(Drawz & Bonomo, 2010)**. Esto se ve reflejado, en la superior actividad inhibitoria de TZP sobre AMP, ambas penicilinas. A pesar de los halos de inhibición obtenidos para la AMP sugieren que P. aeruginosa es susceptible a este antibiótico, la concentración empleada frente a los antibióticos de referencia hace que su uso no sea viable en un entorno clínico.

En cuanto al CHL, este es un agente bacteriostático que bloquea la síntesis de proteínas al unirse de forma reversible a la peptidiltransferasa de la subunidad ribosómica 50S, lo que impide la transpeptidación durante la elongación de la cadena peptídica **(Morita et al., 2013)**. Su clasificación frente a los antibióticos de referencia fue variable. Por ejemplo, cuando se compara a este fármaco con la AK, se podría concluir que *P. aeruginosa* es susceptible a CHL, mientras que cuando se lo compara con la CIP o TZP, su efecto puede ser definido como intermedio. Normalmente, *P. aeruginosa* exhibe resistencia al cloranfenicol; sin embargo, en este estudio se demostró que este patógeno es susceptible a una concentración de 400 ug bajo las condiciones de estudio. Por esta razón, aunque el cloranfenicol sea un antibiótico de amplio espectro, actualmente se encuentra en desuso debido a su efecto tóxico, pudiendo desencadenar anemia aplásica irreversible **(Čivljak et al., 2014).**

Finalmente, KAN mostró un halo de inhibición de 15 mm, clasificada como intermedia para AK y resistente para TZP y CIP. Este compuesto al igual que la AK pertenecen a la familia de los aminoglucósidos, antibióticos de amplio espectro que inhiben la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano **(Wood et al., 2023)**. La resistencia a esta familia de fármacos en *P. aeruginosa* se debe principalmente a la modificación enzimática de los grupos amino y glucósidos en la estructura molecular de estos antibióticos **(Ratjen et al., 2009)**. Se han identificado tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en bacterias: aminoglucósido fosfotransferasa (APH), aminoglucósido acetiltransferasa (AAC) y aminoglucósido nucleotidiltransferasa (ANT). El mecanismo de acción de las APH de *P. aeruginosa* se fundamenta en la transferencia de un grupo fosforilo al 3′-hidroxilo de aminoglucósidos como la kanamicina, la neomicina y la estreptomicina, inactivando así estos antibióticos **(Poole, 2005)**. Además, esta bacteria puede generar resistencia por medio de mecanismos adquiridos por mutaciones, en específico la sobreexpresión de bombas de eflujo inducidas por la mutación en el gen *mexZ* **(Guénard et al., 2014)**. A diferencia de lo observado en nuestro ensayo con KAN, *P. aeruginosa* es altamente susceptible a la AK. Por esta razón, la AK cuenta con un gran potencial en el tratamiento de enfermedades broncopulmonares causadas por esta bacteria. **Sutherland et al., (2016)** demostraron que la AK administrada por vía respiratoria exhibe un efecto sinérgico cuando se combina con otros antimicrobianos, estrategia actualmente usada para combatir la resistencia, actuando como coadyuvante complementario que potencia terapias convencionales.

3.1.5 Determinación de las constantes mínimas inhibitorias (MIC_{50}) de *Pseudomonas aeruginosa cepa ATCC 25668*

La susceptibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* a herbicidas comerciales también se evaluó mediante ensayos de microdilución que permitieron determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC_{50}) de cada compuesto. Este valor representa la concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de la población bacteriana bajo las condiciones del ensayo. A diferencia de los métodos basados en agar, esta técnica permite medir la actividad antimicrobiana bajo condiciones homogéneas de exposición que no están influenciadas por efectos de la difusión, lo que proporciona una estimación más precisa de la concentración inhibitoria efectiva **(Andrews, 2001)**.

En la Tabla 7 se presentan los valores de MIC_{50} de los antimicrobianos evaluados frente a *P. aeruginosa* y otros organismos. Respecto a los herbicidas, CE fue el herbicida más eficaz frente a este microorganismo con una MIC_{50} de 54.2 ± 10.6 µg/ mL. Lo que podría atribuirse a su equilibrio entre polaridad y permeabilidad, lo que les confiere una ventaja frente a compuestos más lipofílicos. Además, la presencia de ciertos grupos funcionales (sulfonilurea, éster y carboxilo) y anillos aromáticos, en su estructura, aumenta su capacidad hidrofílica, facilitando su permeabilidad e interacción con membranas bacterianas **(Tharmalingam et al., 2025)**. Aun así, la MIC_{50} obtenida para CE supera a la reportada en *C. neoformans* (2.75 µg/mL), *C. albicans* (0.030 µg/mL), *S. cerevisiae* (0.008 µg/mL) y *M. tuberculosis (*6.27 µg/mL) **(García et al., 2018;Low et al., 2021)**. Sin embargo, coincide con el valor de MIC reportado para *P. aeruginosa* PAO1 (MIC_{100} de 25.93 µg/mL) **(Kreisberg et al., 2013)**. En comparación con los resultados obtenidos para otros patógenos humanos CE es significativamente más efectivo para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* que para *A. fumigatus* (MIC = 100 µg/mL).

FS alcanzó una MIC_{50} de 69.3 ± 14.8 µg/mL, 30% menos eficaz que CE. Su estructura, que posee un solo grupo amina secundario (-NH-), capaz de actuar como donador de enlaces de hidrógeno. Este grupo le otorga mayor permeabilidad y lo protege del sistema de bombas de eflujo presentes en *P. aeruginosa,* lo que explica su buena biodisponibilidad intracelular **(Amsalu et al., 2020)**. La MIC_{50} de FS en *P. aeruginosa* es similar a lo reportado en *C. neoformans* (MIC_{50} = 22.42 µg/mL). No obstante, este compuesto carece de actividad contra *A. fumigatus (*>100 µg/mL) y resulta notablemente más potente en ensayos realizados con otros patógenos, como *M. tuberculosis* (0.39 µg/mL), *C. albicans (*5.92 µg/mL *y S. cerevisiae* (0.05 µg/mL) **(García et al., 2018;Low et al., 2021; Wun et al., 2025)**.

Por otro lado, MT presentó una MIC_{50} superior a 187.9 µg/mL en *P. aeruginosa* ATCC 25668. Puede ser atribuible al mayor número de grupos polares y enlaces de hidrógeno, los cuales reducen la permeabilidad del compuesto **(Mehla et al., 2021)**. Esto dificultan su paso a través de la membrana externa y la hacen más susceptibles a los mecanismos de expulsión activa **(Amsalu et al., 2020)**. Curiosamente, MT es significativamente más eficaz contra hongos, levaduras y bacterias grampositivas como *C. neoformans* (19 µg/mL), *C. albicans* (0.24 µg/mL), *S. cerevisiae* (0.04 µg/mL) y *A. fumigatus* MT (25 µg/mL), *M. tuberculosis* (0.19 µg/mL) **(García et al., 2018; Low et al., 2021; Wun et al., 2025)**.

PS resultó ser menos eficaz (MIC_{50} >483.3 µg/mL) pese a presentar un K_i bajo (7.84 ± 1.15 nM). Esto puede ser atribuible a su permeabilidad reducida y posiblemente la acción de mecanismos de resistencia intrínsecos de *P. aeruginosa.* Su bajo efecto inhibitorio contrasta con las MIC_{50} de *M. tuberculosis* (0.28 µg/mL), *A. fumigatus* (25 µg/mL), *S. cerevisiae* (0.03 µg/mL) y *C. albicans* (1 µg/mL) **(García et al., 2018; Low et al., 2021; Wun et al., 2025)**. PS fue inactivo frente a *C. neoformans* (>100 µg/mL) atribuido a la resistencia del blanco molecular, en donde este hongo presenta variaciones en el sitio activo a comparación con otras especies fúngicas. Estas diferencias incluyen sustituciones de aminoácidos que generan incompatibilidad con algunos herbicidas, como fue el caso de PS **(García et al., 2018)**. Este fenómeno no se observa en *P. aeruginosa*, ya que los datos enzimáticos evidencian una adecuada inhibición de la enzima AHAS por parte de todos los compuestos evaluados.

La eficacia microbiana de los herbicidas no depende únicamente de su afinidad con AHAS, sino también de factores fisiológicos del patógeno. *P. aeruginosa* posee una baja permeabilidad y la acción de bombas de eflujo que disminuyen la concentración intracelular efectiva del herbicida, así como la barrera periplásmica en bacterias gramnegativas, que condicionan la concentración intracelular efectiva de los herbicidas **(Lorusso et al., 2022; Jamwal et al., 2024)**. Esto explicaría por qué compuestos como PS y MT a pesar de su elevada funcionalidad *in vitro*, presentan baja eficacia *in vivo* **(Giovagnorio et al., 2023)**. En CE, la sensibilidad observada no parece depender de una cepa específica, sino una característica intrínseca del patógeno.

P. aeruginosa es ampliamente reconocida por su elevada resistencia intrínseca y adquirida hacia múltiples clases de antimicrobianos **(Elfadadny et al., 2024)**. En este contexto, los valores de CE y FS, aunque aparentan ser altos a comparación de los obtenidos en organismos fúngicos, no se alejan de los valores anteriormente reportados de *P. aeruginosa* en ensayos clínicos de resistencia **(Lyu et al., 2023)**. De hecho, la baja eficacia que presentan PS y MT es coherente con la insensibilidad natural de *P.*

aeruginosa a diversas moléculas **(Amsalu et al., 2020)**. Por ello, los resultados obtenidos y los reportados, no solo reflejan obstáculos en la reutilización de ciertos herbicidas, sino también la complejidad inherente de enfrentar a un patógeno caracterizado por sus múltiples mecanismos de detoxificación y exclusión de fármacos **(Lorusso et al., 2022; Tetard et al., 2019)**.

Tabla 7.

Constantes Mínimas Inhibitorias (MIC_{50}) de diferentes compuestos antimicrobianos frente a AHAS de otros organismos.

Compuesto	MIC_{50} (µg/mL)						
	***Pseudomonas aeruginosa* ATCC25668**	***Pseudomonas aeruginosa* PAO1***	***Mycobacterium tuberculosis****	***Candida albicans***	***Cryptococcus neoformans***	***Aspergillus fumigatus****	***Saccharomyces cerevisiae***
CE	54.2 ±10.6	25.93	6.27	0.03	2.75	100	0.008
PS	>483.3	-	0.28	1.00	>100	25	0.03
FS	69.3 ±14.8	-	0.19	5.92	22.42	>100	0.05
MT	>187.9	-	0.39	0.24	19	25	0.04
AMP	~940.8	-	-	-	-	-	-
KAN	340.2±62.4	-	-	-	-	-	-
CHL	31.8 ± 21.5	-	-	-	-	-	-
AK	0.23 ± 0.06	-	-	-	-	-	-
CIP	0.03 ± 0.01	-	-	-	-	-	-
TZP	1.58 ± 0.44	-	-	-	-	-	-

Nota*:* *Los valores indican MIC corresponden al 100% de inhibición del crecimiento microbiano. CE: Clorimuron Etil; PS: Penoxsulam; FS: Florasulam; MT: Metosulam; AMP: Ampicilina; KAN: Kanamicina; CHL: Cloranfenicol; AK: Amikacina; CIP: Ciprofloxacina; TZP: Piperacilina/Tazobactam. (-): No determinado. Los datos de *M. tuberculosis; C. albicans*, *C. neoformans*, *P. aeruginosa* PAO1 y *S. cerevisiae* fueron obtenidos de García et al., (2018); Low et al., (2021); Kreisberg et al., (2013); Wun et al., (2025). ± corresponde al error estándar de la media (SEM).

En cuanto a los antibióticos evaluados, CIP, AK y TZP exhibieron las MIC_{50} más bajas, con valores de 0.03 ± 0.01; 0.23 ± 0.06 µg/mL y 1.58 ± 0.44 µg/mL, respectivamente. La eficacia de CIP sea asocia con su naturaleza lipofílica y la inhibición simultánea de ADN girasa y topoisomerasa IV, que afecta la replicación bacteriana **(Zhao et al., 1997)**. AK presenta resistencia frente a enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs), inactivando otros antibióticos pertenecientes a esta familia, como kanamicina **(Ramirez & Tolmasky, 2010)**. Y TZP combina la inhibición de la síntesis de la pared celular con la protección a β-lactamasas, enzimas comúnmente expresadas por *P. aeruginosa* **(Carcione et al., 2021)**.

De manera similar, CHL mostró una actividad intermedia, con un MIC_{50} de 31.8 ± 21.5 µg/mL. Tal como se discutió en los ensayos de difusión en agar, esta efectividad podría estar relacionada con la ausencia de enzimas inactivadoras específicas en *P. aeruginosa*, las cuales sí están presentes en otros patógenos gramnegativos como *E. coli* **(Bischoff et al., 2002)**. En contraste la AMP (~940.8 µg/mL) y KAN (340.2 ± 62.4 µg/mL) fueron los antibióticos menos eficaces. Aunque pertenecen a las mismas familias que TZP y AK, respectivamente, se requieren concentraciones mucho más elevadas a comparación de AMP y KAN para alcanzar un efecto comparable. Esta diferencia en eficacia se debe a los mecanismos de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, como la producción de β-lactamasas en el caso de los β-lactámicos y la presencia de enzimas modificadoras y bombas de eflujo para los aminoglucósidos **(Elfadadny et al., 2024)**. Por estas razones, AMP y KAN son considerados ineficaces frente a este patógeno, a pesar de su pertenencia a clases antibióticas clínicamente relevantes.

Los herbicidas CE y FS, aunque menos potentes que CIP, TZP o AK, muestran actividad antimicrobiana significativamente superior a la de fármacos menos efectivos o ya no utilizados como KAN o AMP. Las discrepancias entre los valores de K_i y MIC_{50} ponen en evidencia que una buena inhibición enzimática no siempre se traduce en una alta eficacia antimicrobiana, especialmente en organismos con barreras estructurales complejas y múltiples mecanismos de resistencia, como es el caso de *P. aeruginosa*. La comparación con hongos, levaduras y otras bacterias sugiere que la eficacia de estos herbicidas está fuertemente influenciada por las características fisiológicas del microorganismo blanco. No obstante, su alta especificidad por la enzima AHAS, una diana metabólica ausente en células humanas los convierte en candidatos prometedores para el tratamiento de infecciones bacterianas, con un riesgo potencialmente bajo de toxicidad. En este contexto, futuras investigaciones dirigidas a mejorar su permeabilidad y reducir su expulsión activa podrían permitir el desarrollo de nuevos antimicrobianos eficaces, seguros y selectivos contra *P. aeruginosa*.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se logró el diseño y la construcción del vector pET-30a(+)_PaAHAS de manera exitosa mediante la clonación de la secuencia optimizada del gen *ilvI* de *Pseudomonas aeruginosa*. El plásmido permitió una eficiente expresión recombinante de la enzima *Pa*AHAS en *E. coli* BL21, cuya purificación fue confirmada por cromatografía de afinidad y análisis SDS-PAGE, mostrando una proteína de 63 kDa con alto grado de pureza.

- Se determinaron las constantes de inhibición (K_i) de los herbicidas comerciales Clorimuron etil (CE), Penoxsulam (PS), Metosulam (MT) y Florasulam (FS) frente a la enzima *Pa*AHAS. Los resultados revelaron que FS presentó la mayor afinidad inhibitoria, seguido por PS, mientras que CE y MT mostraron menor afinidad por la enzima. Estas diferencias sugieren una variabilidad estructural en el sitio activo de *Pa*AHAS en comparación con las AHAS de otros organismos. En base a estos hallazgos, FS y PS son los candidatos más prometedores para ser aplicados como inhibidores selectivos de *Pa*AHAS, aportando así al desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas dirigidas contra *P. aeruginosa*.

- Mediante ensayos de susceptibilidad por difusión en disco y microdilución, se evaluó la capacidad de los herbicidas seleccionados para inhibir el crecimiento de la cepa ATCC 25668 de *P. aeruginosa*. Los resultados mostraron que CE y FS presentaron una actividad antimicrobiana significativa, evidenciada por zonas de inhibición bien definidas y concentraciones inhibitorias medias (MIC_{50}) de 54.2 ± 10.6 μg/mL y 69.3 ± 14.8 μg/mL respectivamente. En contraste, PS y MT no mostraron inhibición significativa, lo que sugiere una baja permeabilidad bacteriana, inestabilidad intracelular o resistencia por bombas de eflujo. Estos hallazgos indican que algunos inhibidores de AHAS, particularmente CE y FS, podrían actuar como agentes antimicrobianos efectivos frente a cepas multirresistentes, siempre que logren alcanzar concentraciones activas dentro de la célula bacteriana.

4.2 Recomendaciones

- Realizar estudios de docking y dinámica molecular que permitan visualizar con mayor precisión la interacción de los herbicidas evaluados con el sitio activo de *Pa*AHAS. Esta información facilitaría la identificación de modificaciones estructurales específicas que potencien la afinidad inhibitoria y la especificidad del compuesto, optimizando así su perfil farmacológico.

- Explorar la actividad de los herbicidas inhibidores de AHAS frente a otros miembros del grupo ESKAPE, para determinar si esta estrategia terapéutica puede aplicarse de manera más amplia frente a patógenos multirresistentes.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

Agnew, K. A., Tang, Y., Lin, X., Low, Y. S., Wun, S. J., Kuo, A., Elias, S. M. A. S. I., Lonhienne, T., Condon, N. D., Pimentel, B. N. A. S., Vergani, C. E., Smith, M. T., Fraser, J. A., Williams, C. M., & Guddat, L. W. (2020). Herbicides that target Acetohydroxyacid Synthase are potent inhibitors of the growth of drug-resistant Candida auris. *ACS Infectious Diseases*, *6*(11), 2901–2912. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00229

Alvarado, O., García-Meseguer, R., Javier Ruiz-Pernía, J., Tuñon, I., & Delgado, E. J. (2019). A molecular dynamics study on the role of the protonation state in the biosynthesis of R-PAC by AHAS. *Chemical Physics Letters*, *716*, 247–251. https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2018.12.039

Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, *1*(DEC), 1–7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134

Amsalu, A., Sapula, S. A., Lopes, M. D. B., Hart, B. J., Nguyen, A. H., Drigo, B., Turnidge, J., Leong, L. E. X., & Venter, H. (2020). Efflux Pump-Driven Antibiotic and Biocide Cross-Resistance in Pseudomonas aeruginosa Isolated from Different Ecological Niches: A Case Study in the Development of Multidrug Resistance in Environmental Hotspots. *Microorganisms*, *8*(11), 1647. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111647

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(suppl_1), 5–16. https://doi.org/10.1093/JAC/48.SUPPL_1.5

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 411–421). https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8

Barak, Z., & Chipman, D. M. (2012). Allosteric regulation in Acetohydroxyacid Synthases (AHASs) - Different structures and kinetic behavior in isozymes in the same organisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *519*(2), 167–174. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.025

Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *48*(1), 1–12. https://doi.org/10.1086/595011

Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). Pseudomonas aeruginosa: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, *19*(8), 419–426. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005

Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, *529*(7586), 336–343. https://doi.org/10.1038/nature17042

Cerda-Mejía, L. (2016). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelero. In *Uiversitat de BBarcelona* (Vol. 86, Issue 1). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.031

Chang, A., & Duggleby, R. (1997). Expression, purification and characterization of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase. *Biochemical Journal*, *327*(1), 161–169. https://doi.org/10.1042/bj3270161

Chang, A., & Duggleby, R. G. (1998). Herbicide-resistant forms of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase: Characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. *Biochemical Journal*, *333*(3), 765–777. https://doi.org/10.1042/bj3330765

Čivljak, R., Giannella, M., Di Bella, S., & Petrosillo, N. (2014). Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens? A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *12*(2), 249–264. https://doi.org/10.1586/14787210.2014.878647

CLSI. (2025). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 35th ed.

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(3). https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19

Deepti, R., & Deepthi, N. (2010). Extended-spectrum ß-lactamases in gram negative bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, *2*(3), 263. https://doi.org/10.4103/0974-777x.68531

Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(1), 160–201. https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09

Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs*, *67*(3), 351–368. https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003

Duggleby, R. (2005). Suicide inhibition of acetohydroxyacid synthase by hydroxypyruvate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *20*(1), 1–4.

https://doi.org/10.1080/14756360400020553

Duggleby, R. ., Pang, S. S., Yu, H., & Guddat, L. W. (2003). Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase: Interpretation of herbicide-resistance data. *European Journal of Biochemistry*, *270*(13), 2895–2904. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03671.x

Duggleby, R., & Pang, S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Biochemistry and Molecular Biology*, *33*, 1–36.

ECDC. (2023). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*.

Elfadadny, A., Ragab, R. F., AlHarbi, M., Badshah, F., Ibáñez-Arancibia, E., Farag, A., Hendawy, A. O., De los Ríos-Escalante, P. R., Aboubakr, M., Zakai, S. A., & Nageeb, W. M. (2024). Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1374466. https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1374466

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

Fu, H., Liang, Y., Zhong, X., Pan, Z. L., Huang, L., Zhang, H. L., Xu, Y., Zhou, W., & Liu, Z. (2020). Codon optimization with deep learning to enhance protein expression. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74091-z

Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*, *11*(4), 1–26. https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427

García, M. D., Chua, S. M. H., Low, Y. S., Lee, Y. T., Agnew-Francis, K., Wang, J. G., Nouwens, A., Lonhienne, T., Williams, C. M., Fraser, J. A., & Guddat, L. W. (2018). Commercial AHAS-inhibiting herbicides are promising drug leads for the treatment of human fungal pathogenic infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(41), E9649–E9658. https://doi.org/10.1073/PNAS.1809422115/SUPPL_FILE/PNAS.1809422115.SAPP.PDF

García, M. D., Nouwens, A., Lonhienne, T. G., & Guddat, L. W. (2017). Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(7), E1091–E1100. https://doi.org/10.1073/PNAS.1616142114/SUPPL_FILE/PNAS.201616142SI.PDF

Gedi, V., & Yoon, M. Y. (2012). Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors - A summary of their structure, biological activity and current status. *FEBS Journal*, *279*(6), 946–963. https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2012.08505.X;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Giovagnorio, F., De Vito, A., Madeddu, G., Parisi, S. G., & Geremia, N. (2023). Resistance in Pseudomonas aeruginosa: A Narrative Review of Antibiogram Interpretation and Emerging Treatments. *Antibiotics 2023, Vol. 12, Page 1621*, *12*(11), 1621. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12111621

Grace, A., Sahu, R., Owen, D. R., & Dennis, V. A. (2022). Pseudomonas aeruginosa reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. *Frontiers in Microbiology*, *13*(October), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1023523

Gressel, J. (2011). Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science*, *67*(3), 253–257. https://doi.org/10.1002/PS.2071;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., & Plésiat, P. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(1), 221–228. https://doi.org/10.1128/AAC.01252-13

He, Z., Tan, J. S., Lai, O. M., & Ariff, A. B. (2015). Optimization of conditions for the single step IMAC purification of miraculin from Synsepalum dulcificum. *Food Chemistry*, *181*, 19–24. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.166

Ho, C. S., Wong, C. T. H., Aung, T. T., Lakshminarayanan, R., Mehta, J. S., Rauz, S., McNally, A., Kintses, B., Peacock, S. J., de la Fuente-Nunez, C., Hancock, R. E. W., & Ting, D. S. J. (2024). Antimicrobial resistance: a concise update. *The Lancet. Microbe*, *6*(January), 100947. https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.010

Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, *51*(Figure 1), 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008

Jamwal, V., Palmo, T., & Singh, K. (2024). Understanding the mechanisms of antimicrobial resistance and potential therapeutic approaches against the Gram-negative pathogen Acinetobacter baumannii. *RSC Medicinal Chemistry*, *15*(12), 3925. https://doi.org/10.1039/D4MD00449C

Jurado, I., Sainz, M., & McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 1–37. https://doi.org/10.3390/ijms22063128

Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B., Napolitano, L. M., O'Grady, N. P., Bartlett, J. G., Carratalà, J., El Solh, A. A., Ewig, S., Fey, P. D., File, T. M., Restrepo, M. I., Roberts, J. A., Waterer, G. W., Cruse, P., Knight, S. L., & Brozek, J. L. (2016). Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*, *63*(5), e61–e111. https://doi.org/10.1093/cid/ciw353

Kitagawa, K., Shigemura, K., Yamamichi, F., Osawa, K., Uda, A., Koike, C., Tokimatsu, I., Shirakawa, T., Miyara, T., & Fujisawa, M. (2019). Bacteremia complicating urinary tract infection by Pseudomonas aeruginosa: Mortality risk factors. *International Journal of Urology*, *26*(3), 358–362. https://doi.org/10.1111/iju.13872

Kreisberg, J. F., Ong, N. T., Krishna, A., Joseph, T. L., Wang, J., Ong, C., Ooi, H. A., Sung, J. C., Siew, C. C., Chang, G. C., Biot, F., Cuccui, J., Wren, B. W., Chan, J., Sivalingam, S. P., Zhang, L. H., Verma, C., & Tan, P. (2013). Growth inhibition of pathogenic bacteria by sulfonylurea herbicides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(3), 1513–1517. https://doi.org/10.1128/AAC.02327-12

Lee, H., Rustgi, S., Kumar, N., Burke, I., Yenish, J. P., Gill, K. S., Von Wettstein, D., & Ullrich, S. E. (2011). Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(21), 8909–8913. https://doi.org/10.1073/PNAS.1105612108/SUPPL_FILE/PNAS.201105612SI.PDF

Lee, Y. T., Cui, C. J., Chow, E. W. L., Pue, N., Lonhienne, T., Wang, J. G., Fraser, J. A., & Guddat, L. W. (2013). Sulfonylureas have antifungal activity and are potent inhibitors of Candida albicans acetohydroxyacid synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(1), 210–219. https://doi.org/10.1021/JM301501K/SUPPL_FILE/JM301501K_SI_001.PDF

Liu, Y., Li, Y., & Wang, X. (2016). Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(20), 8633–8649. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7809-9

Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(4), 582–610. https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09

Lonhienne, T., Cheng, Y., García, M. D., Hu, S. H., Low, Y. S., Schenk, G., Williams, C. M., & Guddat, L. W. (2022). Structural basis of resistance to herbicides that target acetohydroxyacid synthase. *Nature Communications*, *13*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-022-31023-x

Lonhienne, T., García, M. D., & Guddat, L. W. (2017). The role of a FAD cofactor in the regulation of acetohydroxyacid synthase by redox signaling molecules. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(12), 5101–5109. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773242

Lonhienne, T., García, M. D., Fraser, J. A., Williams, C. M., & Guddat, L. W. (2017). The 2.0 Å X-ray structure for yeast acetohydroxyacid synthase provides new insights into its cofactor and quaternary structure requirements. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171443

Lonhienne, T., García, M. D., Pierens, G., Mobli, M., Nouwens, A., & Guddat, L. W. (2018). Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(9), E1945–E1954. https://doi.org/10.1073/pnas.1714392115

Lonhienne, T., Low, Y. S., García, M. D., Croll, T., Gao, Y., Wang, Q., Brillault, L., Williams, C. M., Fraser, J. A., McGeary, R. P., West, N. P., Landsberg, M. J., Rao, Z., Schenk, G., & Guddat, L. W. (2020). Structures of fungal and plant acetohydroxyacid synthases. *Nature*, *586*(7828), 317–321. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2514-3

Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., & Faoro, H. (2022). Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 15779. https://doi.org/10.3390/IJMS232415779

Low, Y. S., García, M. D., Lonhienne, T., Fraser, J. A., Schenk, G., & Guddat, L. W. (2021). Triazolopyrimidine herbicides are potent inhibitors of Aspergillus fumigatus acetohydroxyacid synthase and potential antifungal drug leads. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00349-9

Lyu, J., Chen, H., Bao, J., Liu, S., Chen, Y., Cui, X., Guo, C., Gu, B., & Li, L. (2023). Clinical Distribution and Drug Resistance of Pseudomonas aeruginosa in Guangzhou, China from 2017 to 2021. *Journal of Clinical Medicine*, *12*(3), 1189. https://doi.org/10.3390/JCM12031189/S1

Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S. M., Thompson, D. L., Wilson, L. E., & Fridkin, S. K. (2015). Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections for the Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team * Centers for Disease Control and Prevention (. *N Engl J Med*, *370*(13), 1198–1208. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801.Multistate

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, *10*(1310), 1–14.

Massart, N., Mansour, A., Ross, J. T., Piau, C., Verhoye, J. P., Tattevin, P., & Nesseler, N. (2022). Mortality due to hospital-acquired infection after cardiac surgery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *163*(6), 2131-2140.e3. https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2020.08.094

McCourt, J. A., Pang, S. S., King-Scott, J., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(3), 569–573. https://doi.org/10.1073/PNAS.0508701103/ASSET/6AF65230-FCA7-4109-8922-769265869168/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0030608450004.JPEG

Mehla, J., Malloci, G., Mansbach, R., López, C. A., Tsivkovski, R., Haynes, K., Leus, I. V., Grindstaff, S. B., Cascella, R. H., D'cunha, N., Herndon, L., Hengartner, N. W., Margiotta, E., Atzori, A., Vargiu, A. V., Manrique, P. D., Walker, J. K., Lomovskaya, O., Ruggerone, P., … Zgurskaya, H. I. (2021). Predictive Rules of Efflux Inhibition and Avoidance in Pseudomonas aeruginosa. *MBio*, *12*(1), e02785-20. https://doi.org/10.1128/MBIO.02785-20

Micek, S. T., Kollef, M. H., Torres, A., Chen, C., Rello, J., Chastre, J., Antonelli, M., Welte, T., Clair, B., Ostermann, H., Calbo, E., Wunderink, R., Menichetti, F., Schramm, G., & Menon, V. (2015). Pseudomonas aeruginosa nosocomial pneumonia: Impact of pneumonia classification. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *36*(10), 1190–1197. https://doi.org/10.1017/ice.2015.167

Miller, W. R., & Arias, C. A. (2024). ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, *22*(10), 598–616. https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w

Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2013). Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, *4*(JAN), 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539

Naghavi, M., Emil Vollset, S., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., … Resistance Collaborators, A. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 1–28. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1

National Center for Biotechnology Information. (2024). *Florasulam*. PubChem Compound Summary. U.S. National Library of Medicine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Florasulam

Ouellet, T., Rutledge, R. G., & Miki, B. L. (1992). Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of Brassica napus have divergent patterns of expression. *The Plant Journal*, *2*(3), 321–330. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1992.t01-31-00999.x

Pang, S. S., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2003). Molecular Basis of Sulfonylurea Herbicide Inhibition of Acetohydroxyacid Synthase*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(9), 7639–7644. https://doi.org/10.1074/jbc.M211648200

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, *37*(1), 177–192. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(2), 479–487. https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479-487.2005

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 1–27. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1

Ratjen, F., Brockhaus, F., & Angyalosi, G. (2009). Aminoglycoside therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: A review. *Journal of Cystic Fibrosis*, *8*(6), 361–369. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.08.004

Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections. *Drugs*, *81*(18), 2117–2131. https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*(APR), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172

Rosenthal, V. D., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A. A., AlKhawaja, S. A. A., Leblebicioglu, H., Mehta, Y., Rai, V., Hung, N. V., Kanj, S. S., Salama, M. F., Salgado-Yepez, E., Elahi, N., Morfin Otero, R., Apisarnthanarak, A., De Carvalho, B. M., Ider, B. E., Fisher, D., Buenaflor, M. C. S. G., Petrov, M. M., … Thoa, V. T. H. (2016). International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. *American Journal of Infection Control*, *44*(12), 1495–1504. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.08.007

Scopes, R. K. (1994). Purification: Principles and Practice. In *Protein Purification: Principles and Practice*.

Sendra, E., Fernández, A., Zamorano, L., Oliver, A., Horcajada, J. P., Juan, C., & Gómez, S. (2024). Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of Pseudomonas aeruginosa: a microbiological and clinical perspective. In *Infection* (Vol. 52, Issue 4). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/s15010-024-02313-x

Sigma-Aldrich. (2013). *GenElute ™ Plasmid Miniprep Kit*. 2013–2014. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf

Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *99*(4), 303–310. https://doi.org/10.1263/jbb.99.303

Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, *559*, 1–15. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003

Sutherland, C. A., Verastegui, J. E., & Nicolau, D. P. (2016). In vitro potency of amikacin and comparators against E. coli, K. pneumoniae and P. aeruginosa respiratory and blood isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *15*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12941-016-0155-z

Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, *80*(June), 1–11. https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387

Tetard, A., Zedet, A., Girard, C., Plésiat, P., & Llanes, C. (2019). Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(10). https://doi.org/10.1128/AAC.01081-19/SUPPL_FILE/AAC.01081-19-S0001.PDF

Thaden, J. T., Park, L. P., Maskarinec, S. A., Ruffin, F., Fowler, V. G., & Van Duin, D. (2017). Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality associated with bloodstream infections caused by pseudomonas aeruginosa compared to other bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(6), 1–11. https://doi.org/10.1128/AAC.02671-16

Tharmalingam, N., Sekar Jayanthan, H., Port, J., Cristina, F., Rossatto, P., & Mylonakis, E. (2025). Mefloquine reduces the bacterial membrane fluidity of Acinetobacter baumannii and distorts the bacterial membrane when combined with polymyxin B. *BioRxiv*, 2025.01.15.633232. https://doi.org/10.1101/2025.01.15.633232

Tittmann, K., Golbik, R., Uhlemann, K., Khailova, L., Schneider, G., Patel, M., Jordan, F., Chipman, D. M., Duggleby, R. G., & Hübner, G. (2003). NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry*, *42*(26), 7885–7891. https://doi.org/10.1021/bi034465o

Vidaillac, C., & Chotirmall, S. H. (2021). Pseudomonas aeruginosa in bronchiectasis: infection, inflammation, and therapies. *Expert Review of Respiratory Medicine*, *15*(5), 649–662. https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1906225

Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Margaret, A., Patel, J., Kallen, A. J., & Edwards, J. R. (2019). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With HealthcareAssociated Infections Summary of Data Reported to the. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, *37*(11), 1288–1301. https://doi.org/10.1017/ice.2016.174.Antimicrobial-Resistant

WHO. (2022). Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: an Overview and analysis. In *World Health Organization 2021*. https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303

WHO. (2022). Antimicrobial Resistance. *Sustainable Development Goals Series*, *Part F2781*, 143–147. https://doi.org/10.1007/978-3-031-33851-9_22

WHO. (2024). Bacterial Priority Pathogens List. In *Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*.

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163–175. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521

Wood, S. J., Kuzel, T. M., & Shafikhani, S. H. (2023). Pseudomonas aeruginosa: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*, 1–37. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00013-8

Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(10), 1451–1470. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002

Wun, S. J., Tan, L., Lonhienne, T. G., Low, Y. S., Josh, P., Kuo, A., Smith, M. T., Gao, Y., Pierens, G. K., Guddat, L. W., & West, N. P. (2025). Florasulam Is a Potent Inhibitor of Mycobacterium tuberculosis Acetohydroxyacid Synthase and Possesses In Vivo Antituberculosis Activity. *ACS Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c01028

Yang, B., Fang, D., Lv, Q., Wang, Z., & Liu, Y. (2021). Targeted Therapeutic Strategies in the Battle Against Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Pharmacology*, *12*(May), 1–15. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.673239

Zhao, X., Xu, C., Domagala, J., & Drlica, K. (1997). DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(25), 13991–13996. https://doi.org/10.1073/PNAS.94.25.13991/ASSET/08EC7309-A77D-4196-90FA-B3AA2A901C8A/ASSETS/GRAPHIC/PQ2473328004.JPEG

Zhou, Z., Jin, J., Deng, X., & Jia, Z. (2024). Protein purification via consecutive histidine–polyphosphate interaction. *Protein Science*, *33*(6), 1–9. https://doi.org/10.1002/pro.5021