



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE 5-FLUOROURACILO Y DE UNA MEZCLA DE ÁCIDOS ANACÁRDICOS, OBTENIDA DE UN EXTRACTO DE AMPHIPHYTERYGIUM ADSTRINGENS, COMO POSIBLES INHIBIDORES DEL QUORUM SENSING EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTAN

XOCHITL ABRIL REBOLLAR RUÍZ

DIANA WENDY RANGEL SILVA

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

VOCAL: M. EN C. JOSÉ LANDEROS VALDEPEÑA

SECRETARIO: DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS

1er. SUPLENTE: DRA. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ

2° SUPLENTE: JAVIER FERNÁNDEZ TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

ASESOR DEL TEMA:

DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS

SUSTENTANTES:

XOCHITL ABRIL REBOLLAR RUÍZ

DIANA WENDY RANGEL SILVA

ÍNDICE	
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Generalidades.....	10
Patogenia y factores de virulencia	12
Principales factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	13
Formación de biopelícula	18
Quorum sensing	20
Importancia clínica.....	25
Inhibidores de Quorum sensing.....	29
5-Fluorouracilo como inhibidor del Quorum sensing	31
Ácidos anacárdicos como inhibidores del Quorum sensing.	34
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40
Cepas	41
Mezcla de Ácidos anacárdicos de un extracto de <i>Amphipterygium adstringens</i>	42
Medio de cultivo	42
Ensayo de CMI 50%.....	42
Ensayo CMI de antibióticos.....	43
Condiciones del cultivo	43
Determinación de elastasa.....	44
Determinación de la fenazina piocianina	45
Determinación de Ramnolípidos	45
Determinación del autoinductor N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona mediante el bioensayo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	46
Análisis estadístico	49
RESULTADOS	50

Ensayo para determinar la sensibilidad frente a microbianos evaluando la CMI ₅₀ de antibióticos.	50
Determinación de los factores de virulencia dependientes de Quorum sensing en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepas de referencia y cepas aisladas de muestras clínicas).	52
Evaluación del efecto sobre el crecimiento de las cepas de referencia y de las cepas aisladas de muestras clínicas con la adición de los inhibidores del Quorum sensing.	53
Evaluación de la actividad elastolítica del sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing.	56
Evaluación de la producción de la fenazina piocianina en el sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing.	59
Evaluación de la producción de ramnolípidos en el sobrenadante después de las 24 h de la adición de los inhibidores de Quorum sensing.	61
Evaluación del efecto sobre el crecimiento de las cepas de referencia y aisladas de muestras clínicas con la adición de altas concentraciones de los inhibidores del Quorum sensing.	63
Evaluación de la actividad elastolítica del sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing a altas concentraciones.	65
Evaluación de la producción de la fenazina piocianina en el sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing a altas concentraciones.	67
Evaluación de la producción de ramnolípidos en el sobrenadante después de las 24 h de la adición de los inhibidores de Quorum sensing a altas concentraciones.	69
DISCUSION DE RESULTADOS	73
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS.....	82
ANEXO I Actividad Remanente de los factores de virulencia en cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
ANEXO II Determinación de factores de virulencia en cepas de referencia y cepas aisladas de muestras clínicas	95
REFERENCIAS.....	117

ABREVIATURAS

2C7-3OH-4Q	2-hepta-3-hidroxi-4 quinolona
3OC12-HSL	3-oxo-dodecilhomoserin lactona
5FU	5 fluorouracilo
AHL	acil homoserin lactona
ANA	mezcla de ácidos anacárdicos
C4-HSL	butirilhomoserin lactona
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute (estándares para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana)
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dTMP	desoxitimidin monofosfato
dUMP	desoxi uridin monofosfato
FQ	fibrosis quística
EMB	medio selectivo utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos
g	gramos
G (-)	Gram negativos
h	horas
HSL	homoserin lactona
LB	caldo Luria Bertani
µg	microgramos
CMI	concentración mínima inhibitoria
min.	minutos
mL	mililitros
µL	microlitros
µM	micromolar
nm	nanómetros

D.O.	densidad óptica
ON	overnight (cultivo fresco que ha crecido entre la noche y la mañana)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PM	peso molecular
PQS	señal de quinolona de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QS	Quorum sensing
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SN	sobrenadante
TMS	trimetoprim con sulfametoxazol
UMP	uridin monofosfato
UTI	unidad de terapia intensiva
Wt	wild type (cepa silvestre)

Simbología de Gráficas

FU10: 5-FU 10 μ M	ANA 10: ANA 10 μ g/mL	D: DMSO
FU25: 5-FU 25 μ M	ANA 200: ANA 200 μ g/mL	C: Control
FU50: 5-FU 50 μ M	ANA 400: ANA 400 μ g/mL	

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales forman parte de las principales causas de morbilidad-mortalidad dentro de un hospital, además contribuyen a alargar la estancia hospitalaria y con ello a aumentar los gastos dentro del sistema de salud; existen diversos agentes etiológicos, *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los tres principales patógenos causantes de las infecciones nosocomiales.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa con una diversidad metabólica que le permite el crecimiento en distintos hábitats desde suelos hasta la superficie de un jabón, esta capacidad contribuye a la alta tasa de infección producida dentro de los hospitales. Es una bacteria que cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia que le ayudan a colonizar y causar infecciones agudas y crónicas en los pacientes.

La bacteria puede crecer plantónicamente en medios líquidos o en biopelícula cuando se adhiere a una superficie, la formación de biopelícula y la expresión de algunos de los factores de virulencia están controlados por sistemas de “quorum sensing” por medio de los cuales sensa la cantidad de bacterias presentes en el entorno, esto se logra, debido a la producción de un autoinductor, cuando la concentración del autoinductor llega a un umbral la población bacteriana produce simultáneamente los factores de virulencia y de esta forma garantiza el establecimiento exitoso de la infección.

Debido a que el quorum sensing se encarga de coordinar la expresión de los factores de virulencia, diversos estudios se han centrado en la búsqueda de inhibidores del quorum sensing como terapias alternativas para atenuar la virulencia y así contrarrestar la infección causada por la bacteria.

En el presente trabajo se evaluaron dos posibles inhibidores de quorum sensing, el 5-Fluorouracilo y una mezcla de ácidos anacárdicos obtenida de un extracto de *Amphiterygium adstringens* pues han demostrado disminuir la

expresión de factores de virulencia en cepas de referencia tales como PA14, la evaluación se realizó en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas obtenidas de pacientes pediátricos y en las dos principales cepas de referencia PAO1 y PA14 como controles positivos.

Nuestros resultados muestran que las cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes pediátricos presentan una respuesta variable frente a la adición de los inhibidores. Se eligieron tres cepas aisladas de muestras clínicas como representativas de este grupo las cuales son cepa 51U, cepa 17 y cepa 188; ya que en estas cepas se observan comportamientos variados entre lo esperado; para la cepa 51U los inhibidores funcionaron como se esperaba, disminuyendo los niveles en la producción de elastasa y piocianina, en la cepa 17 los factores de virulencia (elastasa y piocianina) no presentaron ningún efecto cuando se adicionaron los inhibidores, en la cepa 188 se presenta una activación estadísticamente significativa en los factores de virulencia cuantificados (elastasa y piocianina), en contraste en las cepas de referencia se presenta inhibición en los factores de virulencia, indicando una gran diferencia entre las cepas de referencia y las aisladas de muestras clínicas y así mismo la variabilidad presentada entre las cepas aisladas.

INTRODUCCIÓN

En México la prevalencia de las infecciones nosocomiales varía entre el 2% y el 16%, sin embargo, en las unidades de cuidados intensivos la situación es más alarmante ya que la prevalencia es del 23% (SSA, 2011). Entre las principales infecciones nosocomiales se encuentra la neumonía con un 40%, seguida de las infecciones de vías urinarias con un 21% y las infecciones causadas por heridas quirúrgicas con un 13%. El principal agente etiológico causante de las infecciones nosocomiales es *Enterobacter spp.* Con un 38%, mientras que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* ocupan el segundo lugar con un 13% (SSA., 2011)., El estudio de la bacteria *P. aeruginosa* ha tenido un auge durante los últimos años, debido a la alta prevalencia de las infecciones nosocomiales que causa y por ser uno de los principales agentes etiológicos. Asimismo las complicaciones más importantes, en pacientes con fibrosis quística (FQ), se relacionan con la infección bacteriana y la inflamación crónica provocada por *P. aeruginosa* que es el microorganismo colonizador prevalente de la vías respiratorias de dichos pacientes, apareciendo en el 50% de los menores de 18 años y en más del 80% de los de mayor edad (Canton *et al.*, 2005).

Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes generalmente presentan multiresistencia a los diversos antibióticos utilizados actualmente en la terapia, por ello la búsqueda de alternativas terapéuticas que ayuden a su erradicación constituye un gran desafío para la mejora de pacientes con FQ y en el control de las infecciones nosocomiales las cuales son un problema relevante de salud pública con gran trascendencia económica y social en el país. (Secretaría, 2011)

ANTECEDENTES

Pseudomonas aeruginosa

Generalidades

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa que pertenece a la rama de las γ proteobacterias (Figura 1). Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligene* (Soberón, 2012).

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, debido a que posee un metabolismo diverso, es decir, es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, dicha capacidad le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes, y con ello, vivir en hábitats variables tales como suelo, ambientes acuáticos (agua dulce y salada), plantas, etc., en ambientes hospitalarios se le puede encontrar frecuentemente en las unidades de cuidados intensivos específicamente en lavabos, respiradores, humidificadores, además de que se ha aislado de ambientes tan inhóspitos como el combustible de avión y el jabón (Soberón, 2012).

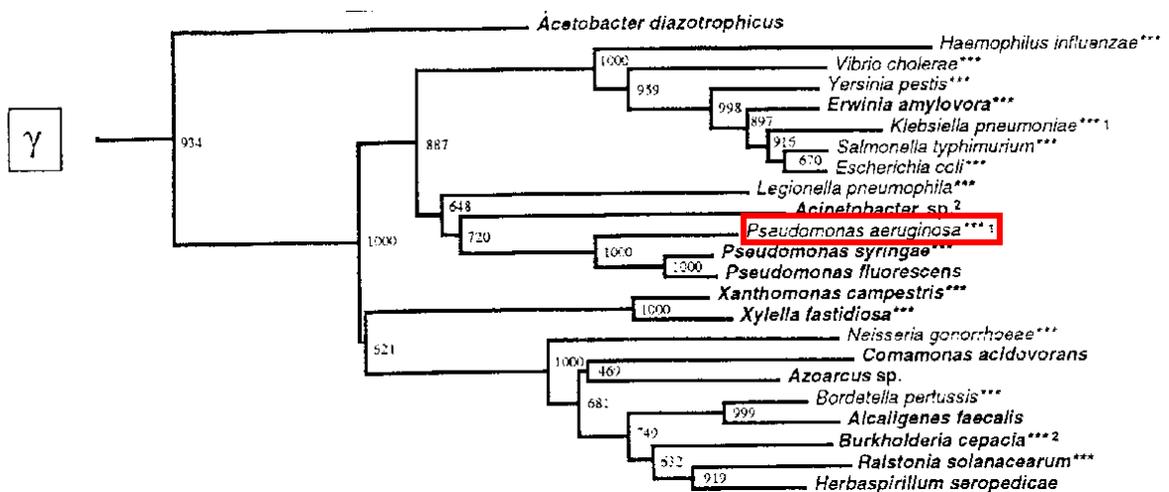


Figura 1. Rama γ de las proteobacterias a la cual pertenece *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado y editado de (Soberón 2012).

P. aeruginosa se identifica fácilmente en función del aspecto de la colonia, la pigmentación (por crecimiento en agar cetrimida) y algunas pruebas bioquímicas sencillas como: producción de oxidasa y catalasa, oxidación de la glucosa pero no fermentación de la misma, presencia de arginina-dehidrolasa y crecimiento a 37°C. Son bacilos rectos o ligeramente curvados de 0.5 -1 μm por 1.5-4 μm que no producen esporas y poseen un flagelo polar único (Todar, 2008-2012) (Figura 2).



Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo ligeramente curvado con flagelo polar único

Para su identificación se utilizan diferentes medios de cultivo entre los cuales tenemos: agar peptona con o sin sangre, agar MaConkey y EMB (agar eosina-azul de metileno) también existen medios selectivos como agar cetrimida (Raúl 2007).

Además de las pruebas bioquímicas antes mencionadas, *P. aeruginosa* puede identificarse por:

Olor: produce olor a uvas o nixtamal debido a la producción de trimetilaminas (Raúl, 2007).

Pigmentación: produce piocianina que es de color azul, pioverdina que es de color amarillo-verdoso, algunas cepas pueden producir un pigmento rojo denominado piorrubina o uno café denominado piomelanina, sin embargo, otras cepas no tienen la capacidad de producir pigmentos (Raúl, 2007) (Figura 3).

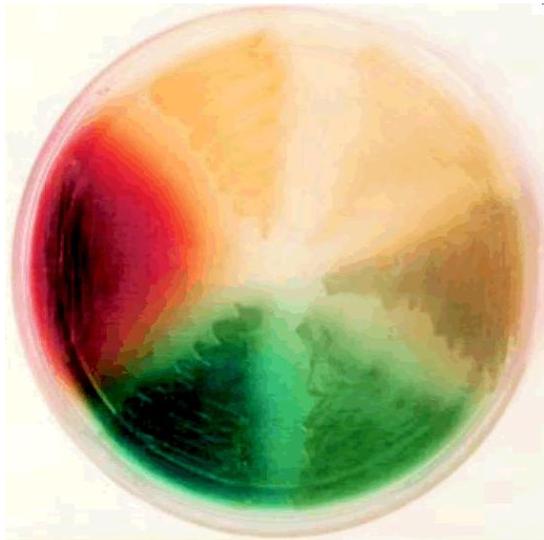


Figura 3. Cepas de *P. aeruginosa* con distintas pigmentaciones piorrubina, pioverdina y piomelanina además de cepas que no muestran pigmentación. Crecimiento en Agar Mueller Hinton, 48 h de incubación/ 28°C. Tomada de Merino (2007).

Morfología colonial: pueden ser lisas, rugosas, mucoides, en agar sangre algunas cepas muestran β hemólisis (Raúl, 2007).

Patogenia y factores de virulencia

P. aeruginosa es un patógeno oportunista ubicuo por lo que cualquier condición que abata las barreras y defensas del hospedero propiciará con alta probabilidad la infección causada por la bacteria. *P. aeruginosa* puede causar

infecciones agudas y crónicas y para poder establecerlas requiere que la colonización sea efectiva (Rocha-Gracia, 2005).

Esto puede realizarse de distintas formas ya sea por alteración o ruptura de las mucosas debida a una cirugía, quemadura, trauma, etc. o por una modificación de la flora normal debido al uso excesivo de antibióticos, en sujetos inmunocomprometidos y pacientes con fibrosis quística es fácil comenzar con la colonización y establecer la infección (Rocha-Gracia 2005).

Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa produce factores de virulencia durante la etapa de colonización que le facilitan el anclaje a los tejidos entre los cuales tenemos Pili tipo IV y fimbrias; también cuenta con endotoxinas las cuales son lipopolisacáridos con la capacidad de causar necrosis en los tejidos, hemolisinas, fosfolipasas que contribuyen con la evasión del sistema inmune, (Rocha-Gracia, 2005) exotoxinas con la fracción A y B , exotoxina S que inhibe la síntesis de las proteínas por inhibición del factor 2 de elongación (Raúl, 2007).

Durante las infecciones agudas los principales factores de virulencia que contribuyen son las proteasas; *P. aeruginosa* produce distintas proteasas entre las que encontramos elastasas LasA y LasB las cuales se encargan de destruir las fibras elásticas de las paredes vasculares, degradan complemento, inactivan IgG e IgA, rompen proteínas séricas, inhiben la acción de los neutrófilos, inactivan CD4 e interleucina 2, inhiben células NK (Natural Killer) y degradan la transferrina, la bacteria también cuenta con proteasa alcalina que destruye proteínas como la interleucina 2 y las moléculas de adhesión leucocitaria (Raúl, 2007).

La lectina PA-I inhibe el crecimiento de las células epiteliales respiratorias, la fosfolipasa C degrada la fosforilcolina que en un tensioactivo pulmonar e interviene principalmente en infecciones pulmonares (Raúl, 2007).

La pioverdina es un sideróforo que ayuda a la adquisición de hierro ; la piocianina reduce al hierro haciéndolo más soluble además de contribuir con la generación de radicales libres que provocan daño oxidante en los tejidos infectados (Raúl, 2007) (Figura 3).

Los ramnolípidos son glucolípidos biosurfactantes cuya estructura es similar a la de los detergentes, son secretados al medio extracelular, afectan a la composición de la membrana, la motilidad celular y la formación de la biopelícula (Rocha-Gracia, 2005).

Están compuestos por mono o di-ramnosa que está a su vez unida a tres ácidos grasos; entre los ramnolípidos más abundantes tenemos el L-ramnosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (mono-ramnosa) y L-ramnosil-L-ramnosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (di-ramnosa) (Rocha-Gracia, 2005).

La presencia de ramnolípidos favorece el swarming debido a que disminuye la tensión superficial, lo cual brinda una condición idónea para una colonización eficiente, estos glucolípidos tienen otras funciones, por ejemplo, alteran la polaridad de la superficie, muestran actividad antimicrobiana contra otras bacterias, tienen la capacidad de desintegrar biopelículas como la de *Bordetella bronchiseptica*, inhiben la fagocitosis mediada por macrófagos y actúan como hemolisinas estables (Wilhelm *et al.*, 2007).

Se propone además que los ramnolípidos solubilizan a los fosfolípidos del surfactante pulmonar haciéndolo más accesible para la fosfolipasa C que cataliza su ruptura, los ramnolípidos pueden inhibir el transporte mucociliar y la función ciliar del epitelio respiratorio (Rocha-Gracia 2005).

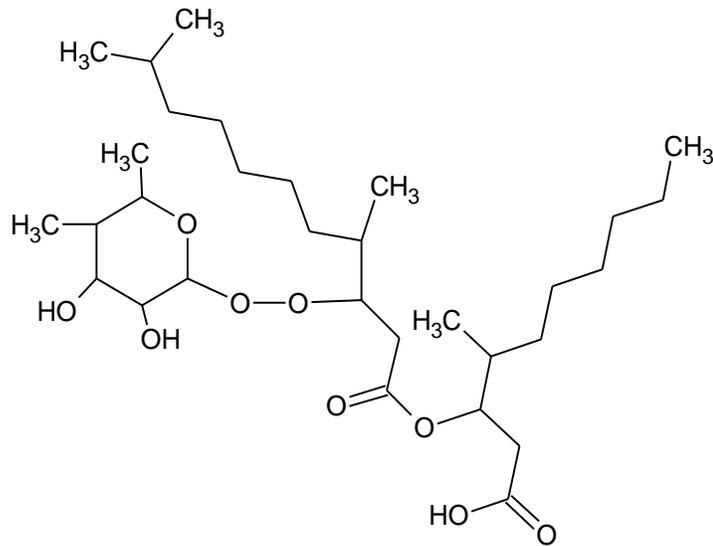


Figura 4. Estructura de Ramnolípido. L-ramnosil-3-hidrosidecanoil-3-hidrosidecanoato (mono-ramnosa).

El alginato es un exopolisacárido que le brinda la característica mucoide a las cepas de *P. aeruginosa*, las cuales son fáciles de aislar en pacientes con fibrosis quística y son el principal factor de morbilidad-mortalidad en estos (Soberón 2012).

El alginato es un copolímero lineal con enlaces β -1,4 de D-manuronato y su epímero C-5, L-glucoronato (Figura 5) (Soberón, 2012).

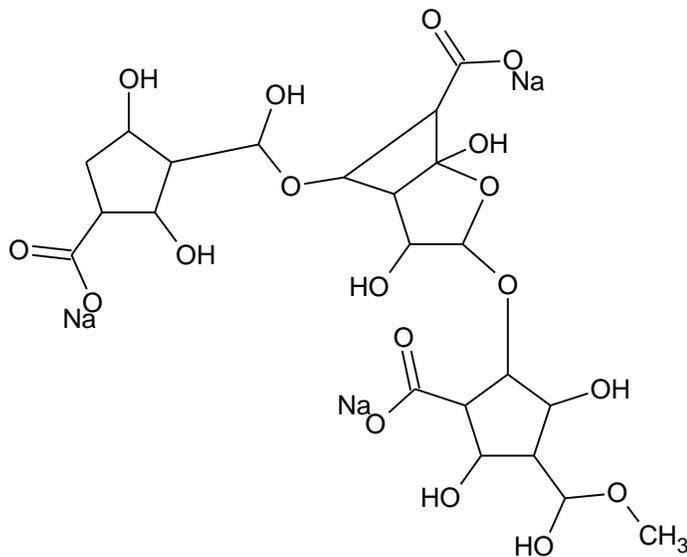


Figura 5. Estructura del alginato con cadenas de manuronato y glucoronato. Tomado de Soberón *et al.* (2012).

La producción de alginato le brinda a la bacteria un mecanismo de protección en contra de las defensas del hospedero, así mismo, contribuye a la formación de la biopelícula, la cual, es una forma de crecimiento de la bacteria; el alginato es un componente extracelular muy importante ya que disminuye la quimioxtasis de linfocitos polimorfonucleares, inhibe la activación del complemento y disminuye la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos, además la sobreproducción de alginato protege contra ciertos antibióticos cuando la célula crece en biopelícula (Rocha-Gracia, 2005).

Existen estudios que muestran la importancia de la producción del alginato, (Leid *et al.*, 2005) estos demuestran que la producción de alginato les brinda ventaja a cepas de *P. aeruginosa* ya que se ha observado que mutantes deficientes de este mueren por fagocitosis en presencia de interferón γ , además de que la adición de alginato exógeno le restaura la resistencia frente a leucocitos.

A continuación se muestra un esquema que resume las fases de la infección causada por *P. aeruginosa* (figura 6).

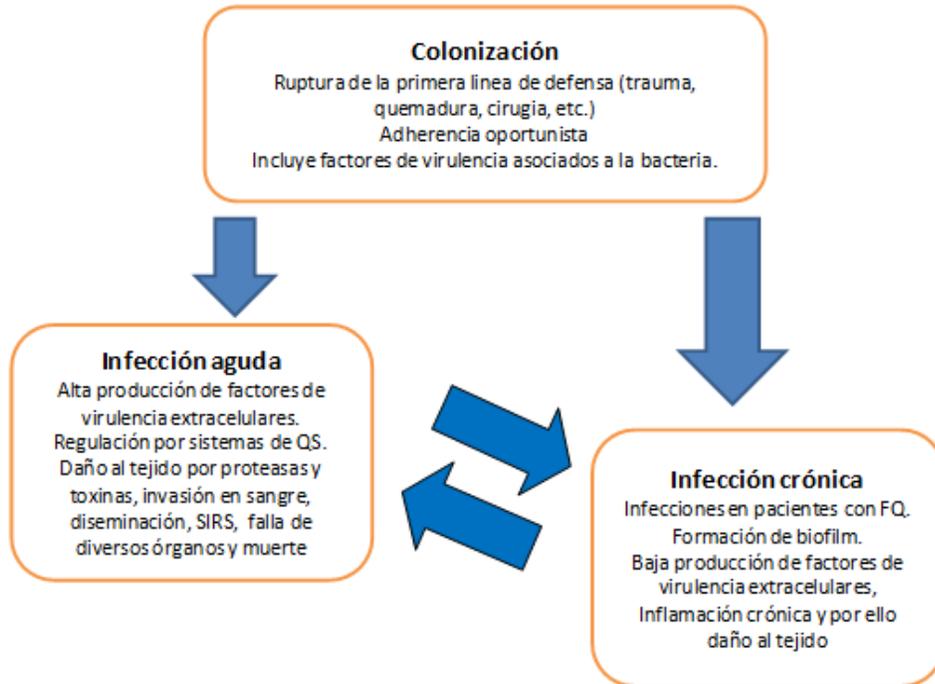


Figura 6. Fases de la infección causada por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y sus principales características tomada y editada de Strateva *et al.* (2011).

Adicionalmente a los productos secretados la bacteria utiliza distintas formas de motilidad: el twitching (desplazamiento intermitente y desorganizado que confiere a las colonias apariencia de abanico) que es mediado por el Pili tipo IV, el swarming (se manifiesta por la presencia de una película fina de crecimiento expansivo a partir de las colonias aisladas con el cual la bacteria se mueve organizadamente en una superficie fluida) y swimming (movimiento desorganizado en medio fluido); la motilidad ayuda a la diseminación de la bacteria a otros órganos y de esta forma establecer una infección efectiva (Tabla 1).

Función patogénica	Factores asociados a la bacteria	Factores extracelulares
Adhesión	Pili Tipo IV Lectinas Glicocálix Alginato (biofilm)	
Facilita la adhesión		Neuroaminidasa
Motilidad/Quemosta /Quimiotaxis	agelo (swimming) li retractil (twitching)	
Invasión		Elastasas (LasB y LasA) Proteasa alcalina Hemolisinas (fosfolipasa y ramnolipidos) Citotoxina Piocianina sideróforos
Toxinogenesis	Lipopolisacárido Lectinas LecA y LecB	Exotoxina A Citotoxinas efectoras Tipo III ExoS, ExoU, ExoT, ExoY Enterotoxina
Diseminación		
Propiedades antifagocíticas	Glicocálix lipopolisacárido	
Defensa contra complemento	Glicocálix lipopolisacárido	Proteasas
Defensa protectora frente al sistema inmune	Glicocálix	Proteasas

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* tomada y editada de Strateva *et al.* (2011).

Formación de biopelícula

Existen dos maneras en que las bacterias pueden crecer: a) suspendidas en medios líquidos y b) en biopelículas cuando las células se adhieren a una superficie y crecen sobre ella. La formación de la biopelícula se realiza en distintas etapas, inicialmente la bacteria debe adherirse a una superficie, después de adherirse las bacterias realizan twitching y como resultado de esta motilidad las

células se diferencian formando microcolonias que son cubiertas por una matriz extracelular; las microcolonias posteriormente se diferencian para formar la biopelícula (Figura 7); dentro de la biopelícula se forman canales de agua, de nutrientes, de desechos y de oxígeno, a su vez existen gradientes de oxígeno, de pH y de nutrientes, estos gradientes propician la variabilidad existente entre las células de la biopelícula, por ejemplo, las bacterias que se encuentran en el centro de la biopelícula tienen un crecimiento reducido y un metabolismo menos activo en comparación a las que se encuentran en la periferia (Parsek *et al.*, 1999).

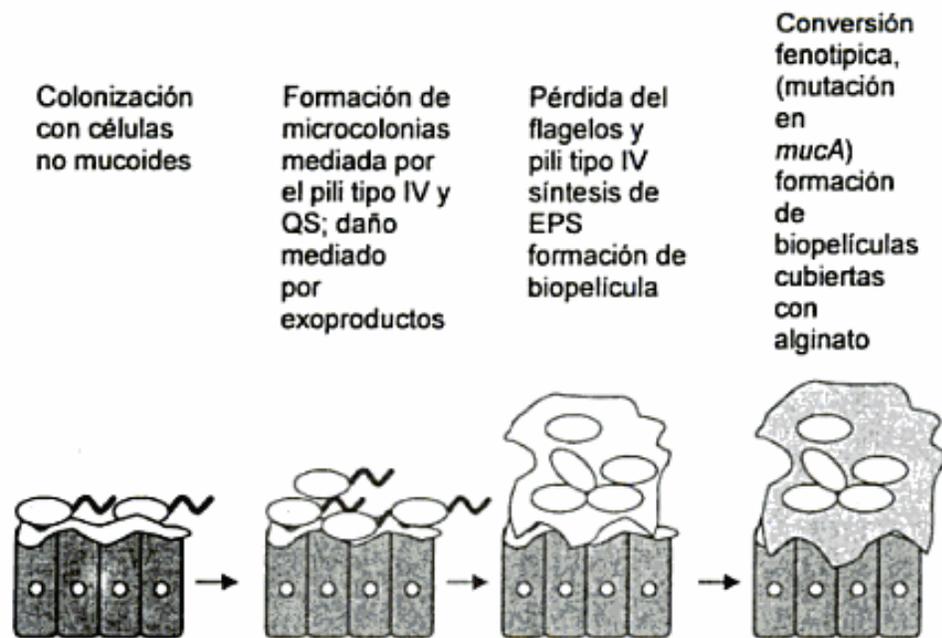


Figura 7. Etapas de la formación de la biopelícula, inicia por la colonización, formación de microcolonias, formación de la biopelícula y estructura de la biopelícula con exopolisacáridos. Tomada de Raúl *et al.* (2007).

La formación de la biopelícula le brinda a la bacteria resistencia contra antibióticos, penetración limitada de leucocitos y sus productos antimicrobianos,

inactivación o supresión del proceso leucocitario, disminución de fagocitosis y cambios genéticos que permiten la resistencia al sistema inmune. Debido a la cantidad de mecanismos de resistencia que le brinda a la bacteria el crecimiento en biopelícula las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de mecanismos o moléculas que degraden la biopelícula y/o eviten su formación (Raúl, 2007).

Los mecanismos de Quorum sensing son los que se encargan de coordinar la producción y expresión de múltiples factores de virulencia y así mismo la formación de biopelículas.

Quorum sensing

Un punto crucial de las infecciones bacterianas es la necesidad de invadir al hospedero para poder establecer la infección, para ello se requiere coordinar la expresión de los factores de virulencia en conjunto con las bacterias que están a su alrededor. El Quorum sensing o respuesta sensora de Quórum es un sistema que se ha descrito en bacterias Gram positivas y Gram negativas que les permite establecer comunicación mediante señales químicas entre células, brindándoles una ventaja para su supervivencia en el hospedero ya que mejora el acceso a nutrientes complejos, brinda defensa colectiva contra otros microorganismos y contra mecanismos de defensa del hospedero (Williams *et al.*, 2009).

Esta comunicación dependerá de la habilidad de la bacteria para detectar a otras de su especie y poder responder a ello. La comunicación se establece mediante moléculas difusibles que se denominan autoinductores, dichas moléculas son producidas basalmente por las bacterias y acumuladas durante el crecimiento, se requiere una densidad bacteriana específica que se denomina “quórum” la cual producirá la concentración óptima de autoinductor, suficiente para iniciar un proceso de señalización que culminará en la reprogramación

transcripcional que consiste principalmente en la activación y en menor medida en la represión específica de genes (Williams *et al.*, 2009).

Los sistemas de Quorum sensing en bacterias Gram negativas requieren tres elementos:

- 1) El **autoinductor**: son moléculas pequeñas difusibles que actúan como señal bacteriana (figura 8),
- 2) La **proteína sintasa**: encargada de la síntesis del autoinductor y,
- 3) El **sensor-efector** que es un regulador transcripcional (Juhás *et al.*, 2005).

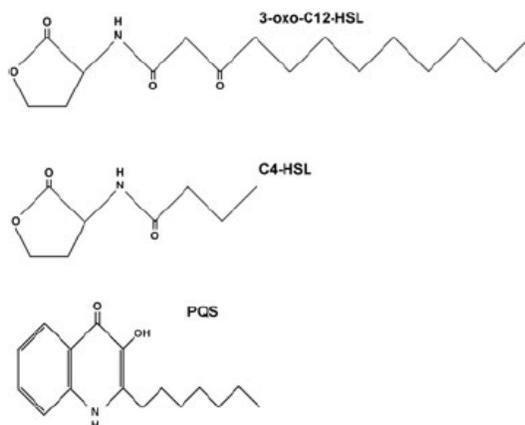


Figura 8. Estructura de los autoinductores de *Pseudomonas aeruginosa* tomada de Juhás *et al.* (2005).

Los sistemas de Quorum sensing en *P. aeruginosa* han sido estudiados extensivamente ya que son esenciales para la expresión de múltiples factores de virulencia, además de ser parte de una estrategia altamente efectiva para establecer la infección (Juhás *et al.*, 2005).

P. aeruginosa posee tres sistemas de Quorum sensing, el primero se denomina sistema *las* y consta de un activador transcripcional LasR, la AHL sintasa LasI la cual dirige la síntesis del autoinductor (AI) la N-3-oxo-dodecanoil-

homoserin lactona (3OC12-HSL). Cuando se alcanzan altas densidades celulares el AI se enlaza a su activador transcripcional LasR, el cual se dimeriza y se une a diversos promotores entre los que se encuentran los que codifican a la sintasa LasI y los de múltiples factores de virulencia como elastasa, proteasa alcalina, exotoxina A, etc. además del promotor de los genes que codifican al segundo sistema de comunicación por HSL, controlando de esta forma la expresión de estos. El sistema *rhl* consta del activador transcripcional RhIR, la sintasa de AHL RhII y el AI N-butanoil-homoserin lactona (C4-HSL), este sistema está controlado por el sistema *las* a niveles transcripcionales y postranscripcionales y controla a su vez la producción de ramnolípidos (Juhás *et al.*, 2005).

La señal de quinolona en *P. aeruginosa* (PQS *P. aeruginosa* quinolone signal) es el tercer sistema de sensado de Quórum y está constituido por: PqsR (MvfR) activador transcripcional, la sintasa PqsH y el AI 2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona (2C7-3OH-4Q) como señal autoinductora. Para la secreción de los AI se conocen diversos mecanismos, C4-HSL es permeable en la bacteria, mientras que 3OC12-HSL es secretado vía el transportador MexAB-OprM (que se encarga además de la expulsión de antibióticos) y por último la 2-hidroxi-3 heptil-4 quinolona se expulsa mediante vesículas (Figura 9) (Juhás *et al.*, 2005).

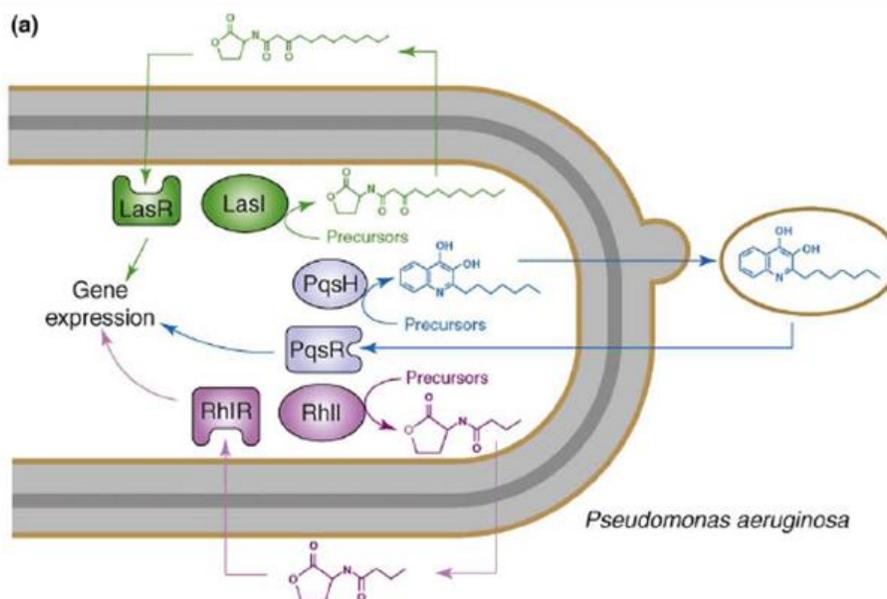


Figura 9. Sistemas de Quorum sensing LasR/Las I, RhIR/RhII y PQS. Tomada y editada de Schertzer *et al.* (2009).

La regulación de estos sistemas se da mediante jerarquías de tal forma que LasR-3OC12HSL regula positivamente la transcripción de *rhIR* y *rhII*; el sistema PQS agrega complejidad a la regulación ya que regula a los sistemas *las* (positivamente) y *rhl* (negativamente), a su vez ambos sistemas controlan la síntesis de PQS ya que su producción depende de la proporción de 3OC12-HSL y 4C-HSL dando un balance entre ambos sistemas (Williams *et al.*, 2009) (Figura 10).

El Quorum sensing regula la producción de diversos factores de virulencia, promueve la maduración de la biopelícula, regula la expresión de bombas que expulsan antibióticos, entre otras funciones, por lo que desempeña un papel importante en la patogénesis de *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 2009).

Los sistemas *las* y *rhl* regulan la producción de múltiples factores de virulencia incluyendo elastasa, proteasa alcalina, exotoxina A, exoenzima S,

neuroaminidasa, hemolisina, ramnolípidos, piocianina, lectinas, catalasa y superóxido dismutasa (Juhás *et al.*, 2005).

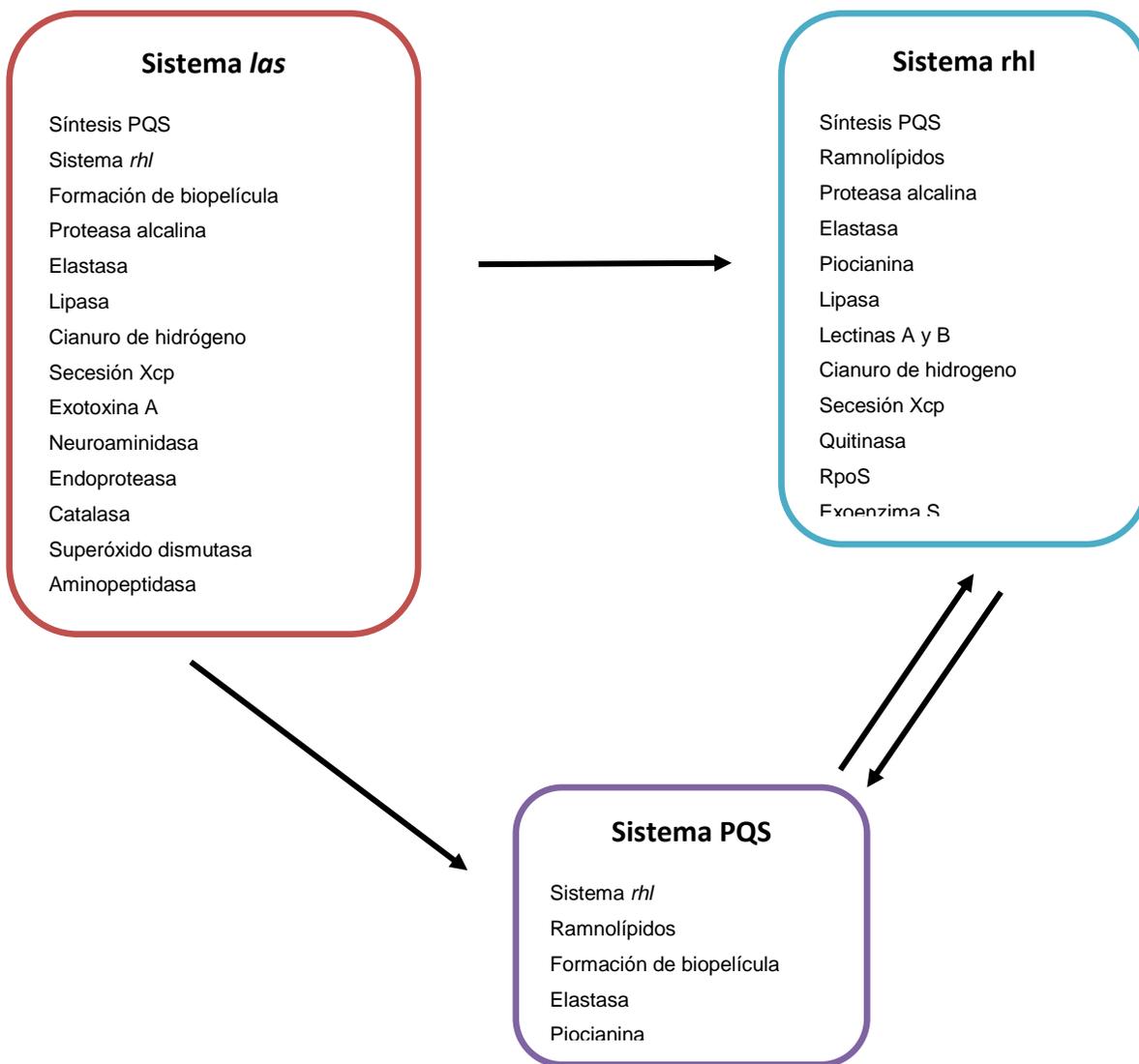


Figura 10. Funciones controladas por el circuito de *Quorum sensing* en *P. aeruginosa*
Tomada y editada de (Strateva 2011).

Importancia clínica

Las infecciones nosocomiales se asocian con un alto índice de mortalidad, son un problema frecuente en las unidades de cuidados intensivos, ya que incrementan los costos de atención y afectan la calidad de vida del paciente durante su estancia hospitalaria (Murillo-Llanes *et al.*, 2009).

Las principales bacterias asociadas a infecciones nosocomiales son bacterias G(-), enterobacterias y bacilos no fermentativos (Murillo-Llanes *et al.*, 2009).

P. aeruginosa es uno de los principales microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales cuya importancia radica en los mecanismos que utiliza para crear resistencia contra los antimicrobianos, dejando así, una limitada cantidad de terapias efectivas para su erradicación y aumentando el índice de mortalidad en los pacientes que adquieren esta infección (Murillo-Llanes *et al.*, 2009).

Existen diversos factores de riesgo que contribuyen a la infección causada por *P. aeruginosa* entre los cuales se encuentran: Edad (siendo más vulnerables infantes y personas de la tercera edad), Patologías concomitantes o de base como enfermedad pulmonar crónica, fibrosis quística, inmunosupresión, cirugía reciente uso de antibióticos, procedimientos invasivos, ventilación mecánica, estancia prolongada e ingreso a la unidad de terapia intensiva (UTI). La mortalidad que se asocia con ésta infección va desde un 30% hasta un 75% y se da principalmente en pacientes que tienen ventilación asistida, la alta mortalidad se debe principalmente a cepas multirresistentes muy difíciles de tratar (Murillo-Llanes *et al.*, 2009).

Un microorganismo multirresistente se define como “no susceptible a más de un agente en 3 o más categorías de antimicrobianos”, o bien, que es resistente a 3 o más clases de antimicrobianos. Existen diversos factores que contribuyen a la aparición y diseminación de la resistencia a antimicrobianos dentro de los cuales se encuentran: uso inapropiado de antibióticos, estancia hospitalaria prolongada, previa terapia con antimicrobianos y severidad de la enfermedad, además de aquellos que son intrínsecos de la bacteria (Magiorakos, 2012).

Con frecuencia las cepas clínicas de *P. aeruginosa* son multirresistentes. Los principales mecanismos de resistencia con los que cuenta son: hiperproducción de β -lactamasas, pérdida de una porina específica OprD (que facilita la recaptura de aminoácidos básicos y el antibiótico Imipenem), mutación en la girasa, enzimas modificadoras de aminoglucósidos mediadas por plásmidos, además de la incorporación de material genético de otras bacterias (Salinas, 2010).

Los principales antibióticos usados en la clínica para el tratamiento de la infección causada por *P. aeruginosa* son el meropenem, piperacilina y tazobactam, los cuales actúan sobre la pared celular de la bacteria, en el caso del tazobactam es además un inhibidor de las β -galactosidasas (Tabla 2).

Existen otros antibióticos a los que la bacteria ya muestra resistencia, por ejemplo en un estudio realizado por Murillo-Llanes y cols. en 2009 se encontró que como el trimetoprim con sulfametoxazol (TMS) posee el porcentaje más alto de resistencia (97%) seguido por cefotaxima (90%) y el antibiótico con menor resistencia es la Piperacilina/tazobactam con un 20%, sin embargo en este estudio también se demostró que la resistencia de antibióticos es diferente según el lugar donde se haya aislado la cepa y varía según el servicio siendo más elevada en la UTI (Figura 11).

Categoría antimicrobiana	Agente antimicrobiano
Aminoglucósidos	Gentamicina Tobramicina Amikacina Netilmidin
Carbapenems antipseudomonales	Imipenem Meropenem Doripenem
Cefalosporinas antipseudomonales	Ceftazidime Cefepime
Fluoroquinolonas antipseudomonales	Ciprofloxacino Levofloxacino
Penicilinas antipseudomonales Inhibidores de β-lactamasa	Acido clavulanico/ticarcilina Piperacilina/tazobactam
Monobactams	Aztreonam
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Polimixinas	Colistina Polimixina B

Tabla 2. Categorías antimicrobianas y agentes antimicrobianos usados para el tratamiento de *P. aeruginosa*, tomada de Murillo-Llanes *et al.* (2009).

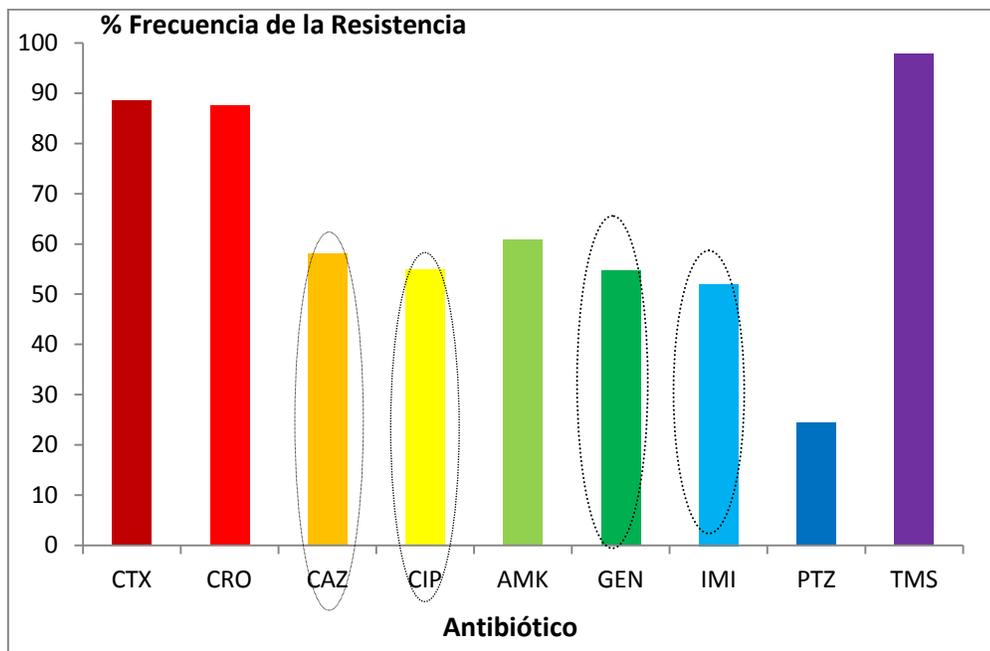


Figura 11. Frecuencia de la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* en muestra provenientes de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI); CTX: cefotaxina, CRO ceftriaxona, CAZ ceftazidima, CIP ciprofloxacina, GEN gentamicina, AMK ampicilina, IMI imipenem, PTZ piperacilina/tazobactam, TMS trimetoprim con sulfametoxazol. Tomado de Murillo-Llanes *et al.* (2009).

Debido a la multirresistencia que tiene *P. aeruginosa* frente a la terapia es necesario la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la infección (Murillo-Llanes *et al.*, 2009).

La generación de resistencia se debe a que el agente actúa directamente en los procesos vitales de la bacteria ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas afectando su viabilidad, la resistencia se presenta debido a la presión selectiva a la cual es sometida la bacteria cuando su viabilidad se compromete, por ello es necesario que el crecimiento bacteriano no se vea afectado para evitar la generación futura de la resistencia (Rasmussen *et al.*, 2006).

Los inhibidores de QS actúan específicamente atenuando la virulencia pero sin afectar el crecimiento, lo que postula que se reduce al mínimo el desarrollo de resistencia de la bacteria contra estos agentes (Rasmussen *et al.*, 2006).

Inhibidores de Quorum sensing

Actualmente la búsqueda de nuevas terapias que ayuden a la eliminación de la bacteria se centra en: terapia con bacteriófagos, inhibidores de la virulencia, inhibidores de la detección del Quorum sensing, anticuerpos contra sistemas de secreción de toxinas, inhibidores de la resistencia a antibióticos e inhibidores de la adquisición del hierro. El Quorum sensing ha sido propuesto como un blanco para el control de la infección causada por *P. aeruginosa* atenuando la producción de los factores de virulencia, (Hentzer *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2006; Lesic *et al.*, 2007).

Interferir con la transmisión de la señal autoinductora mediante un antagonista que compita con el AI para que se apague la expresión de los genes de virulencia y atenuar así la patogenicidad, ha sido una idea muy prometedora, por ello se han diseñado diversos análogos de AHL que inhiben la señalización, con ello la virulencia y la patogenicidad se ha visto disminuida en la bacteria (Williams *et al.*, 2000).

La inhibición de QS se puede realizar mediante diferentes vías: I. bloqueo en la síntesis de AHL, II. Degradación del AI, III. Inhibición de la activación del receptor de AHL, cualquiera de las vías que se siga tendrá como resultado la disminución de la patogenicidad por la inhibición en la expresión de los factores de virulencia (Juhas *et al.*, 2005).

Por otro lado existen evidencias de que mutantes de *P. aeruginosa* en *rhl* y *lasI* causan menos destrucción en el tejido además de disminuir la mortalidad en comparación con las cepas silvestres lo que indica el papel tan importante del QS en la patogénesis (Rasmussen *et al.*, 2005).

La funcionalidad de diversos análogos de AHL ha sido demostrada, por Yang y cols. en 2009, quienes describen las evidencias de que tres análogos de AHL: ácido salicílico, nifuroxazida y clorzoxazona muestran inhibición significativa de genes y fenotipos relacionados con QS dependiendo de la dosis. Por otra parte la furanona C-30 la cual tiene actividad antagonista contra sistemas de QS evita el desarrollo de resistencia a antibióticos en la biopelícula, reduce la persistencia de la infección de *P. aeruginosa* en modelo pulmonar de ratón, además de inhibir la producción de factores de virulencia extracelulares (Hentzer *et al.*, 2002).

Otras moléculas inhibidoras de QS que han sido descritas son: compuestos cíclicos sulfurados, patulina, ácido penicilínico (Rasmussen *et al.*, 2005). El uso de sistemas de escrutinio de moléculas también ha brindado otros resultados, tal es el caso del extracto de ajo y 4-nitro-piridina-N-óxido, inhibidores que disminuyen la virulencia de *P. aeruginosa* en *Caenorhabditis elegans*, además de hacer la biopelícula más susceptible al tratamiento con antibióticos convencionales como la tobramicina (Rasmussen *et al.*, 2005).

En la figura 12 se muestran las estructuras de diferentes inhibidores del Quorum sensing, los cuales no muestran relación en su estructura química.

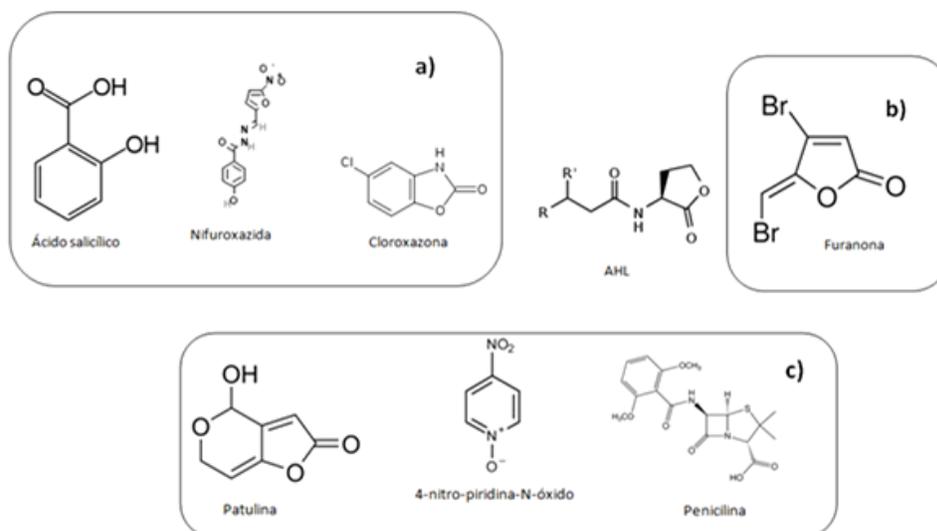


Figura 12. Estructura de los inhibidores de *Quorum sensing*. a) Análogos de AHL. b) Antagonistas de QS. c) Otros compuestos inhibidores de QS.

5-Fluorouracilo como inhibidor del Quorum sensing

El 5-fluoro-2,4 (1H,3H)-pirimidinidiona o también conocido como 5-fluorouracilo (5FU) es una pirimidina fluorada, es un polvo cristalino color blanco, poco soluble en agua (de 31 a 100 partes) (Nelson *et al.*, 2005).

Es un análogo del uracilo en su estructura cuya diferencia es que un átomo de hidrógeno en la posición 5 ha sido sustituido por un flúor

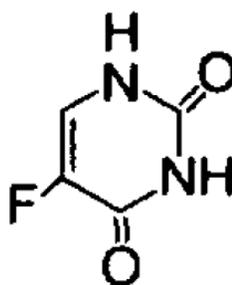


Figura 13. Estructura química del 5-Fluorouracilo. Fórmula química $C_4H_3FN_2O_2$; PM 130.08 g

Es un antimetabolito antineoplásico usado principalmente en carcinoma de colon, rectal, mama, estómago, páncreas, etc. en crema se utiliza para el tratamiento de queratosis actínicas esto es, carcinoma de células basales superficiales (cáncer de piel) (Nelson *et al.*, 2005).

Es un potente agente quimioterapéutico, cuyo blanco en la quimioterapia es la enzima timidilato sintasa la cual se encarga de catalizar la reacción de metilación del ácido desoxiuridimílico en ácido timidílico (Nelson *et al.*, 2005). No inhibe a la enzima por sí mismo, su efecto se debe a su metabolito “fluoro-desoxiuridin monofosfato” el cual forma un complejo ternario estable con la timidilato sintasa, de esta manera el 5FU interfiere con la síntesis de DNA y en menor proporción con la del RNA (Figura 14). Puede producir deficiencia de timina lo cual provoca un desequilibrio en el crecimiento de las células y con ello muerte celular (Nelson *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción se ejemplifica en el siguiente esquema:

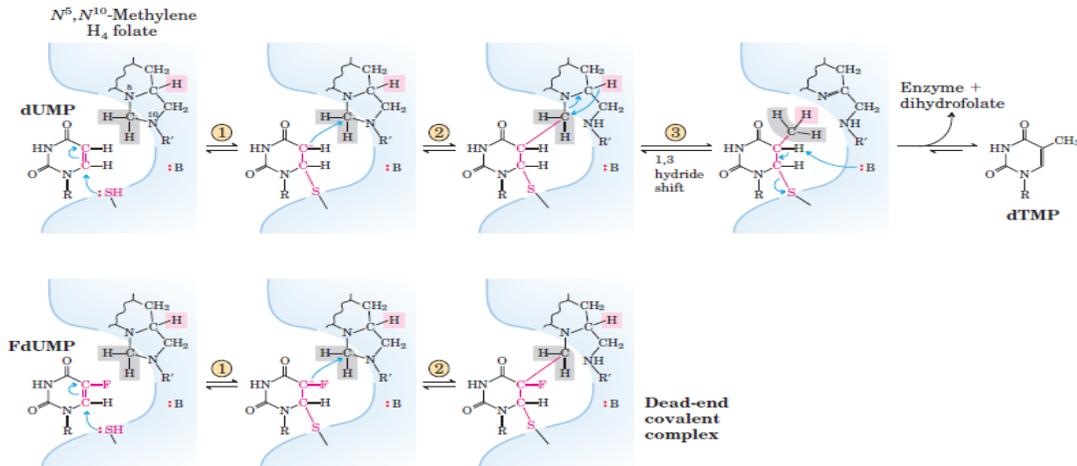


Figura 14. Conversión de dUMP a dTMP y su inhibición por FdUMP. Tomada de Nelson *et al.* (2005).

Efecto del 5-fluorouracilo en bacterias

Hussain y cols. (1992) evaluaron distintos compuestos antimicrobianos y agentes quimioterapéuticos en cepas de *Estafilococos coagulasa negativa* que producen biopelícula encontrando que el 5FU inhibe la producción de biopelícula a concentraciones que no afectan el crecimiento de la bacteria.

Posteriormente, Attilay cols. (2009) evaluaron el efecto del análogo del uracilo 5FU en tres cepas diferentes de *E. coli* encontrando que en todas ellas se reduce la formación de biopelícula siendo esta inhibición dosis dependiente en medio LB; cuando se adicionó 5FU 25 μM se observó una disminución de 5 veces respecto al control. El 5FU afecta la expresión de genes ya que la adición del mismo indujo la transcripción de 152 genes y reprimió la de 16 genes, además de que se encontró que el 5FU induce la expresión de proteínas que reprimen la formación de biopelícula como algunas proteínas de membrana y de proteínas reguladoras de resistencia ácida.

En un estudio realizado por Ueda y cols. en 2009 sobre *P. aeruginosa*, mediante un escrutinio para identificar mutantes con alteraciones en la formación de biopelículas, encontraron 7 mutaciones relacionadas con la biosíntesis de uracilo que abaten la formación de biopelícula. Una mutación específica en el último paso en la vía de síntesis de UMP (uridin monofosfato) altera la expresión de las 3 vías de QS (LasR-, RhlR- y PQS) y con la adición de uracilo se restaura la expresión a los mismos niveles de la cepa silvestre por lo tanto, el uracilo tiene influencia en la virulencia, la formación de biopelícula y otros fenotipos relacionados con QS. Estos autores además evaluaron a análogos del uracilo como posibles inhibidores de biopelículas y factores de virulencia encontrando que el 5FU (10 μM) inhibe la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia como: elastasa, piocianina, ramnolípidos, producción de PQS y swarming en la cepa de referencia PA14 además de que disminuye la

patogenicidad de esta cepa de *P. aeruginosa* en un modelo de germinación de semillas de cebada.

Ácidos anacárdicos como inhibidores del Quorum sensing.

Generalidades

Los ácidos anacárdicos son derivados del ácido salicílico con cadenas alquílicas saturadas en posición *meta* (figura 15), a las cuales el residuo de ácido salicílico les confiere cierta solubilidad en solventes orgánicos (Castillo-Juarez *et al.*, 2007).

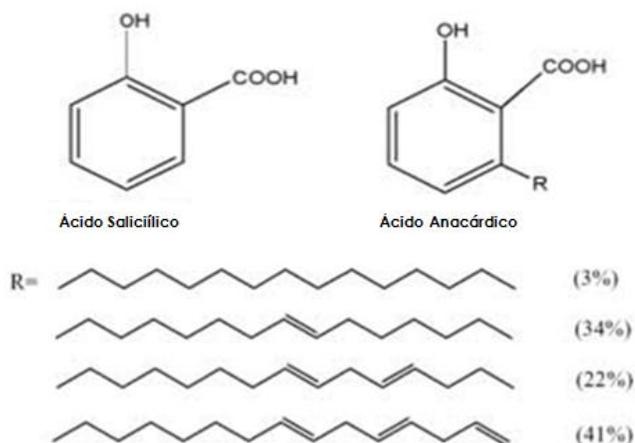


Figura 15. Estructura de los Ácidos Anacárdicos. Modificado de Jagani *et al.* (2009).

Estos compuestos se encuentran como ácidos libres en la naturaleza en algunas plantas de la familia *Anacardiaceae* así como en el *Ginko biloba*. La familia *Anacardiaceae*, ha sido históricamente, la fuente principal de ácidos anacárdicos utilizados en investigación (Tyman 2000).

Amphiptherygium adstringens, conocido por la población mexicana como *Cuachalalate* o *Palo de rosa*, es una especie endémica de México perteneciente a la familia *Anacardaceae*. Ésta especie está ampliamente distribuida a lo largo de América latina, desde México hasta Perú; en México se encuentra

abundantemente en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos, Puebla y Estado de México. Es un árbol que se caracteriza por ser resinoso y es ampliamente usado en la medicina tradicional mexicana con diversos fines terapéuticos. Su corteza se vende en casi todos los mercados del país. Entre sus propiedades terapéuticas se encuentran: disminución de los niveles de colesterol, además de ser un agente antiinflamatorio y previene la formación de úlceras. Se le atribuyen también (según la medicina tradicional) propiedades cicatrizantes, antibióticas, analgésicas en el caso de los cólicos, antipiréticas, auxilia en la disolución de los cálculos renales, antimalárico, y auxiliar en el tratamiento de úlceras gástricas (Olivera-Ortega *et al.*, 1999).

Entre los componentes principales de la corteza de *A. adstringens* se encuentran los ácidos y aldehídos anacárdicos (Mata *et al.*, 1991; Oviedo-Chavez, *et al.*, 2004).

Actividad biológica de los ácidos anacárdicos y extractos de *A. adstringens* frente a *P. aeruginosa*

En 1993 Kubo y cols. reportaron que extractos de *Anacardium occidentale* (perteneciente a la familia *Anacardiaceae*) con alto contenido de ácidos anacárdicos (Tabla 3) mostraron una potente actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus mutans*. Debido a su actividad frente a *P. acnes* sugirieron el uso de compuestos fenólicos como los ácidos anacárdicos como conservadores en productos cosméticos.

Se conoce que la actividad antimicrobiana de los ácidos anacárdicos depende de diversos factores, como la longitud de la cadena alquílica presente en el ácido, así como el tipo de microorganismo (Kubo *et al.*, 1993).

Se ha observado que la actividad antimicrobiana de los ácidos anacárdicos es mayor que la que presenta el ácido salicílico, lo cual sugiere que las cadenas alquílicas le confieren un incremento de la actividad antibiótica (Kubo *et al.*, 1993; Jagani *et al.*, 2009).

Ácido 2-hidroxi-6-(pentadecil)-benzoico

Ácido 2-hidroxi-6-[(Z)-pentadeca-8enil]-benzoico

Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z)-pentadeca-8,11-dienil]-benzoico

Ácido 2-hidroxi-6-[(Z,Z)-pentadeca-8,11,14-trienil]-benzoico

Tabla 3. Ácidos Anacárdicos presentes en *Anacardium occidentale*. (Tyman, 2000)

Estudios sobre la estructura actividad de los ácidos anacárdicos muestran que dichos compuestos generalmente no presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, además algunos (ácido 6-octilsalisílico) presentan actividad antifúngica frente a *Penicillium chrysogenum* (Kubo *et al.*, 1993).

Estudios fitoquímicos de la corteza de *A. adstringens*, han permitido aislar e identificar varios triterpenoides y fenoles de cadena larga. Así mismo, se reportan diferentes actividades para diferentes tipos de extractos, por ejemplo; se conoce que un extracto hexánico de corteza de *A. adstringens* presentan actividad hipocolesterolemica; en tanto que para los extractos metanólicos se ha reportado actividad gastroprotectora así como actividad moderada contra *Trypanosoma cruzi*. Por otro lado los extractos hexano:agua se ha encontrado que poseen actividad antiinflamatoria y finalmente se reportó que ciertos extractos enriquecidos en triterpenos son activos frente a células de leucemia (Navarrete *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1991).

Catillo-Juárez y cols. reportaron en 2007, la actividad antimicrobiana de diversos extractos de *A. adstringens*, frente a *Helicobacter pylori*, espirilo Gram negativo, agente etiológico del 10-20% de los casos de gastritis y úlcera péptica, microorganismo que también está asociado con riesgo de desarrollo de cáncer de estómago. En dicho estudio se encontró una significativa actividad antimicrobiana (100% a una concentración de 160 µg/mL) en una de las fracciones extraídas en éter de petróleo. El análisis de la fracción evidenció la presencia de 3 distintos ácidos masticadienoicos, β-sistosterol y ácidos anacárdicos; no obstante, tras comparar la actividad antimicrobiana de cada uno de los componentes de la mezcla por separado se encontró que los ácidos anacárdicos inhibieron completamente el crecimiento de *Helicobacter pylori*, lo cual se comprobó al realizar pruebas con mezclas con alto contenido de ácidos anacárdicos, en donde además se observó que existe un efecto dosis-respuesta. La concentración mínima inhibitoria para los ácidos anacárdicos (CMI) reportada en este estudio fue de 10 µg/mL (Castillo-Juarez *et al.*, 2007).

En cuanto a la determinación de la toxicidad de las mezclas de ácidos anacárdicos obtenidas de *A. adstringens* con *Artemia salina* no revelaron efecto tóxico. Los resultados reportados en la prueba de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) en células mononucleares periféricas (PBMC) indican que no se afecta la viabilidad de las mismas, así como tampoco se observaron datos que sugieran daño al material genético (Castillo-Juarez *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria de gran importancia clínica situada dentro de los tres primeros agentes etiológicos causantes de infecciones nosocomiales y debido a los mecanismos de resistencia que ha desarrollado contra los antibióticos, es necesaria la búsqueda de terapias novedosas que ayuden a contrarrestar la infección que causa y retrasen la aparición de la resistencia contra éstas, disminuyendo así la morbilidad-mortalidad producida por éste microorganismo.

En la actualidad el estudio de *P. aeruginosa* se ha centrado en la determinación del efecto de inhibidores del Quorum sensing en cepas de referencia, no obstante, existen pocos estudios en donde se demuestra el efecto inhibitorio en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas. Con el presente estudio se pretende evaluar el efecto de 5 fluorouracilo y extractos de ácidos anacárdicos en cepas aisladas de muestras clínicas versus cepas de referencia.

HIPÓTESIS

En cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas, tal como en cepas de referencia, al ser expuestas a 5 fluorouracilo y a una mezcla de ácidos anacárdicos obtenida de un extracto de *Amphiterygium adstringens*, se observará un efecto inhibitorio en la producción de los factores de virulencia dependientes de Quorum sensing: elastasa, piocianina y ramnolípidos,

OBJETIVO GENERAL

- ★ Evaluar el efecto de una mezcla de ácidos anacárdicos obtenida de un extracto hexánico de corteza de *Amphyterigium adstringens* y 5 fluorouracilo sobre la producción de los factores de virulencia dependientes de Quorum sensing en cepas de *P. aeruginosa* provenientes de muestras clínicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si existe efecto sobre el crecimiento de las diferentes cepas con la adición de inhibidores del Quorum sensing.
- Evaluar la actividad elastolítica del sobrenadante después del tratamiento con la mezcla de ácidos anacárdicos y 5 fluorouracilo.
- Evaluar la producción de pirocianina en el sobrenadante después del tratamiento con la mezcla de ácidos anacárdicos y 5 fluorouracilo.
- Evaluar la producción de ramnolípidos en el sobrenadante después del tratamiento con la mezcla de ácidos anacárdicos y 5 fluorouracilo.
- Evaluar la funcionalidad de los sistemas de Quorum sensing mediante la producción basal de N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona en las cepas aisladas de muestras clínicas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se presentan un esquema (figura 16) con la metodología general realizada para la determinación de factores de virulencia (dependientes de QS) en cepas de *P. aeruginosa* de referencia y cepas aisladas de muestras clínicas:

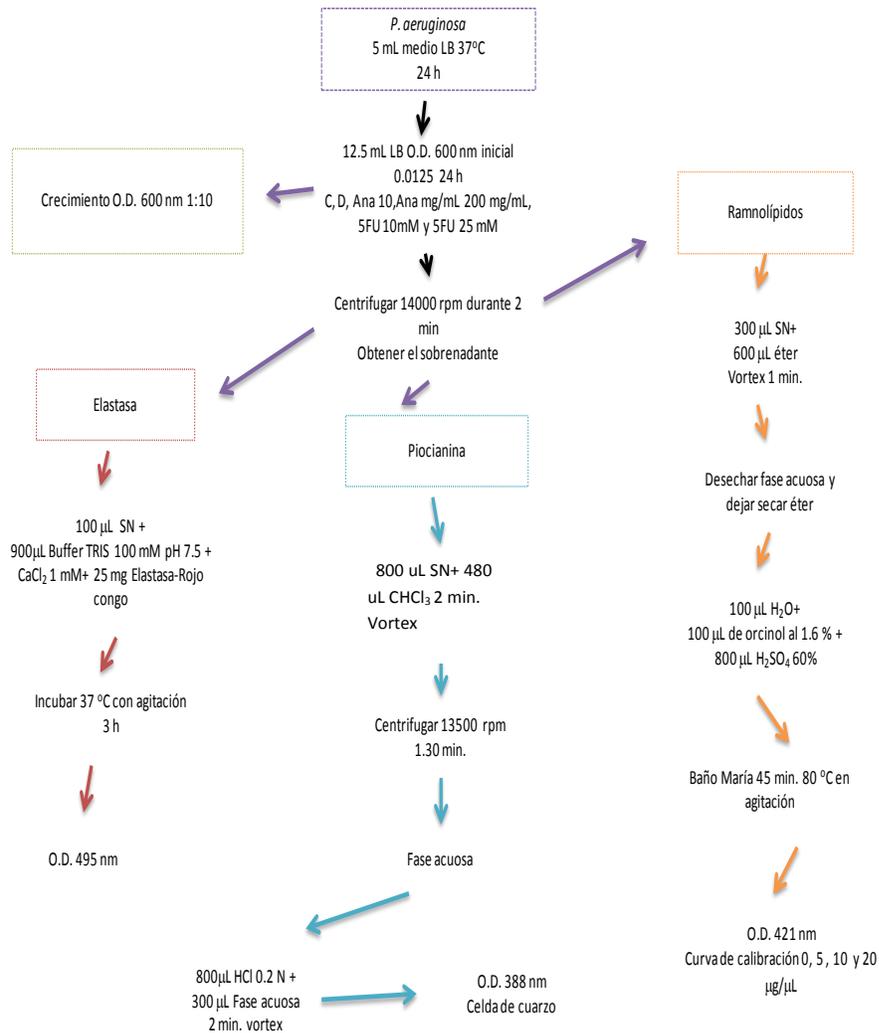


Figura 16. Metodología general para la extracción y cuantificación de los factores de virulencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Cepas

Para la realización de los ensayos se utilizaron dos cepas de referencia la cepa PA14 de la colección del laboratorio del Dr. Fred Ausubel de la *Escuela Médica de Harvard* (Liberati, Urbach et al. 2006), aislada originalmente de un paciente con quemaduras y la cepa PAO1 de la colección del laboratorio del Prof. *Wilbert Bitter del Centro Médico Universitario, Ámsterdam* aislada originalmente de un paciente con quemaduras.

Se utilizaron 10 cepas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* para el estudio, denominadas: 9, 12, 17, 23, 188, 440, 526, 51U, 5U y RN, las cuales fueron colectadas en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) de pacientes pediátricos infectados durante el periodo 2007 a 2010. Las cepas se mantuvieron a una temperatura de -70°C en un medio deslactosado (Difco Lawrence, KS) y fueron cultivadas en placas de agar sangre de cordero al 5% a 37°C (BBL, Franklin Lakes, NJ). Los aislados fueron obtenidos de distintas muestras clínicas (orina, sangre y de catéter). Su susceptibilidad a antimicrobianos se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria 50% (CMI50) empleando el método en Mueller-Hinton (BBL) como lo recomienda CLSI, los agentes probados fueron ciprofloxacino (MP biomedical, Solon, OH), meropenem (AstraZeneca, Cheshire, UK), piperacilina/taxobactam (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo), cefepime (Sigma-Aldrich), amikacina (MP. Biomedicals) y colistina (Sigma-Aldrich). La mayoría de las cepas clínicas mostraron multiresistencia a más de cuatro de los grupos antimicrobianos probados (excepto 5U y 51U), todas menos las dos ya mencionadas fueron resistentes a ciprofloxacino, meropenem, cefepima y amikacina, así mismo todas se mostraron susceptibles a colistina. Las cepas y los datos mostrados en el presente trabajo se obtuvieron del laboratorio de la Dra. Norma Velázquez Guadarrama del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Mezcla de Ácidos anacárdicos de un extracto de *Amphipterygium adstringens*

La mezcla de ácidos anacárdicos obtenida de un extracto hexánico de corteza de *A. adstringens*, utilizada en el presente estudio, fue brindada por el Dr. Mariano Martínez del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Medio de cultivo

Para el crecimiento de *P. aeruginosa* se preparó medio de cultivo LB disuelto en agua destilada cuya composición se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4 Composición del medio LB en g/L

LB	
Extracto de levadura*	5
Triptona**	10
NaCl***	10

* Dibco S.A. de C.V. ** Triptona Tryptone Plus Organo Technie S.A.S.; *** Reasol

El medio se esterilizó por autoclave durante 45 minutos a 15 libras de presión. Para obtener las placas se adicionó agar purificado Bixon (1.5%) y se vertió en cajas de Petri. La esterilidad del medio se comprobó incubando las placas por 24 h a 37°C para descartar cualquier contaminación microbiana.

Ensayo de CMI 50%

A partir de cultivos ON (overnight) los cuales se obtuvieron a partir de cepas axénicas crecidas en placas de agar y colocadas en medio líquido crecidas durante toda la noche, se inocularon con D.O. 600 nm inicial de 0.0125 en tubos de ensayo de 22 mm de ancho X 175 mm de alto con 12.5 mL de LB además de adicionar 0, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 µM de 5FU (Sigma) y 0, 10, 100, 200, 400, 600 µg/mL de mezcla de ácidos anacárdicos y DMSO utilizado a la máxima

concentración (solución stock 200 mg/mL disueltos en DMSO). Los tubos se incubaron 24 h a 37°C con agitación a 200 rpm.

Se midió el crecimiento a D.O. 600 nm (dilución 1:10), se graficó la concentración del 5FU o ANA (mezcla de ácidos anacárdicos) en eje X y la absorbancia en el eje Y para obtener la concentración de 5FU y ANA en la cual el 50% de la población es inhibida.

Ensayo CMI de antibióticos

A partir de cultivos ON se inocularon tubos de ensaye con capacidad de 15 mL a una D.O. 600 nm inicial de 0.05, además se adicionaron antibióticos (gentamicina, ciprofloxacino, imipenem y ceftazidime) a diluciones seriales 1:2 y los controles sin antibióticos en medio LB, se incubaron con agitación por 24 h a 37 °C y se midió la D.O. final a 600 nm.

El criterio para indicar sensibilidad/resistencia se baso en el trabajo descrito por Schabery cols. (2004).

Condiciones del cultivo

Se sembraron las cepas en cajas de LB con 1.5% de agar a partir de gliceroles axénicos, se crecieron a por 24 horas a 37°C en incubadora, posteriormente se inocularon cultivos ON de las cepas en matraces de 25 ml con 5 ml de medio LB, se crecieron plantónicamente en una incubadora de agitación a 37°C a 200 rpm, se midió el crecimiento de los cultivos a O.D de 600 nm con una dilución 1:10 en LB.

Se inocularon nuevos cultivos de las cepas a partir de los ON con una O.D 600 nm inicial de aproximadamente 0.0125 en 12.5 mL de LB. Se adicionó a dos cultivos 25 μ M y 50 μ M de 5FU a partir de una solución 50 mM de 5FU. En tres cultivos más se adicionó 10, 200 y 400 μ g/mL de ANA y en uno más DMSO

(utilizado a la máxima concentración), así mismo, se utilizó un cultivo control. Los cultivos se incubaron con agitación por 24 horas a 37°C.

Después de las 24 horas se midió el crecimiento a 600 nm con una dilución 1:10 en LB, se tomaron 2 ml de cada uno de los cultivos en tubos Eppendorf, se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 min y se recupero el sobrenadante el cual sirvió para cuantificar los factores de virulencia.

Determinación de elastasa

La actividad de la elastasa está basada en la determinación espectrofotométrica de la cantidad del colorante rojo Congo liberado del complejo elastina-rojo Congo por la proteólisis catalizada por la elastasa presente en los sobrenadantes (Ohman *et al.*, 1980).

Después de haber obtenido los cultivos con sus condiciones previas se realizó lo siguiente:

Se colocaron 100 µL del sobrenadante de cada uno de los cultivos (C, 5FU 10µM, 25 µM, 50 µM y 10, 200 µg/mL de ANA, DMSO utilizado a la máxima concentración y LB) en tubos eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 25 mg de elastina-rojo Congo de Sigma y 900 µL de buffer Tris 100 mM adicionado con 1mM de CaCl₂ a pH 7.5. Los tubos se colocaron en agitación (200 rpm) a 37 °C durante 3 horas, se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y se midió la absorbancia a 495 nm.

La actividad de elastasa relativo al número de células se obtuvo calculando el cociente D.O. 495 nm/D.O. 600 nm.

Determinación de la fenazina piocianina

La medición de piocianina está basada en una determinación espectrofotométrica después de la extracción con cloroformo y HCl 0.2 N (Essar, Eberly et al. 1990).

Previamente los cultivos fueron sometidos a las condiciones antes mencionadas. Se tomaron 800 μL del sobrenadante de los cultivos (C, 5FU 10 μM , 25 μM , 50 μM y 10, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ de ANA y DMSO utilizado a la máxima concentración) se adicionaron 480 μL de cloroformo, durante 1.5 minutos se agitaron en vortex y se centrifugaron a 13500 rpm durante 1.5 minutos, se transfirieron 300 μL de la fase de cloroformo a un nuevo tubo y se adicionaron 800 μL de HCl 0.2 N y se agitaron en vortex durante 1 min.

Se midió la absorbancia de la fase acuosa en una celda de cuarzo, a 279 nm, 388 nm y 520 nm, debido a que las lecturas a 279 nm son muy pequeñas y a 520 nm son muy altas se eligió la medición de 388 nm para presentar los datos.

El contenido de piocianina relativo al número de células se calculó mediante el cociente D.O. 388 nm/D.O.600 nm.

Determinación de Ramnolípidos

Los ramnolípidos fueron cuantificados espectrofotométricamente (Wilhelm, Gdynia et al. 2007) bajo el siguiente procedimiento:

Se transfirieron 300 μL del sobrenadante, se agregaron 300 μL de agua y 600 μL de dietileter para realizar la extracción, la fracción con éter fue colectada y se dejó evaporar por 4 horas.

Al residuo se le adicionaron 100 μL de agua y se disolvió, se agregaron 100 μL de orcinol 1.6% y 800 μL de H_2SO_4 60%. Se incubó a 80°C por 45 min con agitación a 250 rpm, la absorbancia fue medida a 421 nm.

Se realizó una curva estándar con 0, 5, 10 y 20 µg de ramnosa (L-Rhamnose monohydrate, minimum 99% Sigma-Aldrich).

Se utilizó como control negativo la cepa PA14 *rhIR* (que no produce ramnolípidos).

La cantidad de ramnolípidos fue normalizada con el crecimiento, se considera que 1 µg de ramnosa corresponde a 2.5 µg de ramnolípidos.

Determinación del autoinductor N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona mediante el bioensayo con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4)

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria G(-) patógeno de plantas que utiliza la comunicación por censado de quórum dependiente de Acil homoserin lactonas para coordinar sus procesos infecciosos, utilizando como autoinductor la señal N-(3-oxooctanoil) homoserin lactona la cual se une al receptor TraR (homologo de LuxR). Además de la señal endógena TraR puede unirse a otras homoserin lactonas de cadena larga como la N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona de *Pseudomonas aeruginosa* lo que ha permitido construir una cepa de *A. tumefaciens* diseñada para la determinación de esta y otras homoserin lactonas, esta cepa es denominada NTL4 (pZLR4) y es incapaz de producir el autoinductor endógeno pero posee el gen *traR* silvestre y se le han añadido los genes de la beta-galactosidasa en una fusión traduccional con el gen *traG*, bajo su promotor, el cual es reconocido por TraR unido a la homoserin lactona, de manera que al existir homoserin lactona en el medio TraR se une a ella y activa la producción de la beta-galactosidasa cuya actividad es fácilmente determinable y va a ser proporcional a la concentración de acilhomoserin lactona en el medio (Farrand *et al.*, 1996). Esta cepa fue brindada por el Dr. Stephen K. Farrand de la Universidad de Illinois.

Se cultivó *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en 5 mL de LB a 30°C con agitación 200 rpm por aproximadamente 15 h.

Se cultivaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a las cuales se les determinó la presencia de la N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona en 5 mL de LB a 37°C con agitación 200 rpm por aproximadamente 15 h.

Se cosecharon las células de *Pseudomonas aeruginosa* mediante centrifugación 2 min a 13,000 rpm y se tomaron alícuotas de 4 mL de sobrenadantes los cuales se filtraron con un poro de tamaño 0.22 μ M para volverlas estériles.

Se utilizaron los precultivos de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) para inocular nuevos cultivos a D.O. 600 nm de 0.1 en medio AB, se uso un cultivo como control para estimar la producción basal (en ausencia de homserin lactona) de betagalactosidasa y a los demás se les añaden 400 μ L de los sobrenadantes estériles de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a probar y se cultivaron a 30°C con agitación de 200 rpm por aproximadamente 24 h.

Se cosecharon 2 mL de las células de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) mediante centrifugación por 2 min a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con agua bidestilada estéril, se centrifugaron nuevamente y se concentraron en 1 mL de agua bidestilada estéril. Estas células se utilizaron para ensayar la beta-galactosidasa producida en función de la presencia de N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona en los sobrenadantes a las que fueron expuestas.

Se tomaron 40 μ L de células y se añadieron 80 μ L de solución de permeabilización incubándose media hora a 30°C con agitación 200 rpm. Durante este tiempo también se incubo la solución de substrato para la betagalactosidasa.

Se añadieron 600 μL de solución de sustrato a las células permeabilizadas y se incubaron por 45 minutos en las mismas condiciones.

Se añadieron 700 μL de solución de término a cada tubo de células para detener la reacción.

Se centrifugaron las células durante 5 min a 13,000 rpm, se tomó el sobrenadante con cuidado de no resuspender a las células y se determinó su absorbancia a 421 nm (longitud de onda a la que absorbe el producto de la beta-galactosidasa).

Tabla 5. Soluciones empleadas para la determinación del autoinductor

Soluciones		
Permeabilización	Sustrato	Stop
Se necesitaron 80 μL por muestra.	Se necesitaron 600 μL por muestra.	Se necesitaron 700 μL por muestra.
100 mM (Na_2HPO_4) 20 mM KCl 2 mM MgSO_4 0.8 mg/mL CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 0.4 mg/mL deoxicolato de sodio 5.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ beta-mercaptoetanol.	60 mM Na_2HPO_4 40 mM NaH_2PO_4 1 mg/mL o-nitrofenil- β -D-Galactopiranosido (ONPG) 2.7 $\mu\text{L}/\text{mL}$ β -mercaptoetanol.	1 M Carbonato de sodio (Na_2CO_3) El pH de la solución de stop desnatura la β -Galactosidasa y hace que el color amarillo se intensifique.

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, se determinó media y error estándar. Para la comparación de medias se utilizó el test ANOVA con prueba de Dunnett $\alpha=0.05$ y prueba de Fischer $\alpha=0.05$. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se empleó hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007®.

RESULTADOS

Ensayo para determinar la sensibilidad frente a microbianos evaluando la CMI₅₀ de antibióticos.

Se verificó la resistencia contra antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* tanto de las cepas de referencia como de las cepas aisladas de muestras clínicas, para la evaluación se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) que presentan frente a los antibióticos Gentamicina (aminoglucósido), Ciprofloxacino (fluoroquinolona), Imipenem (carbapenem) y Ceftazidime (cefalosporina de 3ª generación).

Los resultados obtenidos corroboraron la información brindada acerca de las cepas aisladas de muestras clínicas, en la cual se reportó que todas las cepas con excepción de 51U y 5U mostraron resistencia a los antibióticos ciprofloxacino, meropenem (carbapenem), cefepima (cefalosporina de 3ª generación y amikacina (aminoglucósido). Tal y como se esperaba para las cepas 5U y 51U en el ensayo realizado, se encontró que ambas son sensibles a los grupos antimicrobianos probados a excepción del imipenem para la cepa 51U ya que presenta una resistencia moderada, único dato que difiere con lo previamente reportado. Todas las cepas mostraron susceptibilidad a colistina (antibiótico polipeptídico) tal y como se había previamente determinado en el hospital infantil.

Las cepas de referencia y la cepa 5U aislada de muestras clínicas presentan susceptibilidad frente a los cuatro grupos de antibióticos probados, en tanto que las restantes cepas aisladas de muestras clínicas presentan multiresistencia a los antibióticos probados.

En la tabla 6 se presentan los valores de CMI para las dos cepas de referencia y para las 10 cepas aisladas de muestras clínicas frente a los cuatro antibióticos empleados en el ensayo.

Si la CMI es $<8 \mu\text{g/mL}$ la cepa es susceptible a ese antibiótico, si la CMI es $>8 \mu\text{g/mL}$ las cepas son resistentes criterio tomado de Schaber y cols. (2004).

Cepa	Antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)			
	Gentamicina	Ciprofluoxacino	Imipenem	Ceftazidime
PA14	<2	<1	<1	<4
PA01	<2	<1	<1	<1
9	>16	>32	>16	>32
12	>32	>32	>8	>32
17	>32	>32	>16	>16
23	>32	>32	>16	>32
188	>8	>8	>16	>32
440	>32	>4	>32	>32
526	>32	>32	>16	>16
5U	<4	<2	<8	<4
51U	<1	<1	>8	<4
RN	>32	>16	>16	>32

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI $\mu\text{g/mL}$) de las cepas de *P. aeruginosa*; cepas de referencia PA14 y PA01 sensibles a los antibióticos probados; en las cepas aisladas de muestras clínicas se observa multirresistencia con excepción de 5U y 51U. Ensayo CMI en medio LB+antibiótico con cultivos incubados 24 h/37°C.

Determinación de los factores de virulencia dependientes de Quorum sensing en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (cepas de referencia y cepas aisladas de muestras clínicas).

En el presente trabajo se evaluó el efecto como posibles inhibidores del QS de los compuestos 5-fluorouracilo y una mezcla de ácidos anacárdicos con dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente.

Para ello, se determinó la producción de elastasa, controlada por el sistema *las*; la producción de la fenazina piocianina y producción de ramnolípidos, ambas controladas por el sistema *rhl* (Strateva 2011).

Así mismo, se evaluó el efecto de cada inhibidor sobre el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa*.

Las determinaciones fueron realizadas en sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* en medio LB (cepas de referencia o aisladas de muestras clínicas) incubados por 24 hrs a 37°C con agitación 200 rpm. Las determinaciones fueron realizadas a las 24 hrs de incubación.

Para evaluar el efecto de 5-fluorouracilo (5-FU) se probaron dos concentraciones: 10 y 25 μM , más un cultivo control el cual no fue expuesto al inhibidor.

En el caso de la mezcla de ácidos anacárdicos (ANA), se probaron dos concentraciones, 10 y 200 $\mu\text{g/mL}$, más un cultivo expuesto a DMSO (volumen necesario para obtener solución de ANA 200 $\mu\text{g/mL}$) para evaluar el efecto del disolvente y un cultivo control no expuesto al inhibidor o al disolvente (figura 17).

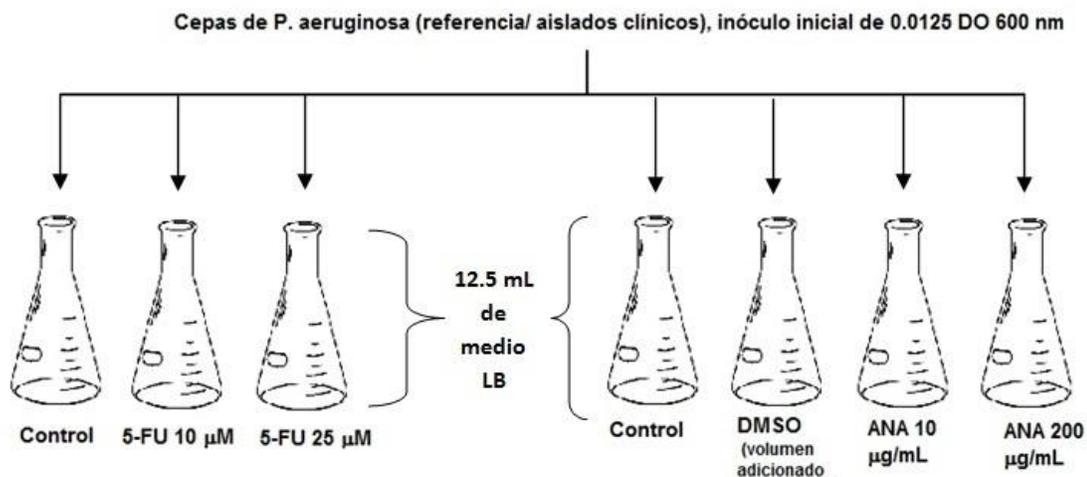


Figura 17. Esquema de los grupos y controles realizados para evaluar el efecto de los posibles inhibidores de Quorum sensing

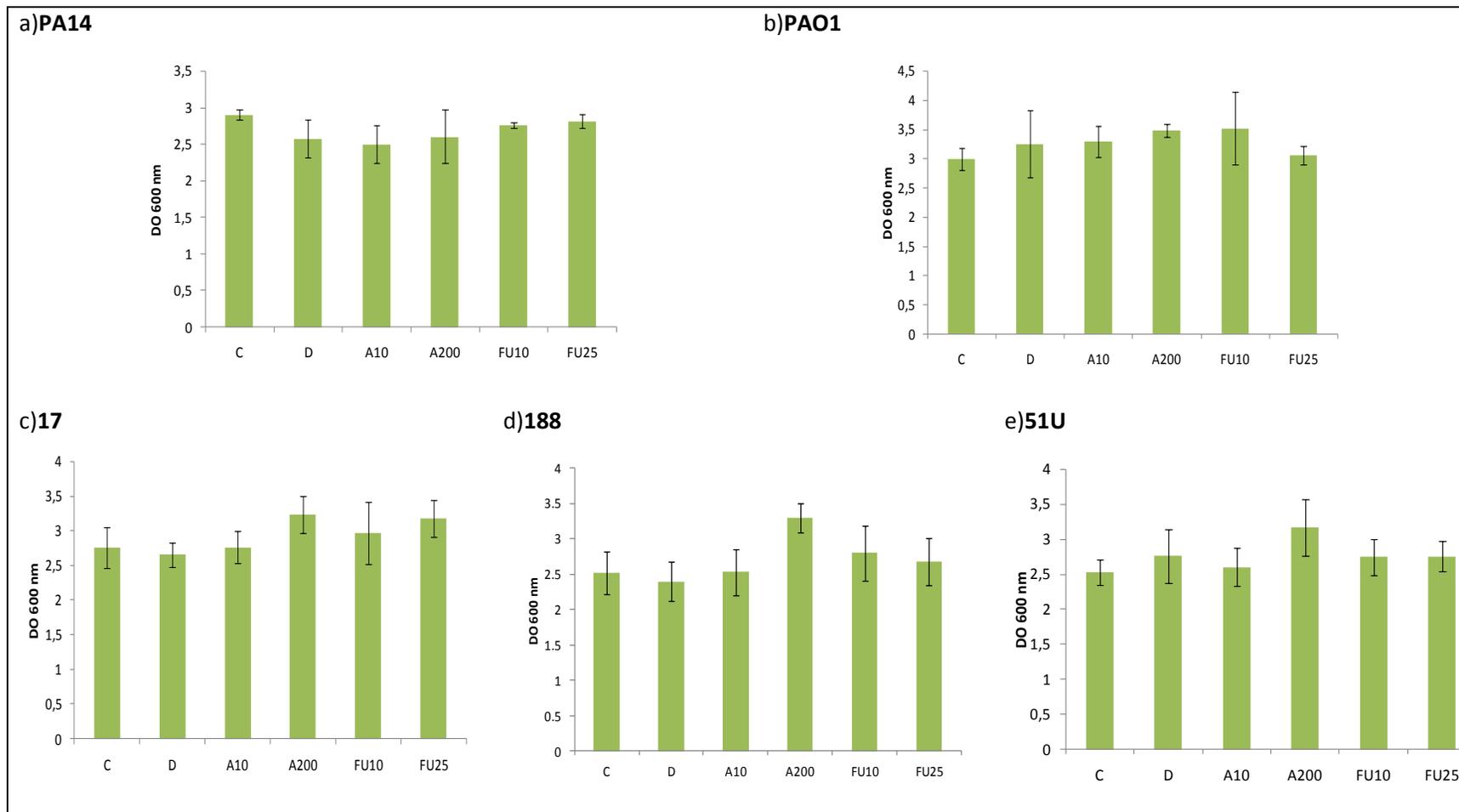
Evaluación del efecto sobre el crecimiento de las cepas de referencia y de las cepas aisladas de muestras clínicas con la adición de los inhibidores del Quorum sensing.

Para la evaluación del efecto sobre el crecimiento las cepas se inocularon en medio LB con una D.O. 600 nm inicial de 0.0125 y después de las 24 h/37°C de incubación con los ácidos anacárdicos, DMSO y 5 fluorouracilo se midió la D.O. a 600 nm.

En todas las cepas evaluadas se observa que el crecimiento no se ve afectado con respecto al control tras la adición de los inhibidores, para conocer cuantitativamente el valor del crecimiento se considera para cada cepa que el crecimiento del control equivale a 1 y a partir de este se calcula el crecimiento remanente relativo tras la adición de los inhibidores y el disolvente respecto al control.

A continuación se presentan las gráficas correspondientes a las 2 cepas de referencia PA14 y PAO1, tres cepas aisladas de muestras clínicas que son representativas de este grupo (en el anexo II se presentan las gráficas obtenidas de la evaluación de la expresión de los factores de virulencia para cada cepa). La primera cepa 51U inhibe la expresión de los factores de virulencia después de la adición de IQS, la segunda cepa 17 no muestra modificación en la expresión de factores de virulencia frente a la adición de los inhibidores de Quorum sensing (IQS), y la última cepa 188 presenta una activación en la expresión tras la adición de los inhibidores del Quorum sensing.

Las gráficas corresponden al crecimiento medido a 600 nm después de ser sometidas a las condiciones de cultivo experimentales durante 24 h/ 37°C; todos los experimentos fueron realizados por triplicado, se determinó la media y el error estándar los cuales se presentan en la gráfica siguiente.



Gráfica 1. Efecto sobre el crecimiento tras la adición de los inhibidores del QS. El crecimiento no se ve afectado en ninguna de las cepas de referencia (incisos a y b) o en las cepas aisladas de muestras clínicas (incisos c, d y e) tras la exposición a los inhibidores probados, el crecimiento se determinó a 600 nm tras 24h/37°C en medio LB y la adición de IQS.

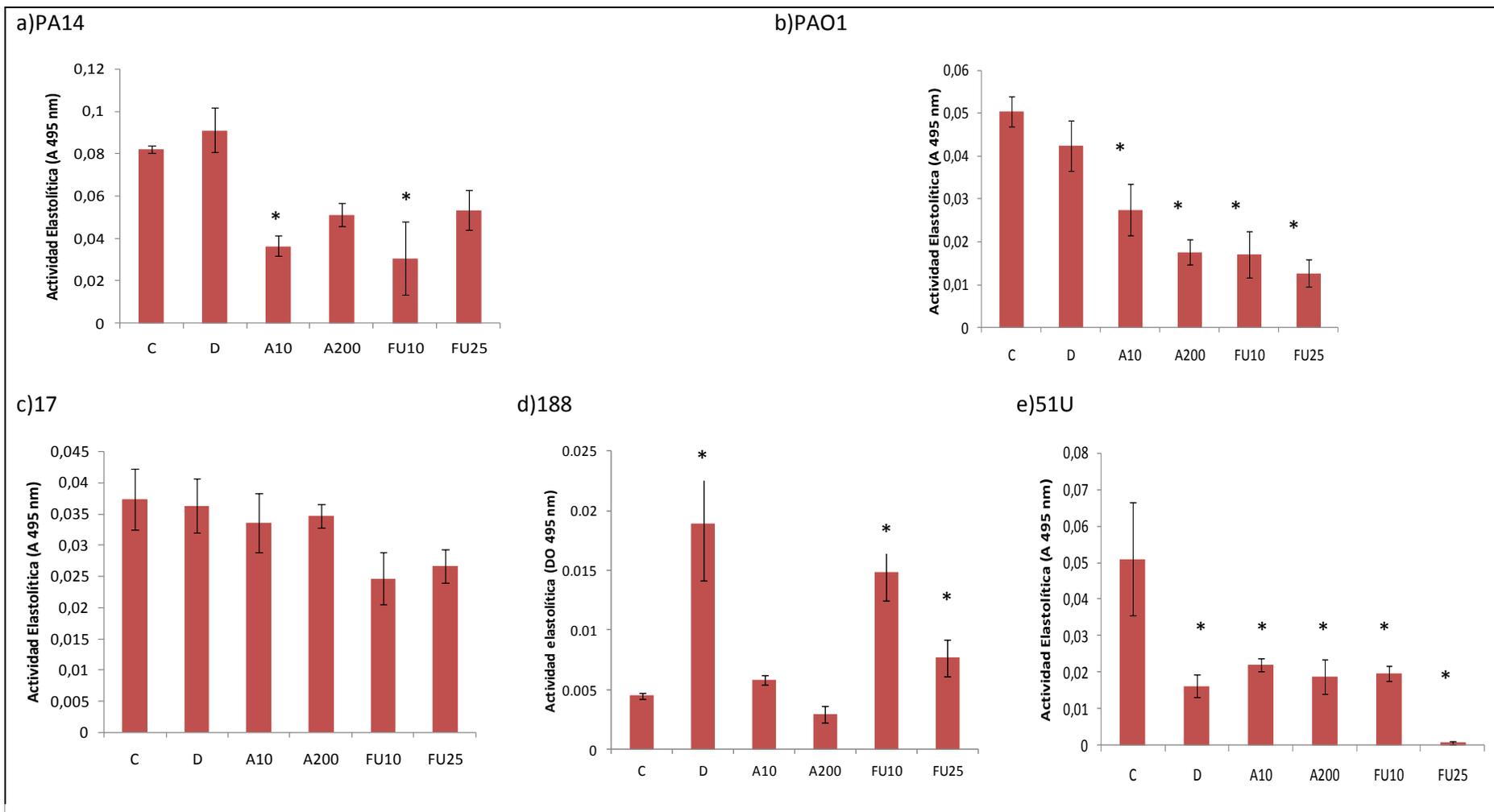
En la tabla 6 (anexo I) se muestran los resultados del crecimiento remanente respecto al control de las cepas de referencia mientras que en la tabla 7 (anexo I) se presentan todas las cepas aisladas de muestras clínicas. El crecimiento remanente se calculó considerando que el crecimiento del control equivale a 1.

Se observa que en ninguna de las cepas utilizadas se ve modificado el crecimiento de manera significativa, se presentan los valores de la media del crecimiento remanente respecto al control y su desviación estándar.

Evaluación de la actividad elastolítica del sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing.

Después de la 24 h de crecimiento sometidas a las condiciones experimentales se obtuvo el sobrenadante de las 10 cepas aisladas de muestras clínicas y de las 2 cepas de referencia para medir la actividad elastolítica (evaluando la cantidad de elastasa que produjeron) medida a 495 nm tras 3 h de reacción.

En la gráfica 2 se presentan las cepas de referencia y las 3 cepas representativas de las cepas aisladas de muestras clínicas, los experimentos se realizaron por triplicado, los valores mostrados en las gráficas corresponden a la media y el error estándar de las mediciones, valores normalizados con el crecimiento de la bacteria.



Gráfica 2. Actividad elastolítica de las cepas de referencia y 3 cepas representativas de las aisladas de muestras clínicas. a) y b) cepas de referencia; a) cepa PA14 tendencia a disminuir con la adición de IQS, inhibición estadísticamente significativa para ácidos anacárdicos 10µg/mL (A10) y 5fluorouracilo 10 µM (FU10); b) cepa PAO1 tendencia de inhibición de la actividad elastolítica después de la adición de los IQS, inhibición estadísticamente significativa para ambos inhibidores ANA y 5FU a concentraciones 10 y 200 µg/mL y 10 y 25 µM respectivamente. **c), d) y e) cepas de aislados clínicos.** C) cepa 17 muestra tendencia a la disminución de la actividad elastolítica sin embargo los cambios no son estadísticamente significativos; d) cepa 188 para ANA a 200µg/mL muestra disminución, con DMSO se activa, con la adición de 5FU muestra una activación en la actividad elastolítica, la activación en todos los casos es estadísticamente significativa; e) cepa 51U tendencia a disminuir tras la adición de los inhibidores todas las inhibiciones son estadísticamente significativas. Nótese que con FU25 la inhibición es casi 100%.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

Para la cepa PA14 se observa una disminución significativa de la actividad elastolítica en los cultivos expuestos a ANA 10 $\mu\text{g/mL}$ (56%) y 5-FU 10 μM , (62%) que corresponden a las concentraciones más bajas probadas, no obstante, el efecto no es significativo al aumentar la concentración de los inhibidores (Gráfica 2, a).

En la cepa PAO1 se observa una disminución significativa en la actividad elastolítica en los cultivos expuestos a ambos inhibidores. Para ANA se observa una disminución del 65% para la concentración más alta probada (200 $\mu\text{g/mL}$), en tanto que para 5-FU hay una disminución del 75% para la concentración más alta probada (25 μM) (Gráfica 2, b).

En la cepa 17 no se muestra ninguna modificación significativa en su actividad elastolítica por los inhibidores, en la cepa 188 expuesta a DMSO, se observa que la actividad elastolítica aumenta hasta tres veces el valor de las células control (320 %).

En la cepa 51U encontró una disminución de la actividad elastolítica tras la exposición a 5-FU, del 61% a 10 μM y del 99% a 25 μM (Gráfica 2, e)

En la tabla 8 (anexo I) se muestran los valores correspondientes a la media de la actividad elastolítica remanente de las cepas de referencia respecto al control y sus valores de desviación estándar y en la tabla 9 (anexo I) se muestran los valores correspondientes a la media de la actividad elastolítica remanente de las cepas aisladas de muestras clínicas respecto al control y sus valores de desviación estándar.

Evaluación de la producción de la fenazina piocianina en el sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing.

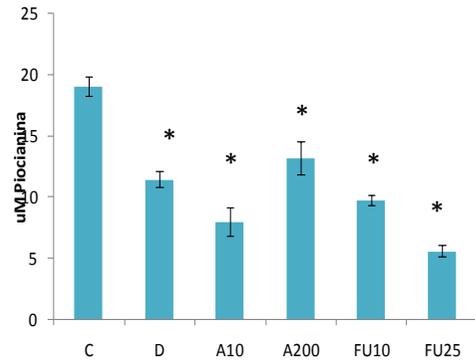
En la gráfica 3 se presentan las graficas obtenidas de la producción de la piocianina de las cepas de referencia y de las 3 cepas representativas aisladas de muestras clínicas. Los ensayos se realizaron por triplicado y los valores que se muestran en la gráfica 3 corresponden a la media y el error estándar de las lecturas en el espectrofotómetro a una λ 388 nm/D.O. a 600 nm.

Tras llevar a cabo el ensayo se obtuvieron los resultados siguientes:

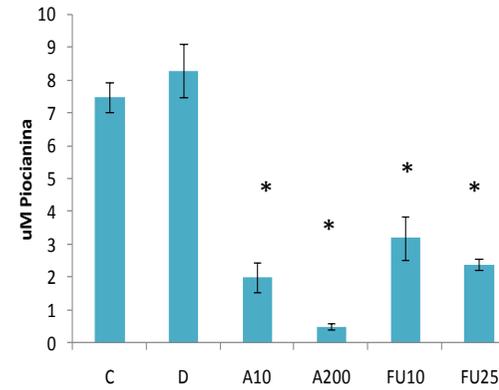
Para el caso de la cepa PA14 se observa una disminución significativa de la producción de la piocianina a todas las concentraciones de los inhibidores probados, inclusive con DMSO (Gráfica 3, a), para a 5-FU 25 μ M y 10 μ M hubo una disminución del 71% y 49 %, respectivamente. Para ANA 10 μ g/mL se observa una disminución del 58%, sin embargo al aumentar a 200 μ g/mL existe una disminución sólo del al 31%.

En la producción de piocianina de la cepa PAO1 se observa una disminución significativa en las células expuestas a ambos inhibidores, donde observamos una disminución del 93% para ANA 200 μ g/mL y del 68% para 5-FU 25; (Gráfica 3, b).

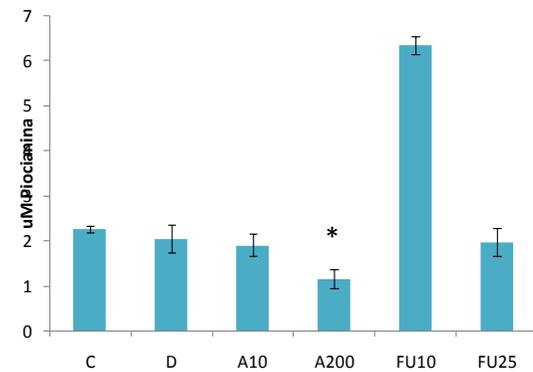
a)PA14



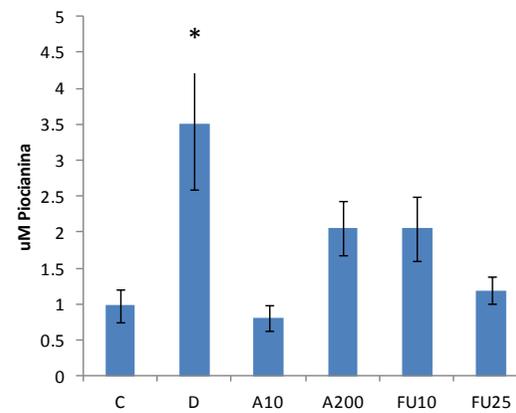
b)PAO1



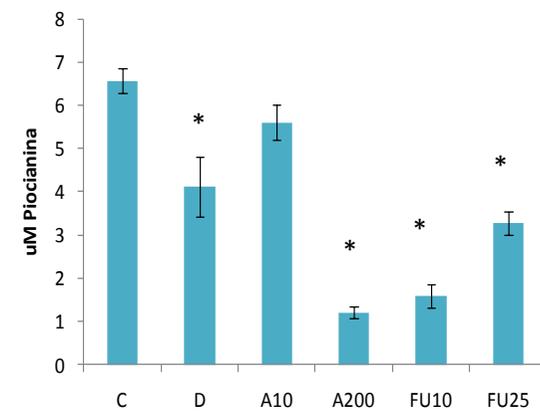
c)17



d)188



e)51U



Gráfica 3. Producción de la fenazina piocianina medida en el sobrenadante tras la adición de los inhibidores del quorum sensing. a) y b) cepas de referencia; a) cepa PA14 tendencia a la disminución de la expresión de la piocianina, para ambos inhibidores y sus respectivas concentraciones muestra inhibición significativa; b) cepa PAO1 para ambos inhibidores y sus respectivas concentraciones muestra inhibición significativa; **c), d) y e) cepas aisladas de muestras clínicas,** c) cepa 17 inhibición significativa con A200 y una activación significativa con FU10; d) cepa 188 tendencia a la activación menos con A10, activación significativa con DMSO; e) cepa 51U tendencia a la inhibición de la expresión de la piocianina, inhibición significativa con DMSO, A200, FU10 y FU25.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

En la cepa 188 la producción de piocianina aumentó al doble por la adición de DMSO (259 %) con respecto a los valores mostrados en el control; eventos que nos indican que para el caso de esta cepa si existe efecto del disolvente, el cual desaparece en presencia de la mezcla de ácidos anacárdicos (Gráfica 3, d).

Para la producción de piocinina en la cepa 51U donde la disminución en los niveles es de 76% a 10 μ M y del 50% a 25 μ M, sugiere un efecto que no es dosis respuesta (Gráfica 3, e).

En la tabla 10 (anexo I) se resume la producción relativa respecto al control de las cepas de referencia y en la tabla 11 (anexo I) de las cepas aisladas de muestras clínicas correspondientes al valor relativo con su desviación estándar.

Evaluación de la producción de ramnolípidos en el sobrenadante después de las 24 h de la adición de los inhibidores de Quorum sensing.

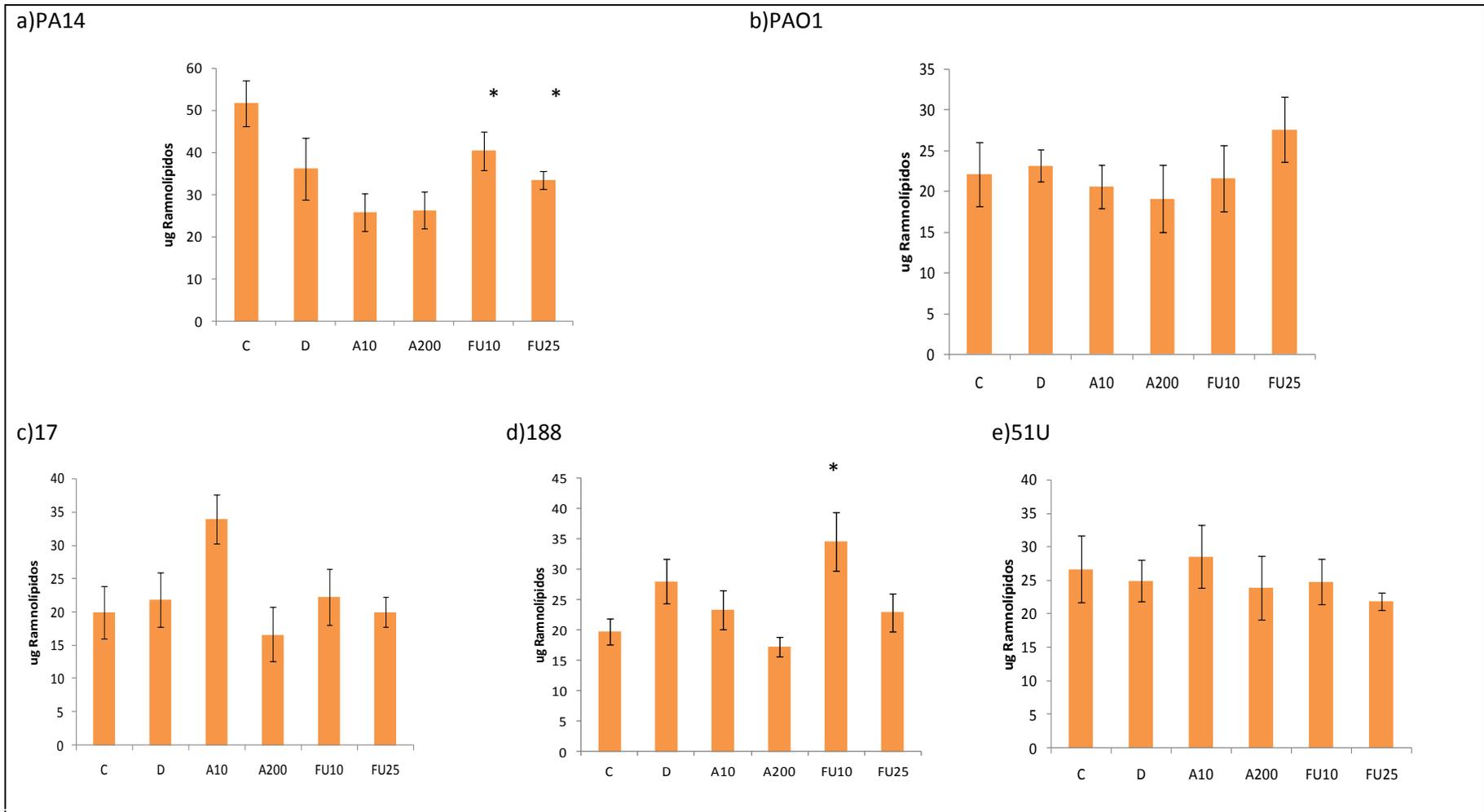
Tras realizar el ensayo por triplicado se obtuvieron los siguientes resultados para la producción de ramnolípidos por las cepas de estudio.

En la gráfica 3 se observa la producción de ramnolípidos de las dos cepas de referencia y de tres cepas aisladas de muestras clínicas, la cantidad de ramnolípidos se obtuvo a partir de una curva patrón y fue normalizada con el crecimiento bacteriano, se presentan las medias y el error estándar de las tres mediciones.

La medición se realizó mediante un método espectrofotométrico cuantificando a 421 nm, como se puede observar, existe una gran variabilidad entre los datos obtenidos de las diferentes cepas.

La metodología utilizada para la cuantificación de los ramnolípidos presentaba altas variaciones en cada medición por ello los valores obtenidos no se consideran suficientemente confiables.

En las tablas 12 y 13 (anexo I) se presentan los valores de la producción remanente de los ramnolípidos con respecto al control, la media de las tres mediciones y su desviación estándar para las cepas de referencia y las cepas aisladas de muestras clínicas respectivamente.



Gráfica 4. Producción de ramnolípidos en las cepas de *P. aeruginosa* determinados por un método espectrofotométrico medido a 421 nm después de una digestión ácida a) y b) cepas de referencia; a) cepa PA14 se observa una tendencia a disminuir la producción de ramnolípidos con la adición de los inhibidores de quorum sensing, la inhibición solo es significativa con el FU como inhibidor a 10 μ M y 25 μ M; b) cepa PAO1 no se observan cambios significativos en la producción de ramnolípidos; c), d) y e) cepas aisladas de muestras clínicas; c) cepa 17 no se observan modificaciones significativa en la producción de ramnolípidos con ácidos anacárdicos 10 μ g/mL se muestra una sobre producción que no es significativa; d) cepa 188 muestra una tendencia a la activación la cual es significativa con FU 10 μ M; e) cepa 51U no presenta modificación en la producción de ramnolípidos.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

Debido a que en algunas cepas se muestra inhibición en la producción de los factores de virulencia a altas concentraciones de los inhibidores pero sin ser estadísticamente significativa, se probaron concentraciones más altas de los inhibidores 400 $\mu\text{g/ mL}$ para ácidos anacárdicos y 50 μM para 5 fluorouracilo; para esta medición únicamente se utilizaron las cepas que mostraban una tendencia, ya sea para inhibición o estimulación (efecto significativo), dichas cepas son: las dos de referencia con ANA y 5FU; y las cepas aisladas de muestras clínicas 9, 17, 440, 526 y 51U con ANA y 5FU; para las cepas 5U y 188 únicamente se evaluó 5FU, ya que con ANA no presentaron ninguna tendencia o efecto significativo.

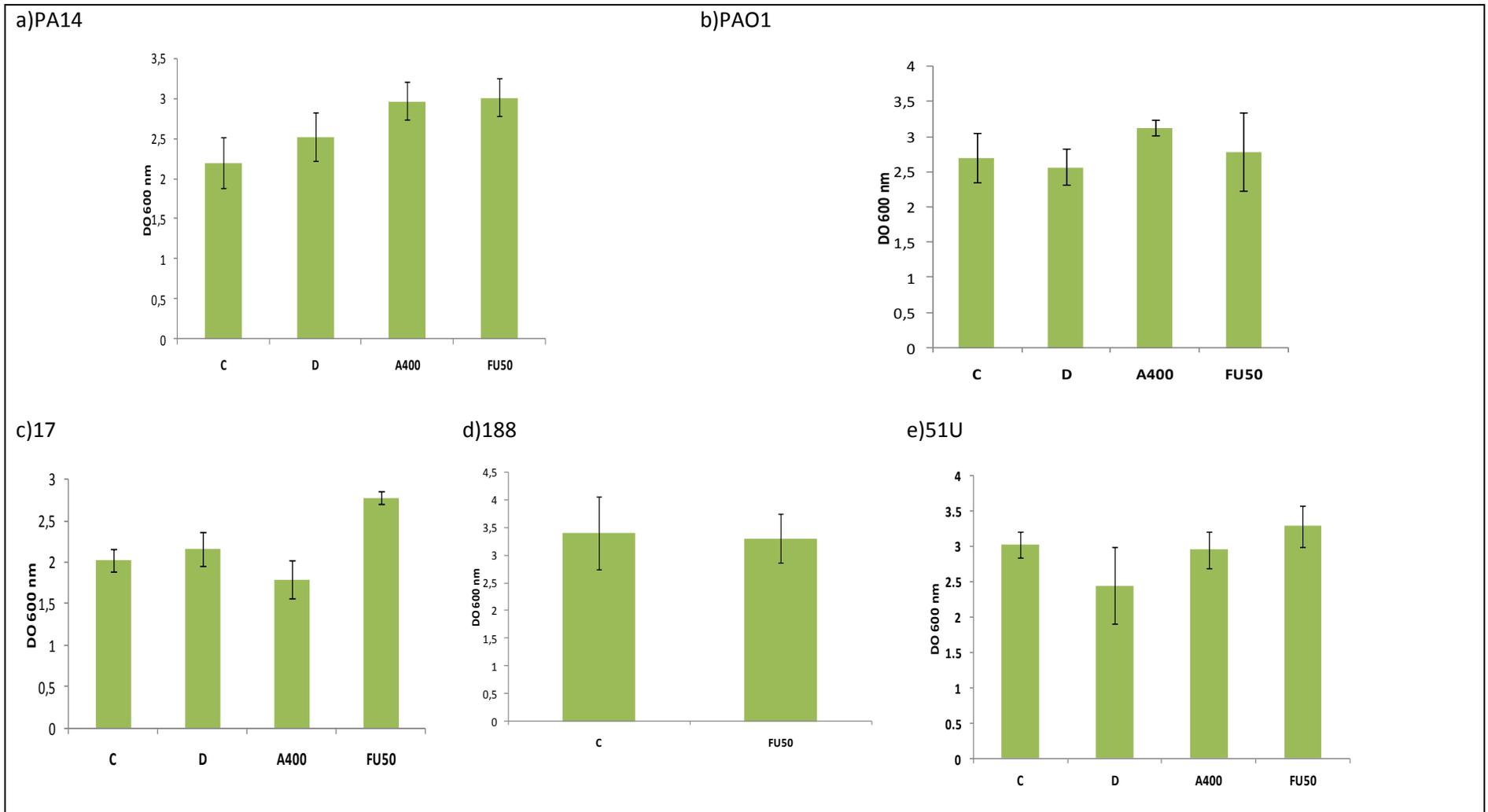
Se utilizó el mismo esquema experimental y condiciones únicamente se aumento la concentración de los inhibidores.

A continuación se muestran los resultados para las cepas con concentraciones altas de inhibidores.

Evaluación del efecto sobre el crecimiento de las cepas de referencia y aisladas de muestras clínicas con la adición de altas concentraciones de los inhibidores del Quorum sensing.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de los inhibidores ácidos anacárdicos y 5 fluorouracilo utilizados a altas concentraciones sobre el crecimiento de las cepas de referencia y las cepas aisladas de muestras clínicas.

Los experimentos se realizaron por triplicado en la gráfica 5 se presentan los valores de crecimiento obtenidos, se presenta el valor de la media y el error estándar de las mediciones.



Gráfica 5. Evaluación del crecimiento de las cepas de referencia y las cepas aisladas de muestras clínicas sometidas a altas concentraciones del inhibidor. a) y b) cepas de referencia, c), d) y e) cepas aisladas de muestras clínicas. No se observan cambios significativos en el crecimiento de las cepas que fueron sometidas a los inhibidores respecto a su control, únicamente la cepa 17 muestra una activación en el crecimiento cuando se le adicionó FU50. Los inhibidores no tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria aún en concentraciones altas.

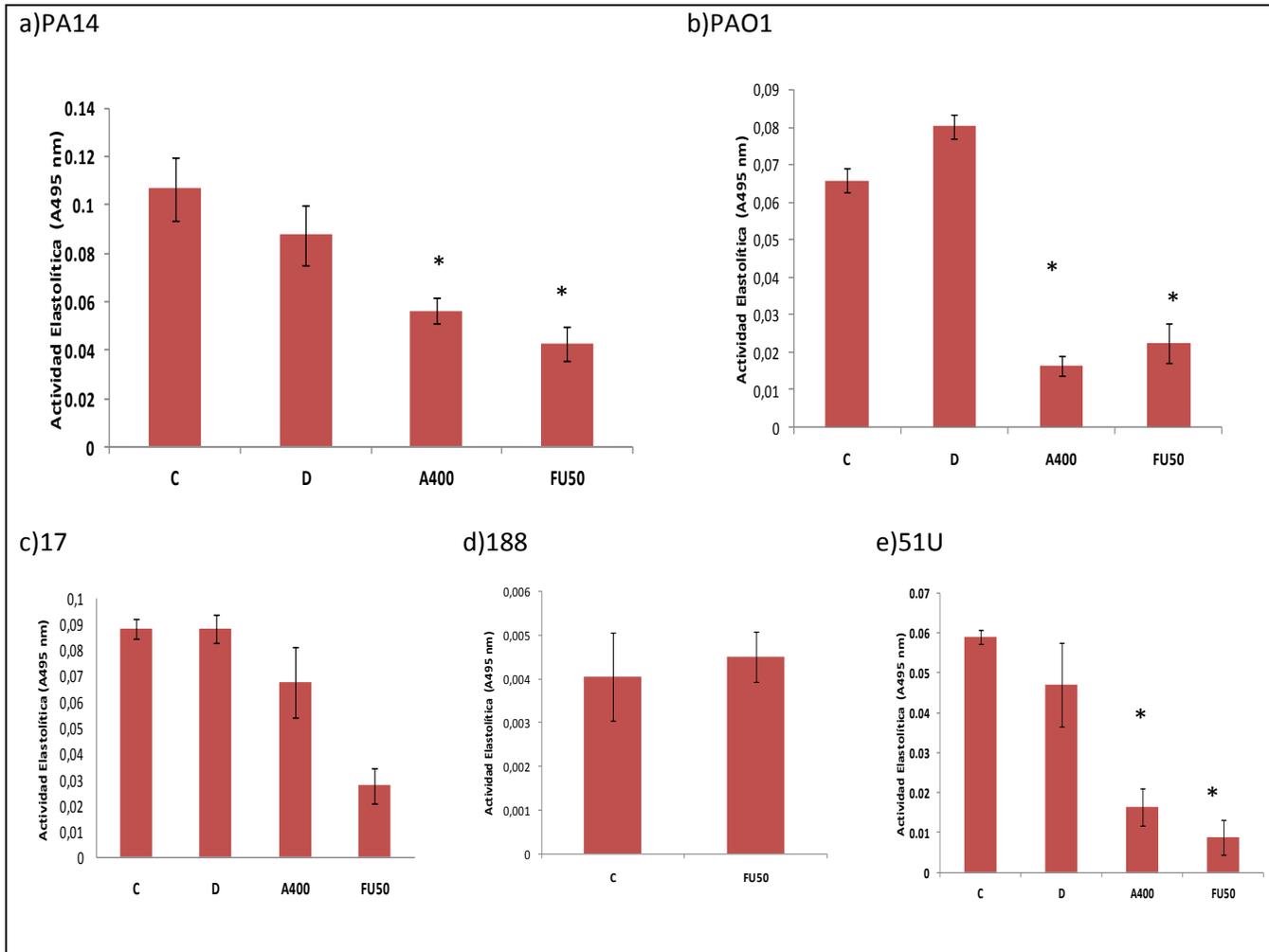
* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

Se calculó en crecimiento remanente respecto al control para las cepas que se expusieron a altas concentraciones del inhibidor; los resultados se muestran en la tabla 14 (anexo I), se presenta la media de los resultados con su desviación estándar.

Evaluación de la actividad elastolítica del sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing a altas concentraciones.

Después de las 24 h de crecimiento sometidas a las condiciones experimentales de las 7 cepas aisladas de muestras clínicas y de las 2 cepas de referencia, se obtuvo su sobrenadante para medir la actividad elastolítica (evaluando la cantidad de elastasa que produjeron) a 495 nm tras 3 h de reacción.

En la gráfica 6 se presentan las cepas de referencia y las 3 cepas representativas de las cepas aisladas de muestras clínicas, los experimentos se realizaron por triplicado, los valores mostrados en las gráficas corresponden a la media y el error estándar de las mediciones, valores normalizados con el crecimiento de la bacteria.



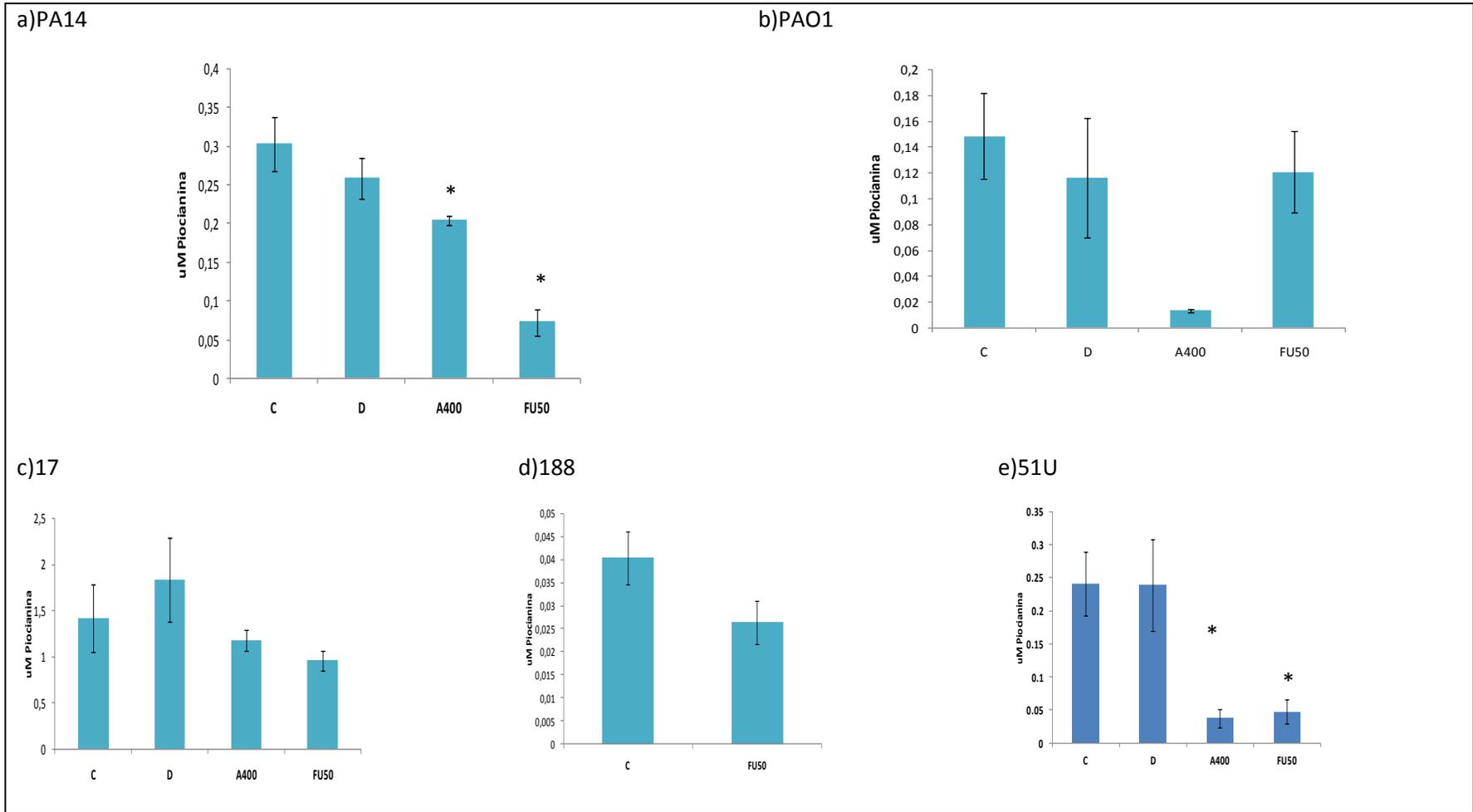
Gráfica 6. . Actividad elastolítica medida a 495 nm y normalizada con el crecimiento de las cepas de referencia y 3 cepas representativas de las aisladas de muestras clínicas. a) y b) cepas de referencia; a) cepa PA14 presenta tendencia a disminuir con la adición de IQS, inhibición estadísticamente significativa para ácidos anacárdicos 400mg/mL (A400) y 5fluorouracilo 50 μM (FU50); b) cepa PAO1 tendencia de inhibición de la actividad elastolítica después de la adición de los IQS, inhibición estadísticamente significativa para ambos inhibidores ANA y 5FU a concentraciones 400 μg/mL y 50 μM respectivamente, el DMSO presenta una activación en la actividad elastolítica. .c), d) y e) cepas de aislados clínicos. C) cepa 17 muestra tendencia a la disminución de la actividad elastolítica sin embargo los cambios no son estadísticamente significativos; d) cepa 188 con la adición de 5FU muestra una ligera activación en la actividad elastolítica, la activación en todos no es estadísticamente significativa; e) cepa 51U tendencia a disminuir tras la adición de ambos inhibidores todas las inhibiciones son estadísticamente significativas. Nótese que con FU50 la inhibición es mayor que con ácidos anacárdicos.

Evaluación de la producción de la fenazina piocianina en el sobrenadante después de la adición de los inhibidores del Quorum sensing a altas concentraciones.

En la tabla 15 (anexo I) se muestran los valores correspondientes a la media de la actividad elastolítica remanente de las cepas de referencia y las cepas aisladas de muestras clínicas respecto al control y sus valores de desviación estándar.

En la gráfica 3 se observan la producción de la piocianina de las cepas de referencia y de las 3 cepas representativas aisladas de muestras clínicas.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los valores que se muestran corresponden a la media y el error estándar de las lecturas en el espectrofotómetro a una λ 388 nm/D.O. a 600 nm.



Gráfica 3. Producción de la fenazina piocianina medida en el sobrenadante tras la adición de los inhibidores del quorum sensing. a) y b) cepas de referencia; a) cepa PA14 tendencia a la disminución de la expresión de la piocianina, para ambos inhibidores y sus respectivas concentraciones muestra inhibición significativa la cual es mayor con fluorouracilo; b) cepa PAO1 presenta inhibición con ambas moléculas sin embargo tras la adición de ácidos anacárdicos a altas concentraciones la inhibición es significativa; **c), d) y e) cepas aisladas de muestras clínicas**, c) cepa 17 tendencia a la inhibición y una activación con DMSO; d) cepa 188 tendencia a la inhibición; e) cepa 51U inhibición de la expresión de la piocianina, inhibición significativa con A400 y FU 50.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

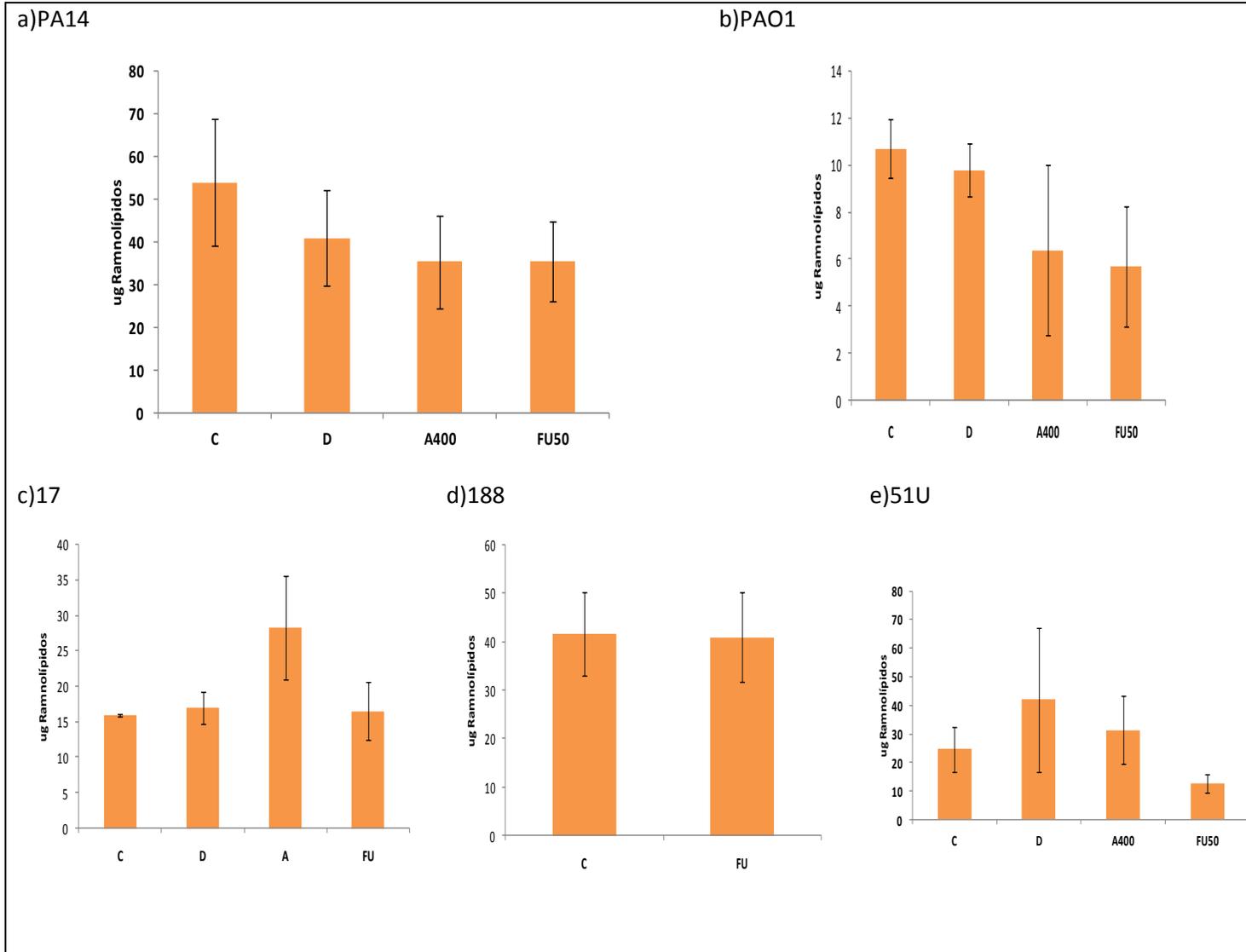
Evaluación de la producción de ramnolípidos en el sobrenadante después de las 24 h de la adición de los inhibidores de Quorum sensing a altas concentraciones.

Tras realizar el ensayo por triplicado se obtuvieron los siguientes resultados para la producción de ramnolípidos por las cepas de estudio.

En la gráfica 8 se observa la producción de ramnolípidos de las dos cepas de referencia y de tres cepas aisladas de muestras clínicas, la cantidad de ramnolípidos se obtuvo a partir de una curva patrón y fue normalizada con el crecimiento bacteriano, se presentan las medias y el error estándar de las tres mediciones.

La medición se realizó mediante un método espectrofotométrico cuantificando a 421 nm.

En la tabla 17 (anexo I) se presentan los valores de la producción remanente relativa de ramnolípidos con respecto al control, la media de las tres mediciones y su desviación estándar para las cepas de referencia y las cepas aisladas de muestras clínicas, respectivamente.



Gráfica 8. Producción de ramnolipidos en las cepas de *P. aeruginosa* determinados por un método espectrofotométrico medido a 421 nm después de una digestión ácida, valores normalizados con el crecimiento. **a) y b) cepas de referencia;** a) cepa PA14 se observa una tendencia a disminuir la producción de ramnolipidos con la adición de los inhibidores de quorum sensing, b) cepa PAO1 se observa la tendencia de inhibición en la producción de ramnolipidos; **c), d) y e) cepas aisladas de muestras clínicas;** c) cepa 17 no se observan modificaciones significativa en la producción de ramnolipidos con ácidos anacárdicos se muestra una sobre producción que no es significativa; d) cepa 188 no presenta modificación en la producción de ramnolipidos; e) cepa 51U no presenta modificación en la producción de ramnolipidos.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

Evaluación de la producción basal de N-(3-oxododecanoil)homoserin lactona en las cepas de referencia y en las cepas aisladas de muestras clínicas.

Se determinó la producción basal del autoinductor N-(3-oxododecanoil)homoserin lactona de las cepas de estudio, el ensayo se realizó por triplicado, la producción del autoinductor fue medida a 421 nm al finalizar la reacción enzimática con la betogalactosidasa.

Para evaluar la funcionalidad de los sistemas de QS, tanto en las cepas de referencia como en las cepas de muestras clínicas, se determinó la producción del AI N-(3-oxododecanoil)homoserin lactona (3OC12-HSL) en los sobrenadantes de los cultivos de las diversas cepas de *P.aeruginosa*.

Debido a que *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria que posee sistemas de censado de Quorum dependiente de AHL (AI), la cual se une al receptor TarR presente en la bacteria y de esta manera coordina sus procesos infecciosos. No obstante este receptor (TarR) puede unirse también a 3OC12-HSL, AI del sistema de QS *las*, presente en *P. aeruginosa*.

El ensayo se realizó en la cepa de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), que no es capaz de producir su AI, y además contiene un gene de β -galactosidasa ligados al gen *traR*, de manera que al unirse el AI a TraR (activador transcripcional en el sistema de QS de *A. tumefaciens*) se activará la producción de β -galactosidasa, cuya actividad es directamente proporcional a la concentración de AI, en este caso 3OC12-HSL.

A continuación se presenta la tabla 19 en la cual se observa la producción cualitativa del autoinductor, las cepas fueron clasificadas en alta, baja y nula producción del autoinductor la cual se determinó únicamente por la intensidad del color que presentaron.

Los resultados únicamente presentan una medición cualitativa del autoinductor, es decir, si se presenta o no, fue determinado en el estado basal de las cepas por lo cual no se conoce como varía su presencia tras la adición de los inhibidores de Quorum sensing.

Inicialmente se consideró que las cepas son funcionales en los sistemas de Quorum sensing por ello se determinó la medición de los factores de virulencia antes presentados. Los resultados de este ensayo sugieren que así lo son a excepción de la cepa 188, aunque hay que considerar que los otros dos sistemas de QS presentes en *P. aeruginosa* no fueron evaluados.

PRODUCCIÓN DEL AUTOINDUCTOR N-(3-OXO-DODECIL) HOMOSERIN LACTONA			
Cepa	Alta	Baja	Nula
PA14	Alta		
PA01	Alta		
9	Alta		
12	Alta		
17	Alta		
23	Alta		
440	Alta		
526	Alta		
5U	Alta		
51U		Baja	
RN			
188			Nula

Tabla 18. Producción de Autoinductor 3OC12-HSL por las cepas de *P. aeruginosa*; cepas de referencia PA14 y PA01 producen autoinductor; en las cepas aisladas de muestras clínicas se observa que la mayoría produce el autoinductor mientras que otras lo producen en niveles bajos o no lo producen. La ausencia de autoinductor en los sobrenadantes de los cultivos sugiere que los sistemas de QS podrían no estar activos en esas cepas. Bioensayo de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4

DISCUSION DE RESULTADOS

Debido a la alta prevalencia de infecciones nosocomiales, la aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos utilizados y la búsqueda novedosa de terapias alternativas que no generen resistencia, existe un especial interés en la evaluación de moléculas que actúen como inhibidores de Quorum sensing en la bacteria *P. aeruginosa* y así mismo mostrar su efectividad en cepas aisladas de muestras clínicas ya que los estudios existentes se han realizado únicamente en cepas de referencia en las cuales es clara su efectividad, sin embargo, en cepas aisladas de muestras clínicas existen pocas evaluaciones. En este estudio se aborda la efectividad de dos posibles inhibidores de Quorum sensing en dos cepas de referencia y en 10 cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes pediátricos, esta es la aportación del presente trabajo en el cual se ha cuantificado la producción de factores de virulencia evaluando la variación de estos después de la adición de 5 fluorouracilo y una mezcla de ácidos anacárdicos obtenida de un extracto hexánico de la corteza de *A. adstringens*.

Las moléculas objeto de estudio se eligieron considerando por una parte que el 5 fluorouracilo muestra actividad inhibitoria en la producción de biopelícula en *P. aeruginosa* (Ueda *et al.*, 2009) en tanto que de la mezcla de ácidos anacárdicos se sabe que su precursor, el ácido salicílico, probablemente se una a LasR inhibiendo al sensor efector del sistema *las*, (Yang *et al.* 2009). Además en nuestro grupo de trabajo se realizaron estudios de interacción molecular tipo “docking” el cual nos indicó que la unión del ácido anacárdico de cadena insaturada de 15 carbonos se puede efectuar con el receptor LasR y esto puede interferir con la interacción del autoinductor con dicho receptor.

Existen diferentes factores de virulencia cuya expresión se ve modificada según el estadio de la infección, para éste estudio se eligieron 3 factores de virulencia los cuales son expresados gracias a dos sistemas de Quorum sensing *las* (elastasa) y *rhl* (piocianina y ramnolípidos).

Se seleccionaron dos cepas de referencia de *P. aeruginosa* la cepa PA14 y la cepa PAO1 sobre las cuales se basan la mayoría de los estudios realizados en esta bacteria; se utilizaron 10 cepas clínicas de las cuales se eligieron únicamente 3 cepas para presentar en las graficas de los resultados. Dicha selección se baso en la distinta actividad que presentan en la producción de factores de virulencia después de la adición de los inhibidores utilizados, teniendo así: 1) la cepa 188 presenta una activación, 2) la cepa 17 que no muestra efecto regular tras la adición de los inhibidores y 3) la cepa 51U en la cual se observa un efecto inhibitorio tras la adición.

Después de seleccionar las cepas de estudio y crecerlas en placas, se prepararon los inhibidores correspondientes, el 5 fluorouracilo en medio acuoso y la mezcla de ácidos anacárdicos en DMSO. La selección de los disolventes de los inhibidores se tomó haciendo la siguiente consideración: el agua porque es un disolvente que permite la solubilidad del 5FU mientras que el DMSO es un disolvente orgánico que favorece la solubilidad de la mezcla de ácidos anacárdicos.

Una vez preparados los inhibidores se sometieron a un rastreo de actividad inhibitoria contra las 12 cepas de *P. aeruginosa*, 10 de ellas aislados de muestras clínicas de pacientes pediátricos mexicanos, esto con la finalidad de encontrar compuestos efectivos para atenuar la virulencia de estos aislados; además de que las cepas que se utilizaron (y en general prácticamente ninguna cepa clínica) no cuentan con evaluaciones de inhibidores, el presente trabajo constituye el primer reporte al respecto.

Los resultados derivados de ésta investigación así como los obtenidos por el grupo de la Dra. Velázquez (tabla 6) muestran que las cepas PA14, PAO1 y 5U son sensibles a todos los antibióticos probados (gentamicina, ciprofloxacino, imipenem y ceftazidima), mientras que las cepas 9, 12, 17, 23, 188, 440, 526 y RN son resistentes a todos los grupos antimicrobianos, por otro lado la cepa 51U mostró únicamente resistencia contra el imipenem y sensibilidad frente a los tres restantes.

De las 12 cepas evaluadas, ambos inhibidores 5FU y ANA fueron inactivos en el crecimiento de todas las bacterias, esto es, ninguna de las concentraciones evaluadas inhibe el crecimiento (Gráfica 1, Tabla 6 y 7). Estos inhibidores no afectan los procesos vitales de la bacteria y por lo tanto, no se ejercerá una alta presión selectiva en la bacteria y se espera que la resistencia contra estos inhibidores no será alta (Rasmussen *et al.*, 2006).

A continuación se analizarán los porcentajes de inhibición de la mezcla de ácidos anacárdicos sobre cada una de las cepas (a partir de la actividad remanente elastolítica, ver Tabla 9 y 10). A una concentración de 10 µg/mL la inhibición es significativa en las cepas PA14 y 9 con valores de 56% y 72% respectivamente. A la concentración de 200 µg/mL se presenta inhibición significativa (entre el 45 y 60% de inhibición) en las cepas PAO1, 5U, 51U y 526. Por otro lado para el caso de 5FU 10 µM se observó inhibición en las cepas PA14 y 440 (62% y 64%, respectivamente), mientras que con 5FU 25 µM para PAO1, 5U, 51U, RN y 526 se observaron inhibiciones entre 70%-99%, siendo la máxima inhibición observada en la cepa 51U. En la cepa 188 (Gráfica 1) se observa que hay una activación de la actividad elastolítica a bajas concentraciones de ambos inhibidores (229% con 5FU). Las cepas no enunciadas no muestran una variabilidad en la actividad elastolítica estadísticamente significativa. Las cepas que presentan comportamiento similar al haber sido expuestas a ambos inhibidores son PAO1, PA14, 5U, 526, 51U y 188.

En la actividad elastolítica el inhibidor que muestra mayor eficacia es el 5FU mostrando los porcentajes mayores de inhibición con la concentración de 25µM en las cepas aisladas de muestras clínicas.

Para el caso de la producción de piocianina se tiene que la inhibición (que se obtuvo a partir de la actividad remanente respecto al control) para extractos de ácidos anacárdicos (tabla 11 y 12) a 10µg/mL muestra valores que oscilan entre 38%- 82% en las cepas PA14, 17 y 51U, utilizando una concentración 200µg/mL se muestra un efecto inhibitorio en las cepas

PAO1 y 526 con 65% y 56% respectivamente, en esta concentración utilizada se observa una activación en la cepa RN del 149% en la producción de piocianina. Por otro lado para el 5FU utilizado a 10 μ M muestra únicamente una inhibición del 76% en la cepa 51U y en las cepas 17,440 y 526 genera una activación con valores de 180%, 349% y 96%, respectivamente. Cuando se probó a 25 μ M inhibió a las cepas PA14 y PAO1 en 34% y 75% (Grafica 3) respectivamente; también muestra activación en esta concentración del 232% en la cepa 23. Para la producción de este factor de virulencia en específico, las únicas cepas que muestran comportamiento similar son PAO1 la cual se inhibe a altas concentraciones de ambos inhibidores, y la 51U inhibida con bajas concentraciones de los inhibidores probados. Las cepas que no se enuncian son aquellas que no mostraron cambios significativos en la producción de piocianina.

La producción de piocianina en las cepas aisladas de muestras clínicas muestra un mayor efecto de activación con respecto a la actividad elastolítica, por lo tanto parece que la producción de elastasa es más sensible a los inhibidores que la de piocianina, la activación en la producción de piocianina se ve más pronunciada cuando se utiliza el 5 fluorouracilo como inhibidor, sin embargo para las cepas de referencia se observa un efecto de inhibición como describe Ueda y cols. (2009,) este factor de virulencia se controla por el sistema *rhl*, mientras que la producción de elastasa esta coordinado por el sistema *las* (Strateva 2011).

Debido a que el Quorum sensing se encarga de controlar jerárquicamente los sistemas *las* y *rhl* se esperaría que la inhibición de los sistemas de QS disminuyera la expresión de elastasa y piocianina coordinadamente, sin embargo, se encontró que la disminución en la producción de un factor de virulencia no se da a la par del otro, lo que sugiere que el QS via *las* y *rhl* no es el único sistema que regula la expresión de los niveles de piocianina y elastasa tal cual como lo indica Berre (2008).

Otro de los factores de virulencia evaluados fue la producción de ramnolípidos coordinado por el sistema *rhl*, sin embargo, los valores obtenidos

de su cuantificación muestran una variabilidad muy grande entre las tres repeticiones por lo tanto los resultados que se obtuvieron no se consideran confiables (Gráfica 4). Para la mezcla de ANA se presenta una inhibición máxima a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la cepa PA14 del 59%, y a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las cepas 9 y 23 con 59% y 55%, respectivamente. En el caso de 5FU presenta una activación en las cepas 188 con 75% y cepa 440 con 53%, las cepas restantes muestran variabilidad en los resultados sin cambios estadísticamente significativos (tablas 13 y 14).

Hay que destacar que el método utilizado para la cuantificación de ramnosa brindaba un fondo muy alto cuando se cuantificó en medio LB, la digestión ácida realizada presentaba una variabilidad en la coloración desde el inicio de la reacción, si bien se utilizaron materiales nuevos para cada cuantificación y no se lograron obtener valores confiables ni estandarizar la técnica, la cuantificación de este factor de virulencia requería tiempo completo por ello las muestras se congelaban hasta su medición, siendo variable el tiempo de congelación entre las muestras lo cual pudo contribuir a la variación obtenida en los resultados.

Para la evaluación de los inhibidores a altas concentraciones se seleccionaron 7 cepas aisladas de muestras clínicas, el criterio de selección se basó en la tendencia que mostraron tras la adición de las concentraciones evaluadas inicialmente y/o cuyos resultados no fueron estadísticamente significativos tras la primera evaluación pero que mostraban inhibición o activación; las cepas utilizadas con altas concentraciones del inhibidor son 5U, 9, 17, 188, 440, 526 y 51U, también se utilizaron ambas cepas de referencia.

Tal como lo muestran los resultados de la Gráfica 5 y Tabla 15 los inhibidores a altas concentraciones, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ácidos anacárdicos y 50 μM para 5 fluorouracilo no afectan el crecimiento de la bacteria resultados que concuerdan con los resultados obtenidos a las concentraciones iniciales, esto nos demuestra el amplio rango de concentración que los inhibidores presentan sin afectar la viabilidad de *P. aeruginosa*.

Cabe señalar que los inhibidores se añadieron en el medio de cultivo desde el inicio del crecimiento cuyos resultados nos indicaron que no afectan directamente al crecimiento. Debido a la forma en que se presenta la infección resultaría complicado adicionar los inhibidores previos al crecimiento de la bacteria, no obstante, estudios actuales se centran en adicionar los posibles inhibidores cuando la bacteria ha crecido hasta una D.O. de 1 a 600 nm densidad celular donde hay un quórum suficiente para la producción de factores de virulencia (Hentzer, Riedel et al. 2002), lo cual se acerca un poco más a la manera en que naturalmente se da la infección y las terapias antipseudomonales.

En el caso de la actividad elastolítica en las cepas de referencia se mantienen las inhibiciones a altas concentraciones de ambos inhibidores (Gráfica 6 y Tabla 15), para la cepa PA14 el 47% corresponde a la inhibición con ANA y el 60% con 5FU; en comparación con las concentraciones iniciales se muestra una mayor inhibición en la producción de elastasa cuando los inhibidores se adicionan a altas concentraciones, por lo tanto en la cepa PAO1 se presenta una inhibición del 75% con ANA 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y del 66% con 5FU 50 μM siendo únicamente los ácidos anacárdicos más eficaces a altas concentraciones como inhibidores de la actividad elastolítica, en la cepa 440 son más eficaces ambos inhibidores a altas concentraciones con un 95% para ANA y 85% con 5FU respectivamente. Finalmente para la cepa 5U únicamente se probó 5FU con una inhibición del 66%, siendo este inhibidor más eficaz a 25 μM en las cepas restantes no se observó efecto estadísticamente significativo.

En la producción de piocianina (Gráfica 7 y Tabla 16) la cepa PA14 muestra una mayor inhibición a concentraciones bajas ya que la inhibición con ANA es del 33%, sin embargo, el 5FU con 76% de inhibición es más eficaz para la concentración alta; en la cepa PAO1 se inhibe el 91% con ácidos anacárdicos a altas concentraciones no obstante, es más eficaz a concentraciones de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la cepa 5U se inhibe el 36% con 5FU siendo la máxima inhibición alcanzada; en la cepa 526 la inhibición máxima se

alcanza con ANA 400 con un valor del 76%, las inhibiciones estadísticamente significativas en la producción de pirocianina son menos frecuentes a concentraciones altas que a las concentraciones inicialmente utilizadas.

La producción de ramnolípidos no se ve afectada estadísticamente a concentraciones altas (Gráfica 8 y Tabla 17), únicamente en la cepa 5U se inhibe el 30% con FU 50 μ M en las cepas restantes no se muestra actividad tras la adición de los inhibidores.

De acuerdo con los resultados que se presentan en la Tabla 18, en la evaluación realizada para determinar la presencia del autoinductor 3OC12-HSL, la única cepa que no produce autoinductor es 188, las cepas 51U y RN tienen baja producción y las cepas PA14, PAO1, 17, 23, 440, 526, 5U, 12 y 9 producen autoinductor, la determinación se realizó cualitativamente.

Cabe destacar que el 10% de las cepas aisladas de muestras clínicas utilizadas en el presente estudio no produce autoinductor detectable por el método utilizado y el 20% de las cepas reduce su producción, estos porcentajes son altos en comparación con otros estudios en los cuales únicamente el 2% muestra mutaciones o deficiencias en el QS (Schaber, Carty et al. 2004), sugiriendo que estas mutaciones son más frecuentes en la población de cepas estudiadas.

El objetivo de la evaluación de la producción del autoinductor fue determinar si los sistemas de Quorum sensing son funcionales en las cepas evaluadas y si la ausencia de producción del autoinductor favorece la inhibición de los factores de virulencia con las moléculas probadas, sin embargo, se requieren más experimentos para establecer la conexión.

Con los resultados obtenidos y mostrados anteriormente se encontró que en las cepas de referencia la mezcla de ácidos anacárdicos y el 5 fluorouracilo suelen mostrar una actividad inhibitoria en los fenotipos cuantificados en el caso de elastasa y pirocianina, por otro lado en las cepas aisladas de muestras clínicas se observa un comportamiento variado en la producción de los factores de virulencia demostrando la diferencia existente en

el comportamiento de los inhibidores en las cepas de referencia y las aisladas de muestras clínicas (anexo II), por ello es importante que las evaluaciones de los posibles inhibidores de Quorum sensing y moléculas que quieran ser evaluadas como terapias alternativas contra *P. aeruginosa* no solo se realicen en cepas de referencia ya que se comportan de manera distinta a las cepas aisladas de muestras clínicas.

Un problema que se presentó en éste estudio estudio es que el solvente de los extractos de ácidos anacárdicos (DMSO) cuando se le adicionaba a las cepas mostraba en algunos casos activación en la producción de los factores de virulencia, es necesario buscar otro solvente que no afecte en la producción de los factores de virulencia.

En el caso de las variaciones encontradas por el método de ramnosa en la cuantificación de ramnolípidos, se pueden probar otras metodologías o utilizar un medio de cultivo distinto en el cual la recuperación de estos biosurfactantes sea mayor.

CONCLUSIONES

- Ambos inhibidores son eficaces en las cepas de referencia inhibiendo significativamente la producción de elastasa y piocianina.
- En cepas aisladas de muestras clínicas los inhibidores muestran efecto variable (inhibición, activación y sin respuesta) sobre la producción de los factores de virulencia cuantificados.
- La adición de 5 fluorouracilo (10, 25 y 50 μM) y la mezcla de ácidos anacárdicos (10,200 y 400 $\mu\text{g/mL}$) no afecta el crecimiento en ninguna de las cepas evaluadas ya sea las de referencia o las aisladas de muestras clínicas.
- La aparición de resistencia contra estos inhibidores será reducida debido a que no comprometen la viabilidad de *P. aeruginosa*.
- Aumentar la concentración de las moléculas probadas no favorece el efecto inhibitorio en todas las cepas.
- Los inhibidores muestran una mayor eficacia en la inhibición de la elastasa en comparación con los otros factores de virulencia evaluados.
- La cepa 188 no es afectada por la presencia de los inhibidores, no produce autoinductor 3-oxo-dodecilhomoserin lactona y tras su adición muestra una activación en la producción de factores de virulencia.
- El presente trabajo constituye el primer reporte acerca de la evaluación de los inhibidores (5-FU y ANA) en cepas aisladas de muestras clínicas.

PERSPECTIVAS

- Realizar un nuevo estudio colocando los inhibidores cuando las cepas han crecido hasta una D.O. determinada.
- Evaluar la producción de los factores de virulencia según el sitio del cual fue aislada.
- Evaluar si la inhibición de los factores de virulencia se favorece por el sitio del cual fue aislado.
- Estandarizar una metodología para la evaluación de los ramnolípidos.
- Cuantificar la producción de autoinductor como respuesta a la adición de los inhibidores.
- Determinar si los tres componentes de Quorum sensing están activos en cada una de las cepas clínicas.
- Evaluar el uso de otro disolvente para la mezcla de ácidos anacárdicos ya que el DMSO mostró efecto para algunas cepas.

ANEXO I Actividad Remanente de los factores de virulencia en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*

A continuación se presentan las tablas de la actividad remanente de los factores de virulencia cuantificados para cada cepa, la actividad remanente se calculo respecto al control en el cual se considera que el control es 1.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Crecimiento		
PA14	DMSO	0.88	±	0.09
	A10	0.86	±	0.09
	A200	0.90	±	0.13
	FU10	0.95	±	0.03
	FU25	0.97	±	0.04
PA01	DMSO	1.08	±	0.20
	A10	1.10	±	0.11
	A200	1.16	±	0.08
	FU10	1.18	±	0.22
	FU25	1.02	±	0.08

Tabla 7. Crecimiento relativo respecto al control de las cepas de referencia. El crecimiento no se ve afectado tras 24h/37°C de incubación a las condiciones experimentales en presencia de los inhibidores de quorum sensing.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Crecimiento		
PA14	DMSO	0.88	±	0.09
	A10	0.86	±	0.09
	A200	0.90	±	0.13
	FU10	0.95	±	0.03
	FU25	0.97	±	0.04
PA01	DMSO	1.08	±	0.20
	A10	1.10	±	0.11
	A200	1.16	±	0.08
	FU10	1.18	±	0.22
	FU25	1.02	±	0.08
9	DMSO	0.98	±	0.08
	A10	1.06	±	0.12
	A200	1.14	±	0.09
	FU10	1.21	±	0.13
	FU25	1.06	±	0.07
12	DMSO	0.70	±	0.14
	A10	0.74	±	0.10
	A200	0.78	±	0.12
	FU10	0.72	±	0.10
	FU25	0.74	±	0.12
17	DMSO	0.96	±	0.12
	A10	1.00	±	0.13
	A200	1.17	±	0.16
	FU10	1.07	±	0.20
	FU25	1.15	±	0.16
23	DMSO	0.99	±	0.17
	A10	0.99	±	0.19
	A200	1.12	±	0.20
	FU10	1.00	±	0.16
	FU25	0.68	±	0.30
188	DMSO	0.95	±	0.16
	A10	1.00	±	0.18
	A200	1.31	±	0.17
	FU10	1.11	±	0.20
	FU25	1.06	±	0.18
440	DMSO	1.30	±	0.30
	A10	1.42	±	0.12
	A200	1.57	±	0.13
	FU10	1.11	±	0.20
	FU25	0.94	±	0.18
526	DMSO	1.23	±	0.32
	A10	1.03	±	0.18
	A200	1.51	±	0.22
	FU10	1.09	±	0.15
	FU25	1.05	±	0.17
RN	DMSO	0.96	±	0.24
	A10	0.82	±	0.23
	A200	1.12	±	0.28
	FU10	1.00	±	0.23
	FU25	1.03	±	0.22
5U	DMSO	1.04	±	0.12
	A10	1.06	±	0.10
	A200	0.95	±	0.08
	FU10	0.98	±	0.09
	FU25	1.04	±	0.06
51U	DMSO	1.09	±	0.17
	A10	1.03	±	0.13
	A200	1.25	±	0.18
	FU10	1.09	±	0.13
	FU25	1.09	±	0.12

Tabla 8. **Crecimiento relativo respecto al control de las cepas aisladas de muestras clínicas.** El crecimiento no se ve afectado tras 24h/37°C de incubación a las condiciones experimentales en presencia de los inhibidores de quorum sensing.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Elastasa		
PA14	DMSO	1.11	±	0.13
	A10	0.44	±	0.06
	A200	0.63	±	0.07
	FU10	0.38	±	0.21
	FU25	0.66	±	0.12
PA01	DMSO	0.84	±	0.13
	A10	0.54	±	0.12
	A200	0.35	±	0.06
	FU10	0.34	±	0.11
	FU25	0.25	±	0.07

Tabla 9. Valores de la actividad elastolítica remanente respecto al control de las cepas de referencia, medición realizada en los sobrenadantes tras 3 h de reacción cuantificada mediante un método espectrofotométrico a 495 nm normalizado con el crecimiento de la bacteria. . Los valores en negrito son estadísticamente significativos.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Elastasa		
PA14	DMSO	1.11	±	0.13
	A10	0.44	±	0.06
	A200	0.63	±	0.07
	FU10	0.38	±	0.21
	FU25	0.66	±	0.12
PA01	DMSO	0.84	±	0.13
	A10	0.54	±	0.12
	A200	0.35	±	0.06
	FU10	0.34	±	0.11
	FU25	0.25	±	0.07
9	DMSO	0.74	±	0.15
	A10	0.28	±	0.05
	A200	0.35	±	0.12
	FU10	0.94	±	0.24
	FU25	1.49	±	0.21
12	DMSO	0.95	±	0.41
	A10	0.79	±	0.24
	A200	1.39	±	0.41
	FU10	0.87	±	0.23
	FU25	0.81	±	0.26
17	DMSO	0.97	±	0.17
	A10	0.90	±	0.17
	A200	0.93	±	0.13
	FU10	0.66	±	0.14
	FU25	0.71	±	0.12
23	DMSO	1.47	±	0.45
	A10	1.01	±	0.19
	A200	1.06	±	0.32
	FU10	1.14	±	0.17
	FU25	1.25	±	0.13
188	DMSO	4.20	±	1.08
	A10	1.29	±	0.11
	A200	0.65	±	0.16
	FU10	3.29	±	0.55
	FU25	1.70	±	0.35
440	DMSO	1.09	±	0.27
	A10	0.75	±	0.25
	A200	0.63	±	0.21
	FU10	0.26	±	0.08
	FU25	0.34	±	0.10
526	DMSO	0.94	±	0.10
	A10	1.24	±	0.09
	A200	0.53	±	0.08
	FU10	0.53	±	0.08
	FU25	0.40	±	0.04
RN	DMSO	0.46	±	0.09
	A10	0.49	±	0.10
	A200	0.56	±	0.15
	FU10	0.50	±	0.14
	FU25	0.05	±	0.05
5U	DMSO	0.68	±	0.07
	A10	0.84	±	0.05
	A200	0.55	±	0.06
	FU10	0.34	±	0.05
	FU25	0.30	±	0.04
51U	DMSO	0.32	±	0.11
	A10	0.43	±	0.14
	A200	0.37	±	0.14
	FU10	0.39	±	0.12
	FU25	0.01	±	0.01

Tabla 10. Valores de la actividad elastolítica remanente respecto al control de las cepas aisladas de muestras clínicas, medición realizada en los sobrenadantes tras 3 h de reacción cuantificada mediante un método espectrofotométrico a 495 nm. Los valores en negrito son estadísticamente significativos. Las cepas 12, 17 y 23 no muestran actividad significativa, la cepa 9 muestran inhibición significativa de la actividad elastolítica con la adición de ANA, la cepa 440 muestra inhibición únicamente con 5FU, la cepa 526 tiene inhibición con ANA a altas concentraciones y con 5FU para ambas concentraciones utilizadas, la cepa RN presenta inhibición con DMSO y 5FU a altas concentraciones con inhibición casi completa, la cepa 5U no presenta alguna actividad con A10 a la concentración alta de ANA 200, DMSO y ambas concentraciones de 5FU se inhibe, la cepa 188 presenta activación con DMSO y FU10, 51U presenta inhibición con ambos inhibidores a las concentraciones utilizadas.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Piocianina
PA14	DMSO	0.60 ± 0.04
	A10	0.42 ± 0.06
	A200	0.69 ± 0.07
	FU10	0.51 ± 0.03
	FU25	0.29 ± 0.03
PAO1	DMSO	1.11 ± 0.13
	A10	0.27 ± 0.06
	A200	0.07 ± 0.01
	FU10	0.43 ± 0.09
	FU25	0.32 ± 0.03

Tabla 11. Producción de la fenazina Piocianina en las cepas de referencia relativas al control , en ambas cepas se muestra inhibición de la expresión tras la adición de los IQS

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Piocianina		
PA14	DMSO	0.60	±	0.04
	A10	0.42	±	0.06
	A200	0.69	±	0.07
	FU10	0.51	±	0.03
	FU25	0.29	±	0.03
PA01	DMSO	1.11	±	0.13
	A10	0.27	±	0.06
	A200	0.07	±	0.01
	FU10	0.43	±	0.09
	FU25	0.32	±	0.03
9	DMSO	0.95	±	0.26
	A10	0.99	±	0.22
	A200	1.25	±	0.33
	FU10	0.77	±	0.19
	FU25	0.50	±	0.14
12	DMSO	1.16	±	0.27
	A10	1.46	±	0.34
	A200	1.07	±	0.24
	FU10	0.97	±	0.20
	FU25	1.04	±	0.22
17	DMSO	0.91	±	0.14
	A10	0.84	±	0.11
	A200	0.52	±	0.09
	FU10	2.80	±	0.12
	FU25	0.87	±	0.14
23	DMSO	2.31	±	0.39
	A10	1.53	±	0.23
	A200	1.35	±	0.31
	FU10	1.39	±	0.27
	FU25	3.32	±	1.01
188	DMSO	3.59	±	1.26
	A10	0.83	±	0.26
	A200	2.11	±	0.63
	FU10	2.10	±	0.68
	FU25	1.22	±	0.35
440	DMSO	0.42	±	0.25
	A10	1.26	±	0.47
	A200	0.62	±	0.23
	FU10	4.49	±	1.49
	FU25	1.86	±	0.60
526	DMSO	0.27	±	0.13
	A10	0.62	±	0.08
	A200	0.44	±	0.11
	FU10	1.96	±	0.26
	FU25	1.19	±	0.14
RN	DMSO	3.09	±	0.70
	A10	0.74	±	0.11
	A200	2.49	±	0.30
	FU10	0.88	±	0.11
	FU25	1.13	±	0.10
5U	DMSO	0.70	±	0.13
	A10	0.75	±	0.16
	A200	0.59	±	0.11
	FU10	0.84	±	0.16
	FU25	0.72	±	0.15
51U	DMSO	0.63	±	0.11
	A10	0.85	±	0.07
	A200	0.18	±	0.02
	FU10	0.24	±	0.04
	FU25	0.50	±	0.05

Tabla 12. Producción de la fenazina piocianina en las cepas aisladas de muestras clínicas relativas al control, las cepas 9,12 y 5U no presentan actividad alguna tras la adición de los IQS, las cepas que muestran inhibición significativa en la producción de piocianina son la cepa 17 y la cepa 526 con A200 y la cepa 51U con DMSO, A200 y FU 10 y FU 25, las cepas que se activan significativamente son la cepa 23 con FU25, la cepa 188 con DMSO, la cepa 526 con FU10 y FU25 y por ultimo la cepa RN con DMSO y A200.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Ramnolípidos		
PA14	DMSO	0.70	±	0.16
	A10	0.50	±	0.10
	A200	0.51	±	0.10
	FU10	0.78	±	0.12
	FU25	0.65	±	0.08
PA01	DMSO	1.05	±	0.21
	A10	0.93	±	0.21
	A200	0.87	±	0.24
	FU10	0.98	±	0.26
	FU25	1.25	±	0.29

Tabla 13. Producción de ramnolípidos en las cepas de referencia, producción remanente relativa respecto al control, únicamente se observa una disminución en la producción de ramnolípidos respecto al control con los ácidos anacárdicos a las concentraciones utilizadas.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Ramnolípidos		
PA14	DMSO	0.70	±	0.16
	A10	0.50	±	0.10
	A200	0.51	±	0.10
	FU10	0.78	±	0.12
	FU25	0.65	±	0.08
PA01	DMSO	1.05	±	0.21
	A10	0.93	±	0.21
	A200	0.87	±	0.24
	FU10	0.98	±	0.26
	FU25	1.25	±	0.29
9	DMSO	0.54	±	0.09
	A10	0.66	±	0.03
	A200	0.41	±	0.06
	FU10	1.05	±	0.08
	FU25	1.04	±	0.08
12	DMSO	1.24	±	0.33
	A10	1.44	±	0.42
	A200	1.21	±	0.38
	FU10	1.60	±	0.46
	FU25	1.09	±	0.27
17	DMSO	1.09	±	0.30
	A10	1.70	±	0.38
	A200	0.83	±	0.26
	FU10	1.11	±	0.30
	FU25	1.00	±	0.23
23	DMSO	0.51	±	0.09
	A10	0.70	±	0.06
	A200	0.45	±	0.06
	FU10	0.73	±	0.07
	FU25	0.82	±	0.20
188	DMSO	1.42	±	0.24
	A10	1.18	±	0.21
	A200	0.87	±	0.13
	FU10	1.75	±	0.31
	FU25	1.16	±	0.20
440	DMSO	1.55	±	0.30
	A10	0.96	±	0.18
	A200	1.10	±	0.22
	FU10	0.95	±	0.20
	FU25	1.53	±	0.31
526	DMSO	0.75	±	0.20
	A10	1.20	±	0.24
	A200	0.80	±	0.15
	FU10	0.99	±	0.25
	FU25	0.98	±	0.21
RN	DMSO	1.12	±	0.25
	A10	1.16	±	0.24
	A200	0.85	±	0.18
	FU10	0.83	±	0.22
	FU25	1.00	±	0.26
5U	DMSO	1.17	±	0.10
	A10	0.80	±	0.08
	A200	1.21	±	0.23
	FU10	1.15	±	0.16
	FU25	1.04	±	0.10
51U	DMSO	0.93	±	0.21
	A10	1.07	±	0.26
	A200	0.89	±	0.24
	FU10	0.93	±	0.21
	FU25	0.82	±	0.16

Tabla 14. Producción de ramnolípidos en las cepas aisladas de muestras clínicas producción remanente relativa respecto al control, en las cepas 12, 17, 526, RN, 5U y 51U no se observa modificación alguna en la producción de ramnolípidos, la cepa 9 muestra inhibición significativa con DMSO y ácidos anacárdicos a ambas concentraciones, la cepa 23 muestra inhibición con DMSO y ácidos anacárdicos 200 µg/mL, la cepa 188 muestra activación con FU10 y por último la cepa 440 muestra activación con DMSO y FU25 todos estos cambios son estadísticamente significativos.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Crecimiento		
PA14	DMSO	1.15	±	0.21
	A400	1.35	±	0.22
	FU50	1.37	±	0.22
PA01	DMSO	0.95	±	0.15
	A400	1.16	±	0.15
	FU50	1.03	±	0.24
5U	FU50	1.12	±	0.09
9	DMSO	0.71	±	0.16
	A400	0.92	±	0.19
	FU50	0.96	±	0.28
17	DMSO	1.07	±	0.12
	A400	0.88	±	0.13
	FU50	1.37	±	0.10
188	FU50	0.97	±	0.23
440	DMSO	0.92	±	0.22
	A400	1.16	±	0.27
	FU50	0.72	±	0.35
526	DMSO	0.93	±	0.13
	A400	0.93	±	0.10
	FU50	1.19	±	0.13
51U	DMSO	0.81	±	0.19
	A400	0.98	±	0.10
	FU50	1.09	±	0.12

Tabla 15 Crecimiento remanente de las cepas evaluadas a altas concentraciones de los inhibidores, En la cepa 17 se observa un 37% de aumento en el crecimiento cuando se adicionó 5 fluorouracilo 50mM, indicando que es un activador del crecimiento, para las cepas restantes no se observan cambios inhibitorios o activadores estadísticamente significativos

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Elastasa
PA14	DMSO	0.82 ± 0.16
	A400	0.53 ± 0.08
	FU50	0.40 ± 0.08
PAO1	DMSO	1.22 ± 0.08
	A400	0.25 ± 0.04
	FU50	0.34 ± 0.08
5U	FU50	0.34 ± 0.19
9	DMSO	0.62 ± 0.16
	A400	1.60 ± 0.33
	FU50	0.17 ± 0.04
17	DMSO	1.00 ± 0.07
	A400	0.77 ± 0.16
	FU50	0.31 ± 0.08
188	FU50	0.41 ± 0.23
440	DMSO	0.61 ± 0.08
	A400	0.05 ± 0.01
	FU50	0.15 ± 0.04
526	DMSO	1.15 ± 0.41
	A400	0.93 ± 0.41
	FU50	0.48 ± 0.19
51U	DMSO	0.80 ± 0.18
	A400	0.28 ± 0.08
	FU50	0.15 ± 0.07

Tabla 16. Valores de la actividad elastolítica remanente respecto al control de las cepas de referencia y las cepas aisladas de muestras clínicas, medición realizada en los sobrenadantes tras 3 h de reacción cuantificada mediante un método espectrofotométrico a 495 nm normalizadas con el crecimiento. Los valores en negrito son estadísticamente significativos respecto al control. Las cepas de referencia muestran ambas inhibición con las altas concentraciones probadas, las cepas 526 y 9 no muestran actividad significativa, la cepa 5U muestra inhibición significativa de la actividad elastolítica con la adición de FU 50, la cepa 440 muestra inhibición con ambos inhibidores y con el DMSO, la mayor inhibición la presenta con ácidos anacárdicos, la cepa 17 tiene una tendencia a la inhibición, sin embargo, la máxima inhibición la presenta con fluorouracilo, la cepa 188 presenta inhibición pero no es estadísticamente significativa, la cepa 51U muestra una inhibición para ambos, teniendo una mayor

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Piocianina
PA14	DMSO	0.85 ± 0.13
	A400	0.67 ± 0.08
	FU50	0.24 ± 0.06
PA01	DMSO	0.78 ± 0.36
	A400	0.09 ± 0.02
	FU50	0.81 ± 0.28
5U	FU50	0.64 ± 0.07
9	DMSO	0.72 ± 0.50
	A400	0.68 ± 0.58
	FU50	0.21 ± 0.11
17	DMSO	1.30 ± 0.47
	A400	0.83 ± 0.23
	FU50	0.67 ± 0.19
188	FU50	0.65 ± 0.15
440	DMSO	0.95 ± 0.25
	A400	1.03 ± 0.34
	FU50	2.75 ± 1.74
526	DMSO	1.08 ± 0.35
	A400	0.24 ± 0.07
	FU50	1.48 ± 0.27
51U	DMSO	0.99 ± 0.35
	A400	0.15 ± 0.06
	FU50	0.20 ± 0.08

Tabla 17 producción remanente de piocianina relativa respecto al control de las cepas de estudio los valores corresponden a la media con su desviación estándar. En la cepa de referencia PA14 se muestra inhibición tanto para 5 fluorouracilo como para ácidos anacárdicos a altas concentraciones, en la cepa PA01 la inhibición se logra únicamente con ácidos anacárdicos, las cepas que no muestran cambios estadísticamente significativos son 9, 17, 188 y 440, en la cepa 526 la inhibición se realiza con ácidos anacárdicos y para la cepa 51U ambos funcionan como inhibidores de la producción de Piocianina.

CEPA	INHIBIDOR/CONCENTRACIÓN	Ramrólpidos
PA14	DMSO	0.76 ± 0.30
	A400	0.66 ± 0.27
	FU50	0.66 ± 0.25
PAO1	DMSO	0.91 ± 0.15
	A400	0.60 ± 0.35
	FU50	0.53 ± 0.25
5U	FU50	0.70 ± 0.09
9	DMSO	1.10 ± 0.11
	A400	0.78 ± 0.12
	FU50	0.84 ± 0.18
17	DMSO	1.06 ± 0.14
	A400	1.77 ± 0.46
	FU50	1.04 ± 0.25
188	FU50	0.98 ± 0.30
440	DMSO	0.32 ± 0.15
	A400	1.20 ± 0.50
	FU50	0.68 ± 0.33
526	DMSO	1.01 ± 0.09
	A400	0.85 ± 0.12
	FU50	0.65 ± 0.23
51U	DMSO	1.71 ± 1.16
	A400	1.27 ± 0.63
	FU50	0.51 ± 0.21

Tabla 18. Producción de ramrólpidos en las cepas aisladas de muestras clínicas producción relativa respecto al control, en las cepas PA14, PAO1, 9, 17, 188, 440, ,526, y 51U no se observa modificación alguna en la producción de ramrólpidos, la cepa 5U muestra inhibición significativa con fluorouracilo.

ANEXO II Determinación de factores de virulencia en cepas de referencia y cepas aisladas de muestras clínicas

A continuación se presentan las gráficas para cada una de las cepas, en cada Gráfico se observa: a) el crecimiento medido a 600 nm, b) la actividad elastolítica medida a 495 nm normalizada con el crecimiento, c) la producción de pirocianina y d) la producción de ramnolípidos normalizadas por el crecimiento. Primero se presentan las cepas de referencia y después las gráficas correspondientes a las cepas aisladas de muestras clínicas y posteriormente las cepas en donde se evaluaron los inhibidores a altas concentraciones.

Se presenta como varía la producción de los inhibidores en cada cepa después de la adición de los inhibidores.

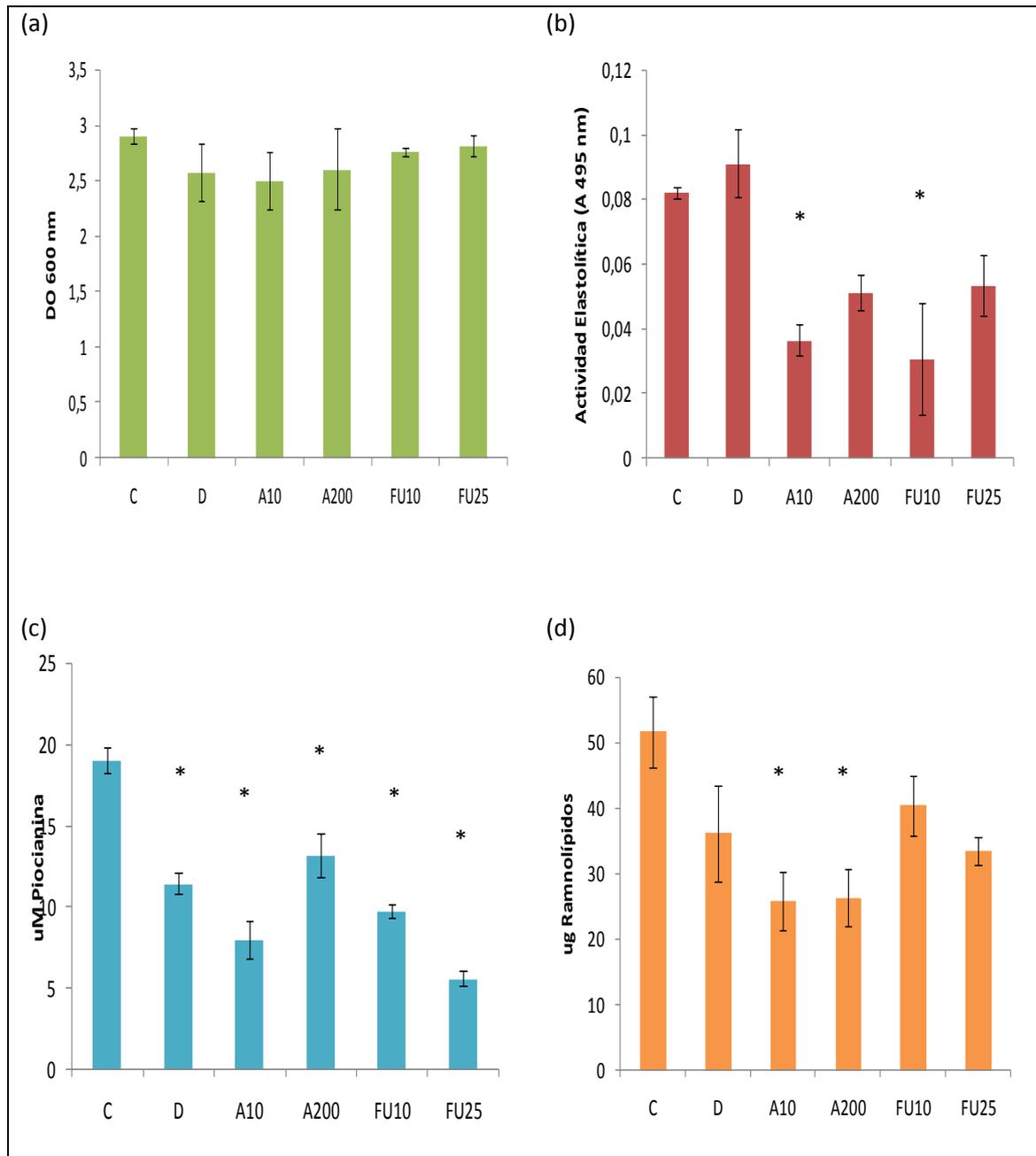


Gráfico 1 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por PA14.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pirocianina. Concentraciones de Pirocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

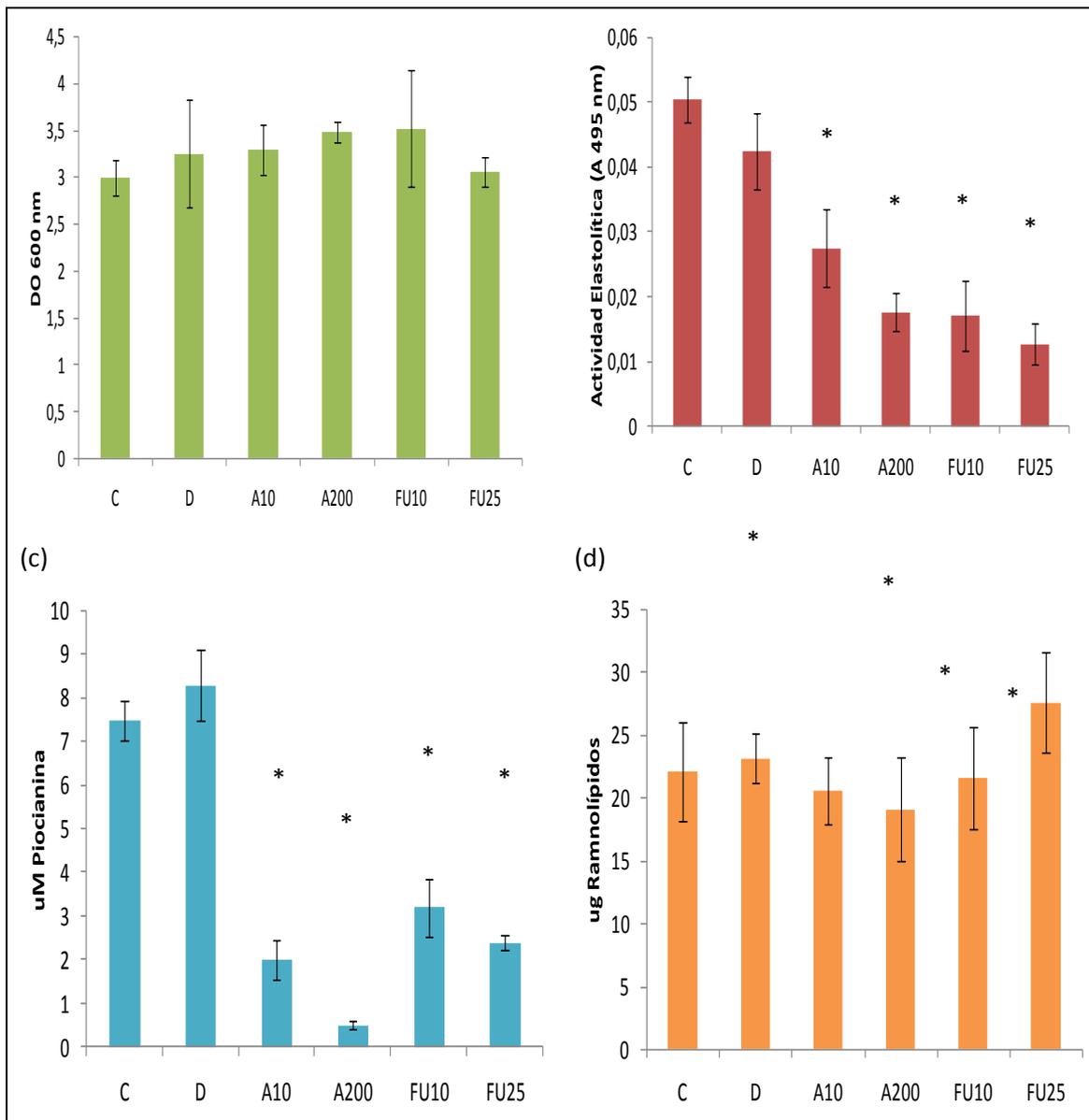


Gráfico 2 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por PAO1. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de píocianina. Concentraciones de Píocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

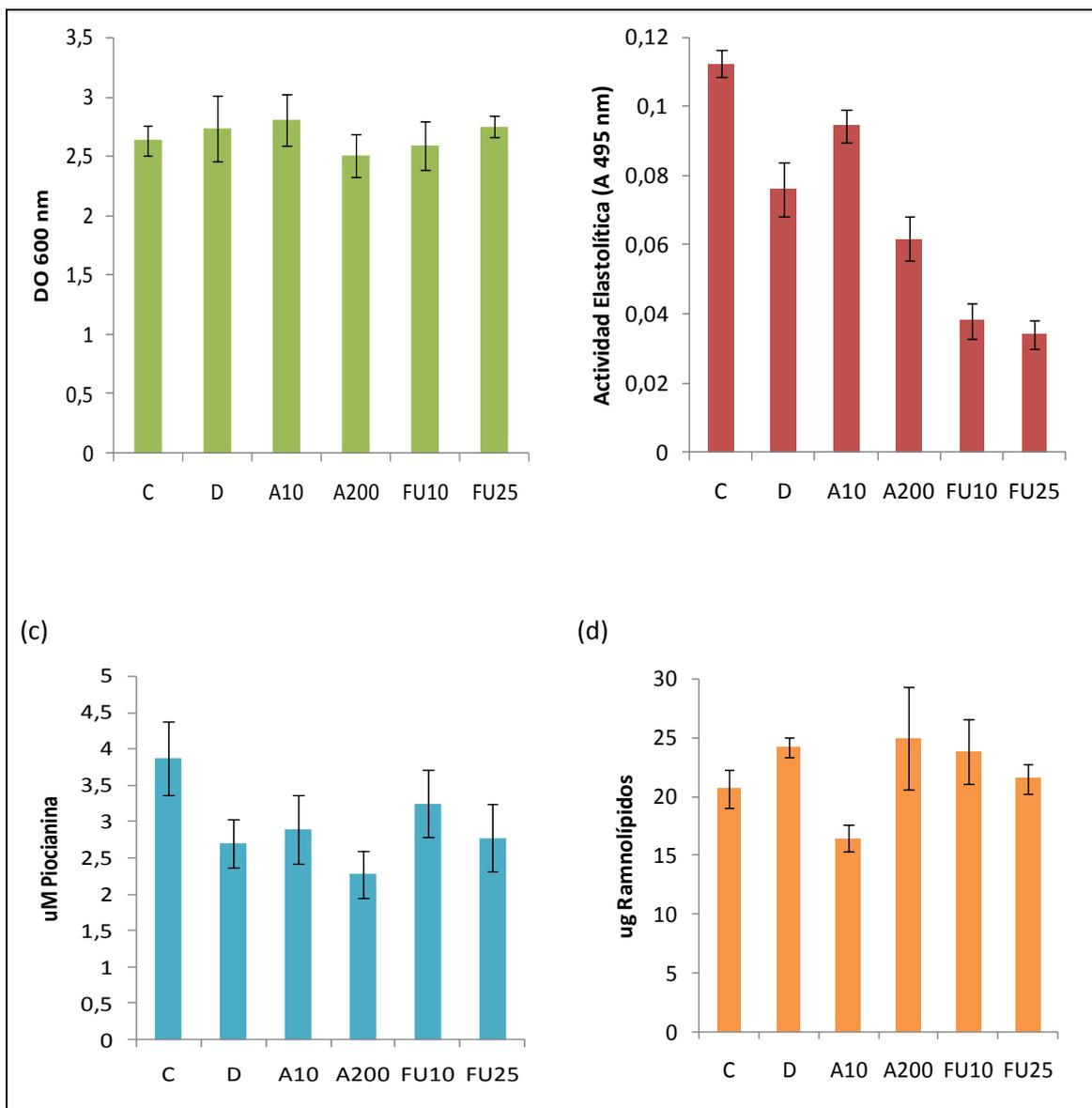


Gráfico 3 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 5U.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de píocianina. Concentraciones de Píocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

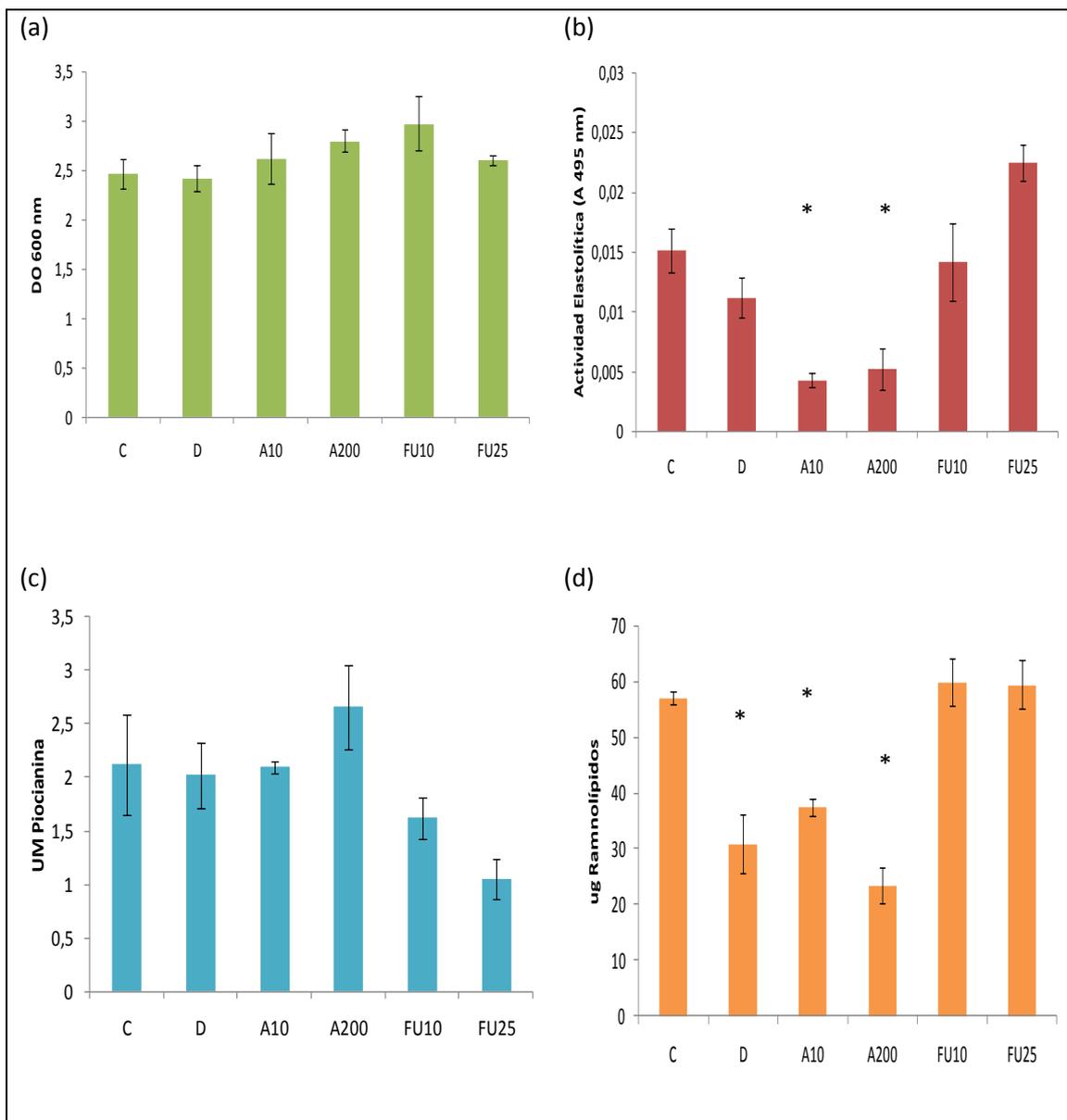


Gráfico 4. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 9.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pirocianina. Concentraciones de Pirocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

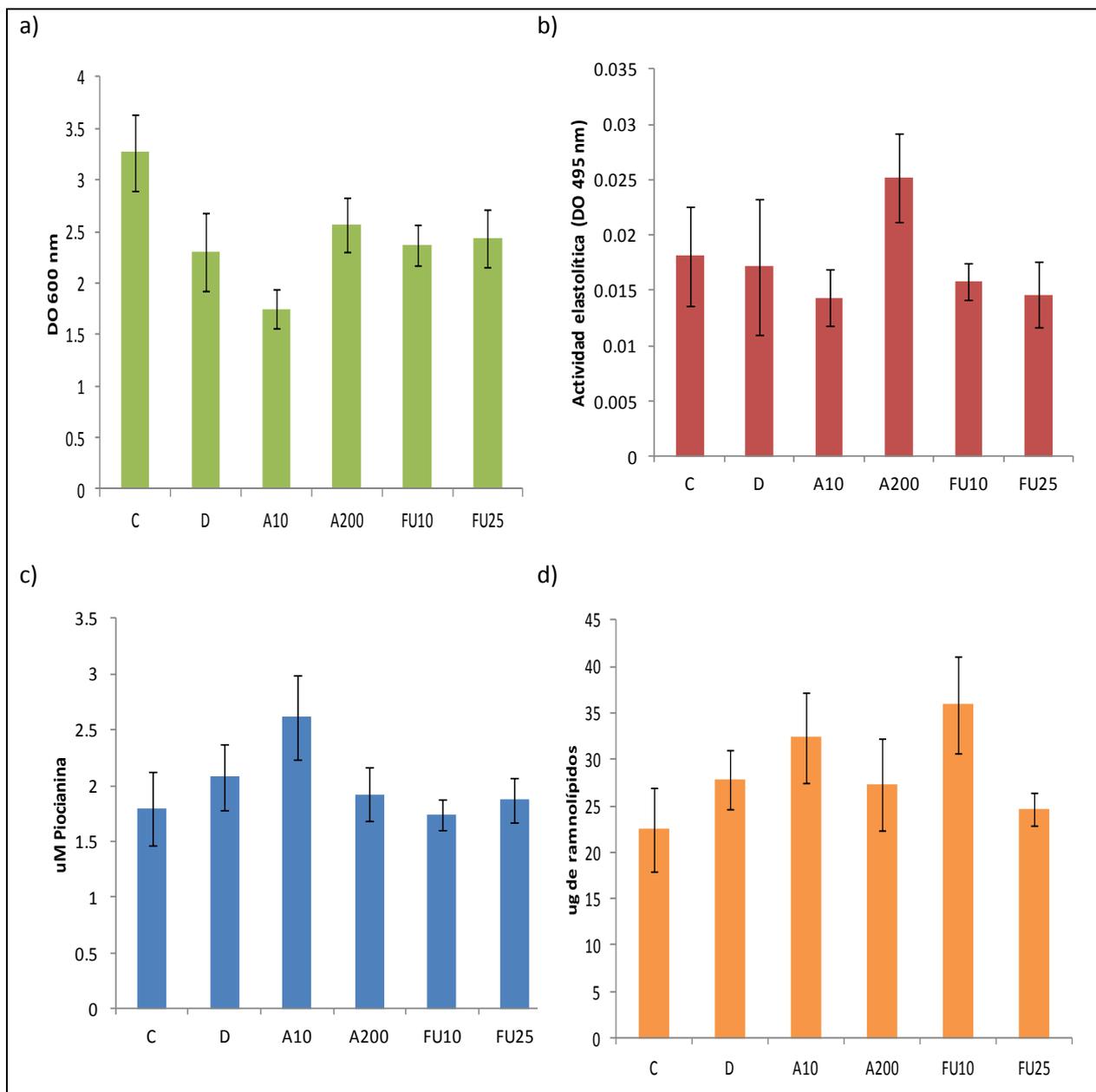


Gráfico 5 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 12. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pirocianina. Concentraciones de Pirocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípido cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

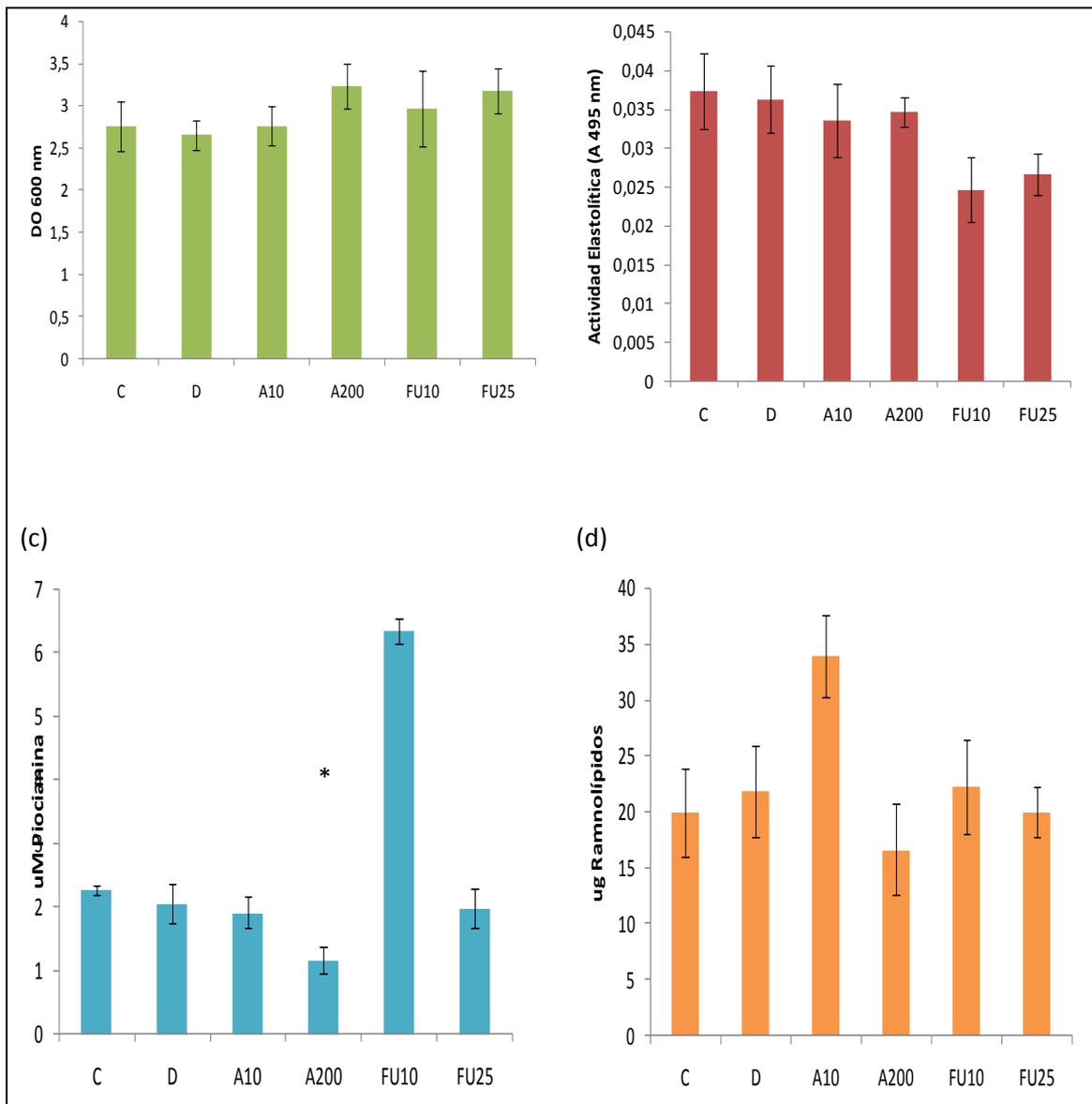


Gráfico 6 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 17.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de piciocianina. Concentraciones de Piciocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

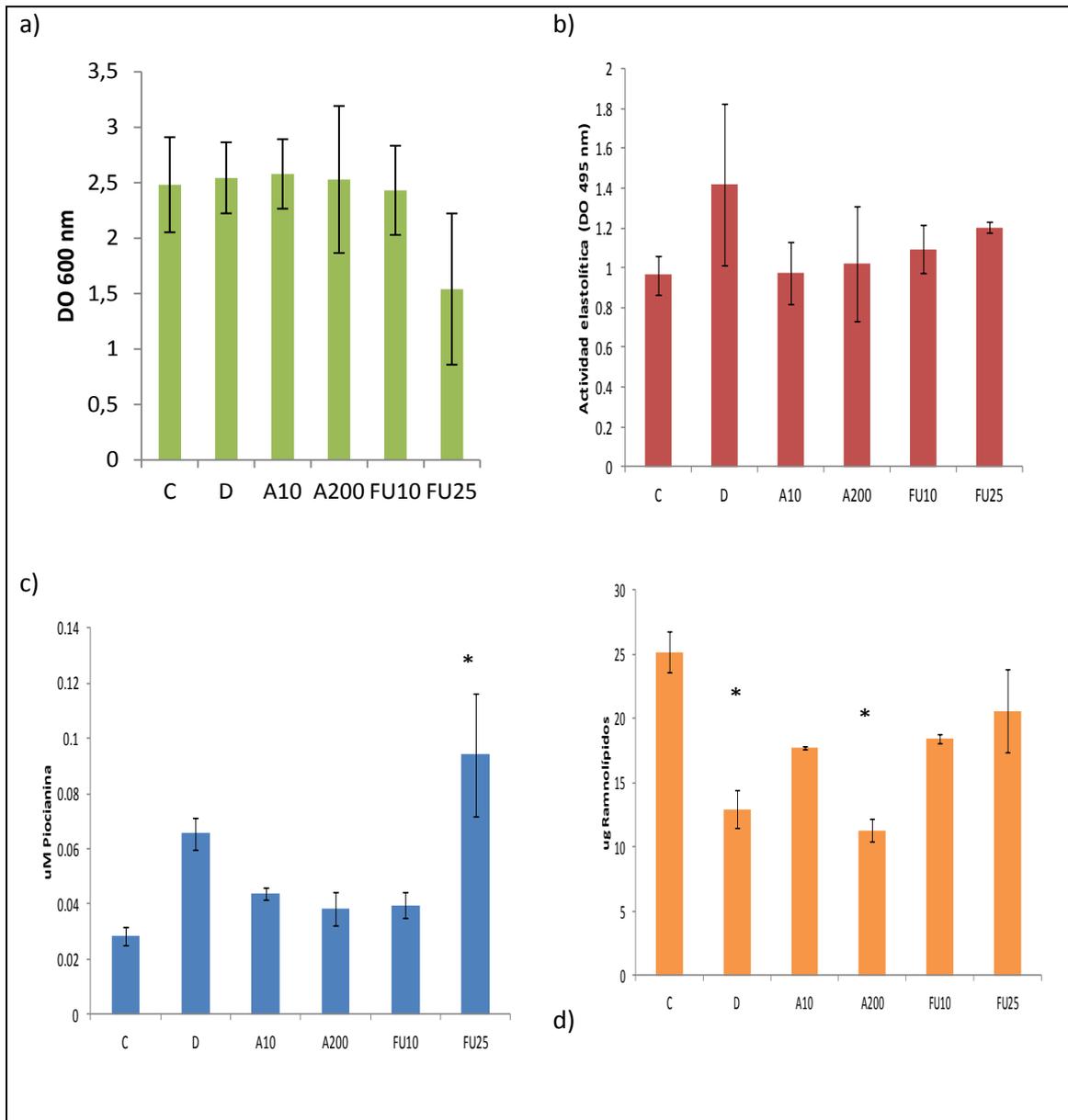


Gráfico 7 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 23. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de piciánina. Concentraciones de Piciánina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

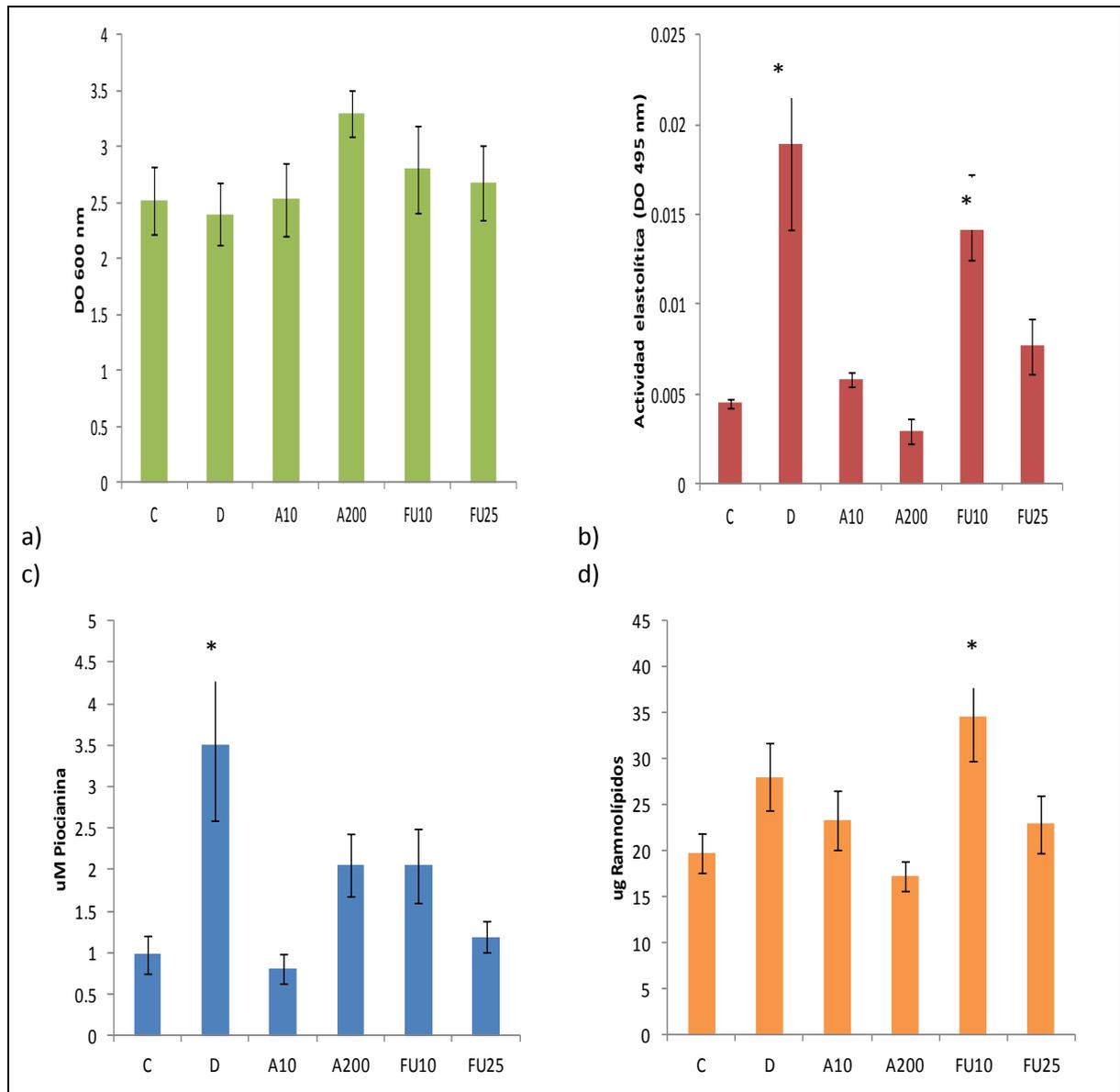


Gráfico 8. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 188.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de piciánina. Concentraciones de Piciánina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

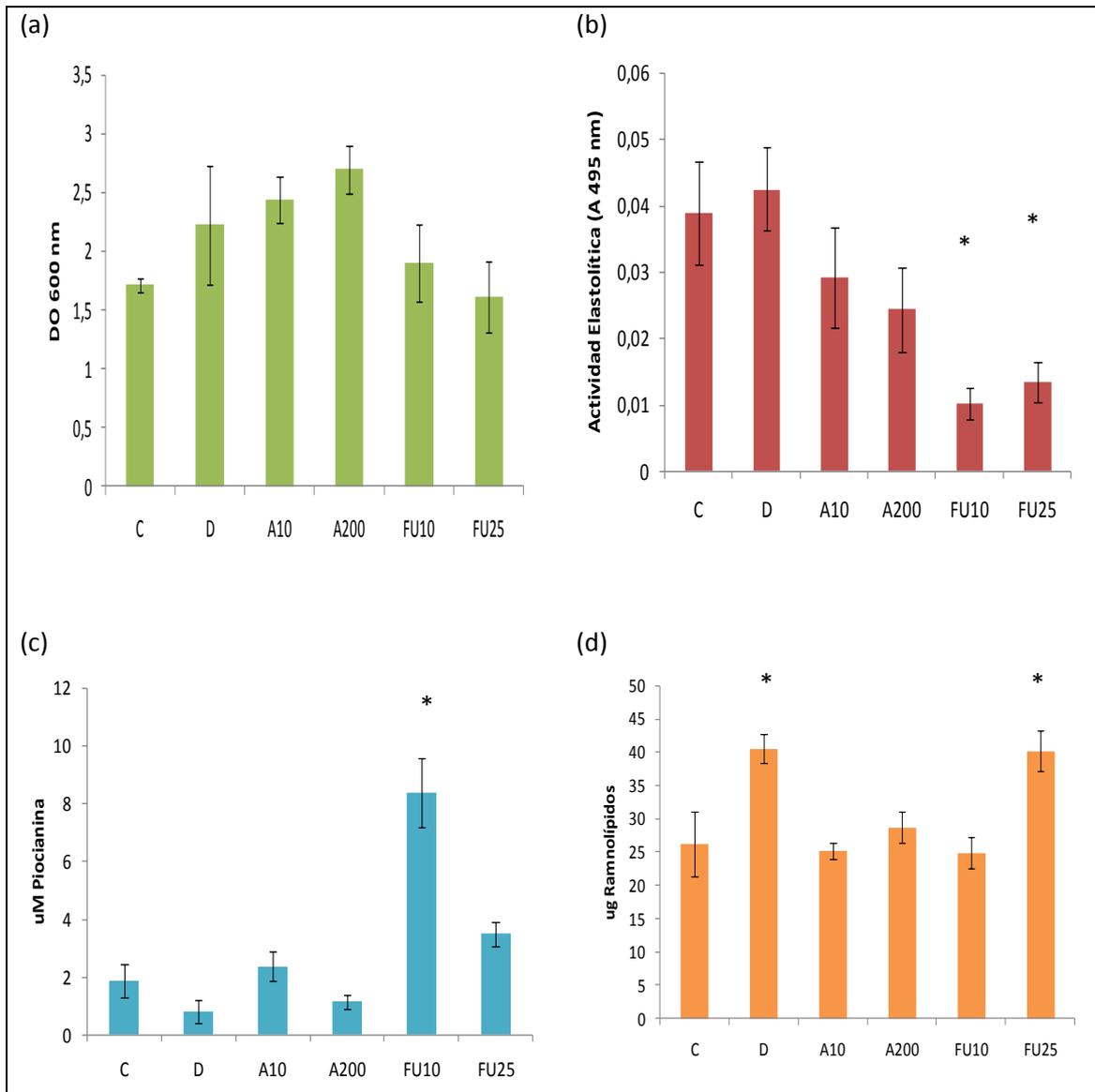


Gráfico 9 . Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 440.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de píocianina. Concentraciones de Píocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

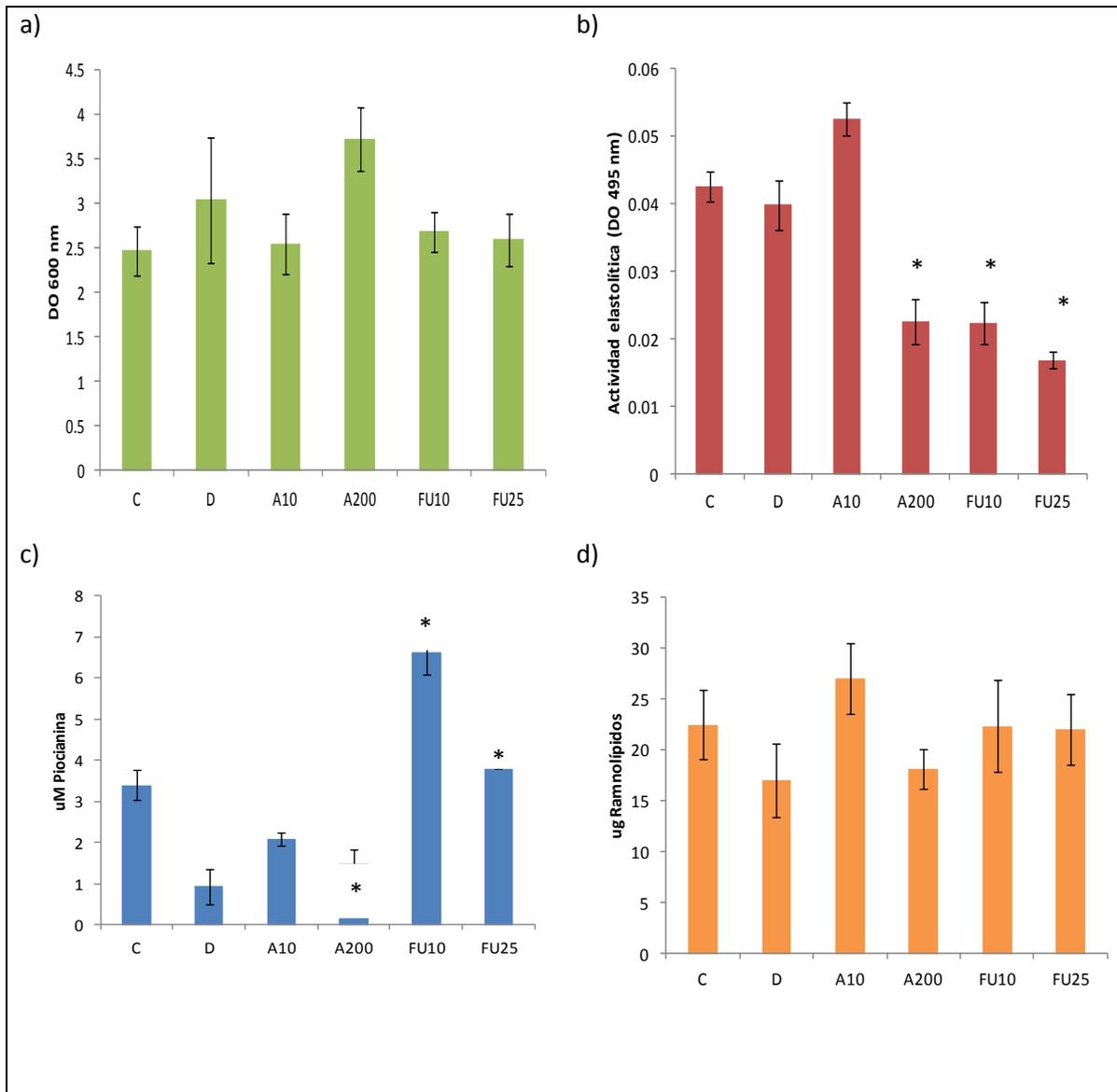


Gráfico 10. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 526.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de picianina. Concentraciones de Picianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

RN

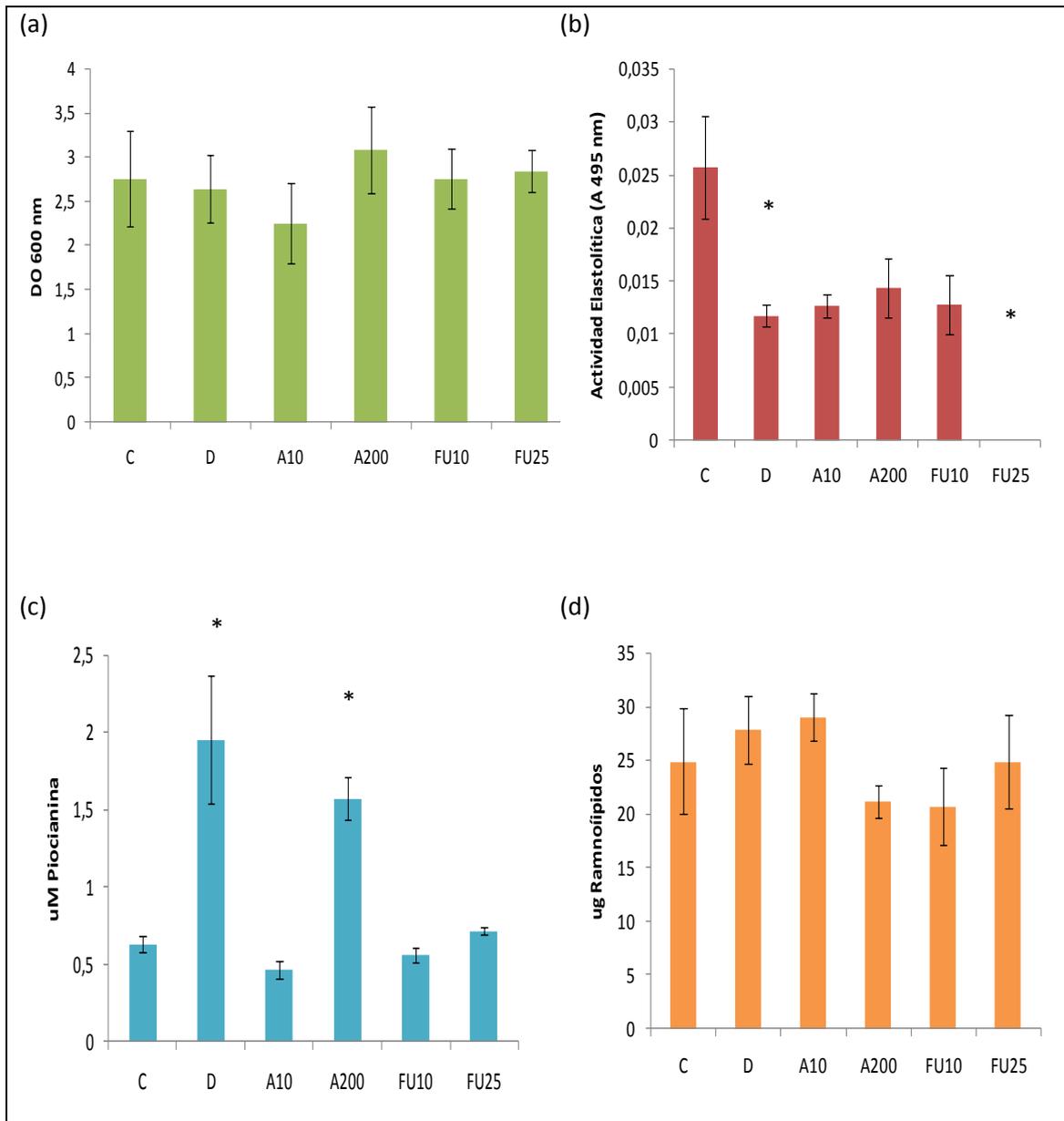


Gráfico 11. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa RN.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pirocianina. Concentraciones de Pirocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

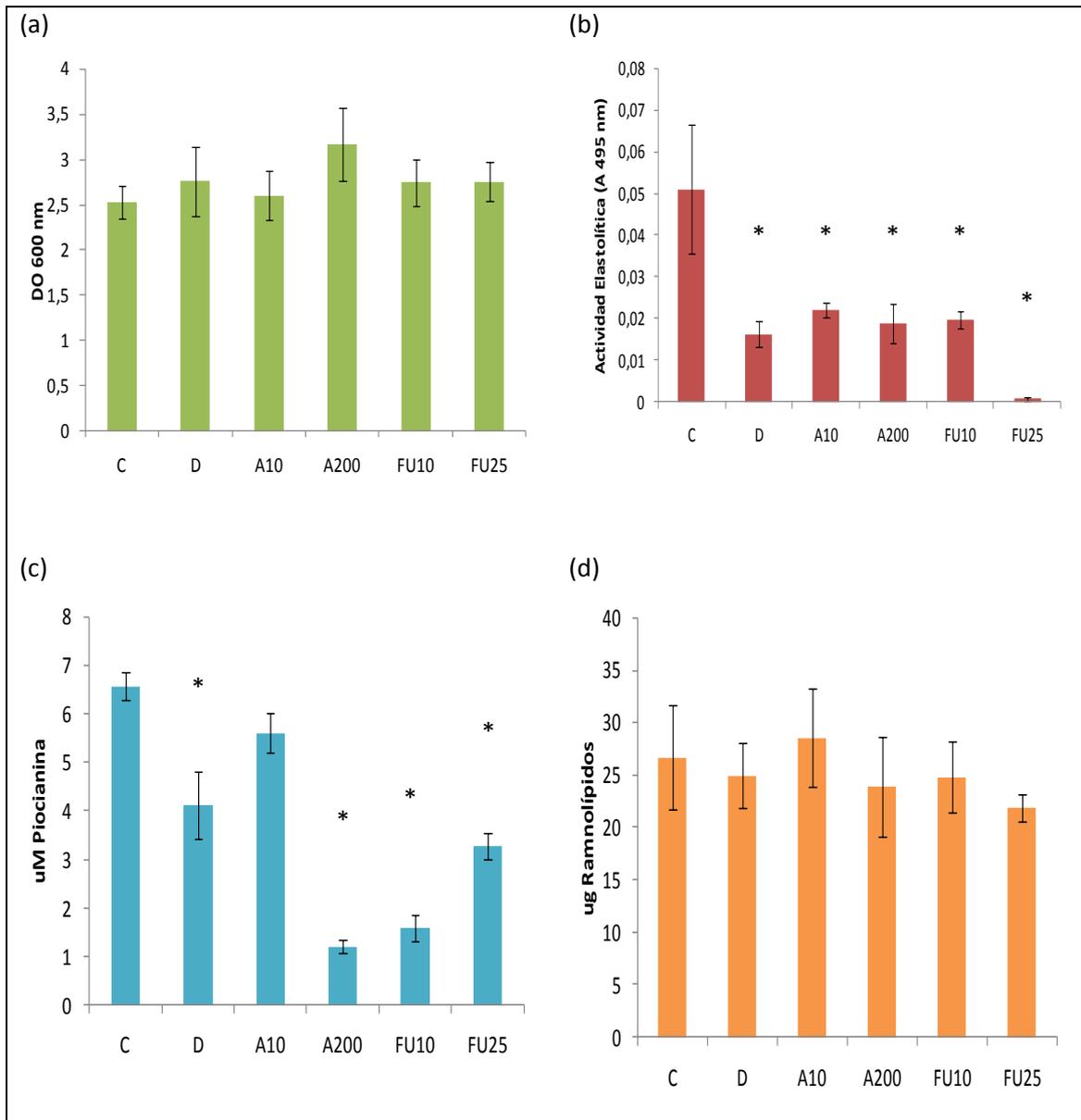


Gráfico 12. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 51U. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de Pilocianina. Concentraciones de Pilocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

PA14

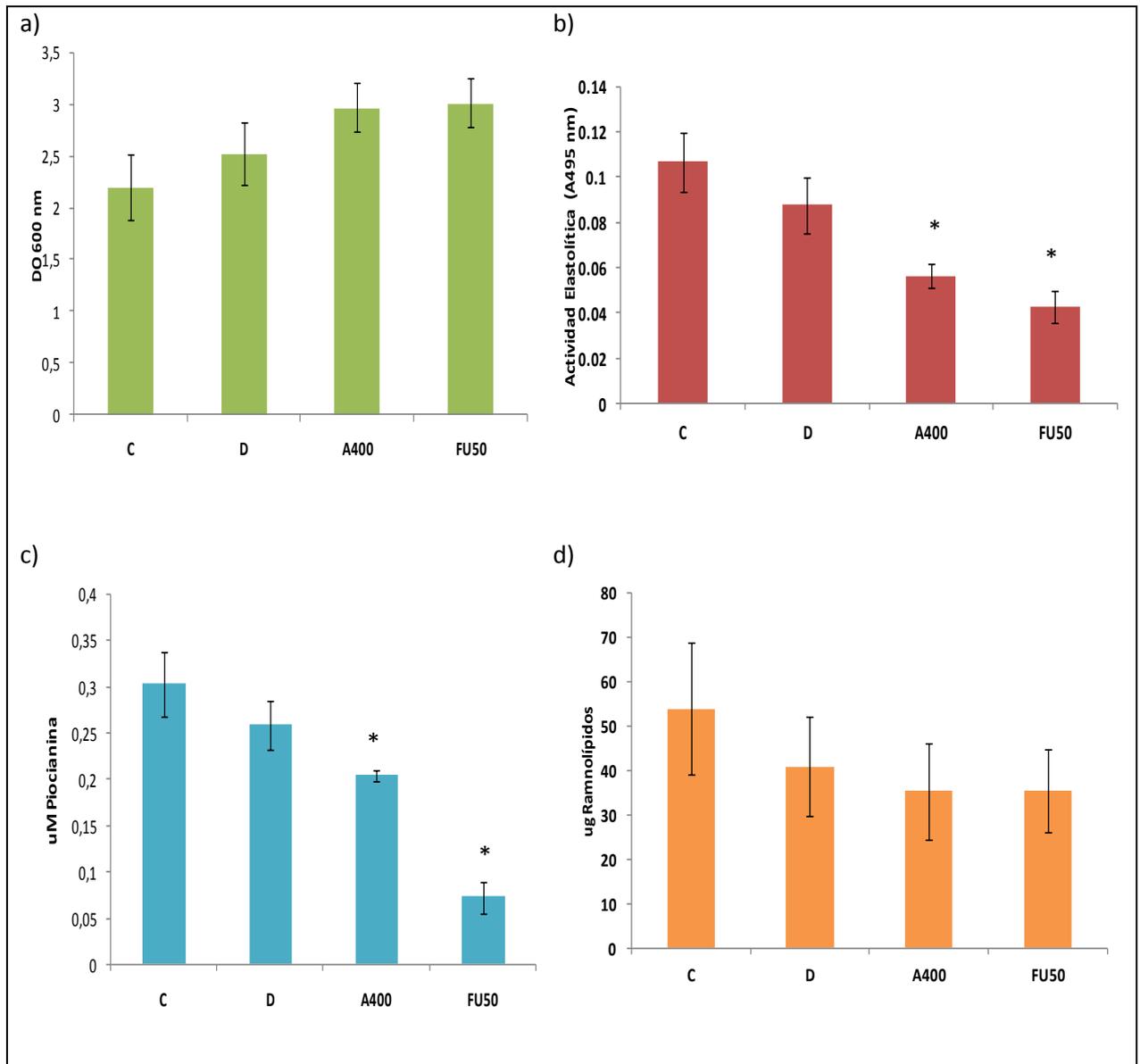


Gráfico 13. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por PA14. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de píocianina. Concentraciones de Píocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

PAO1

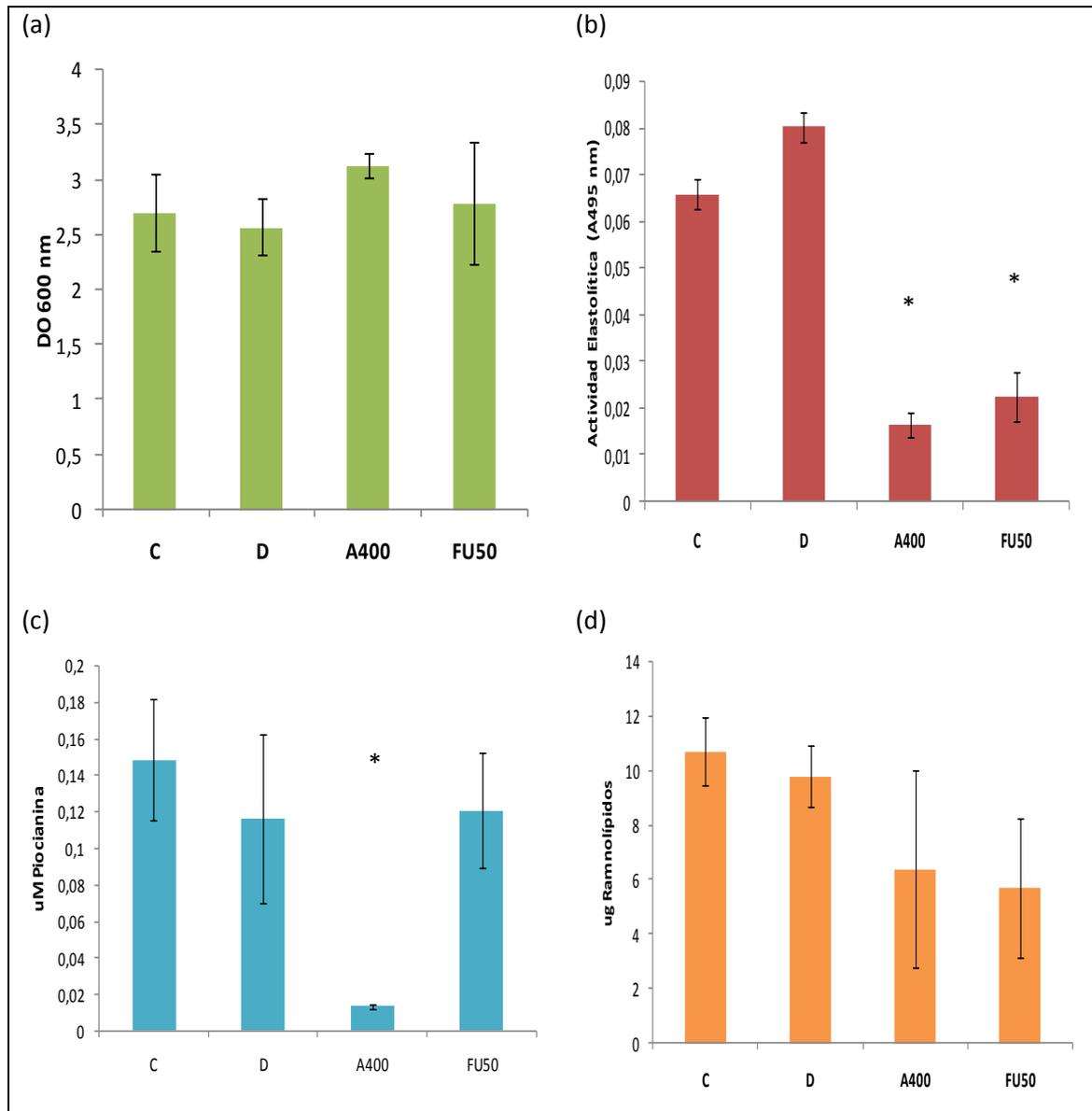


Gráfico 14. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por PAO1.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de plicianina. Concentraciones de Plicianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

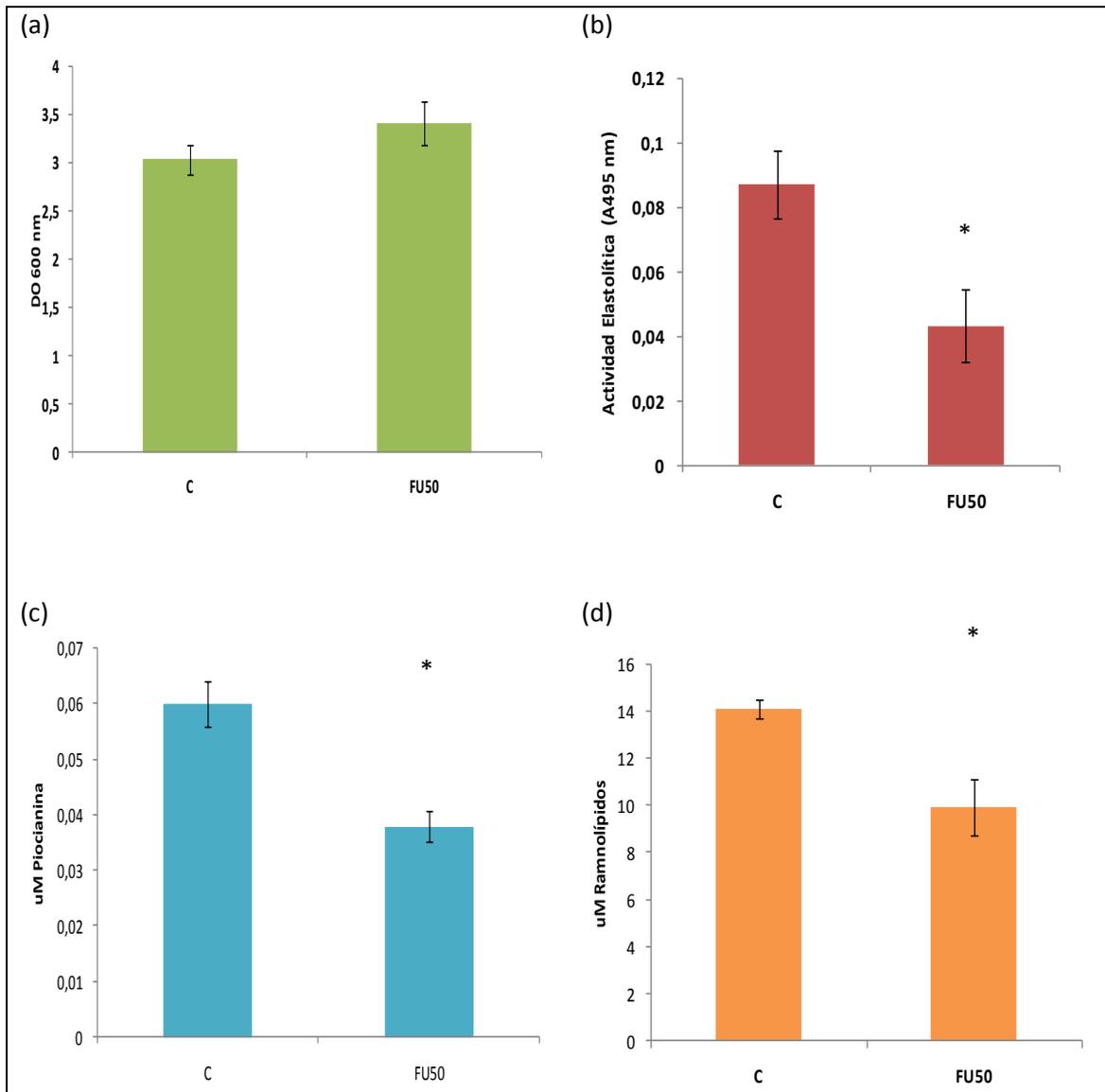


Gráfico 15. Efecto del inhibidor 5FU en los factores de virulencia expresados por la cepa 5U.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de píocianina. Concentraciones de Píocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

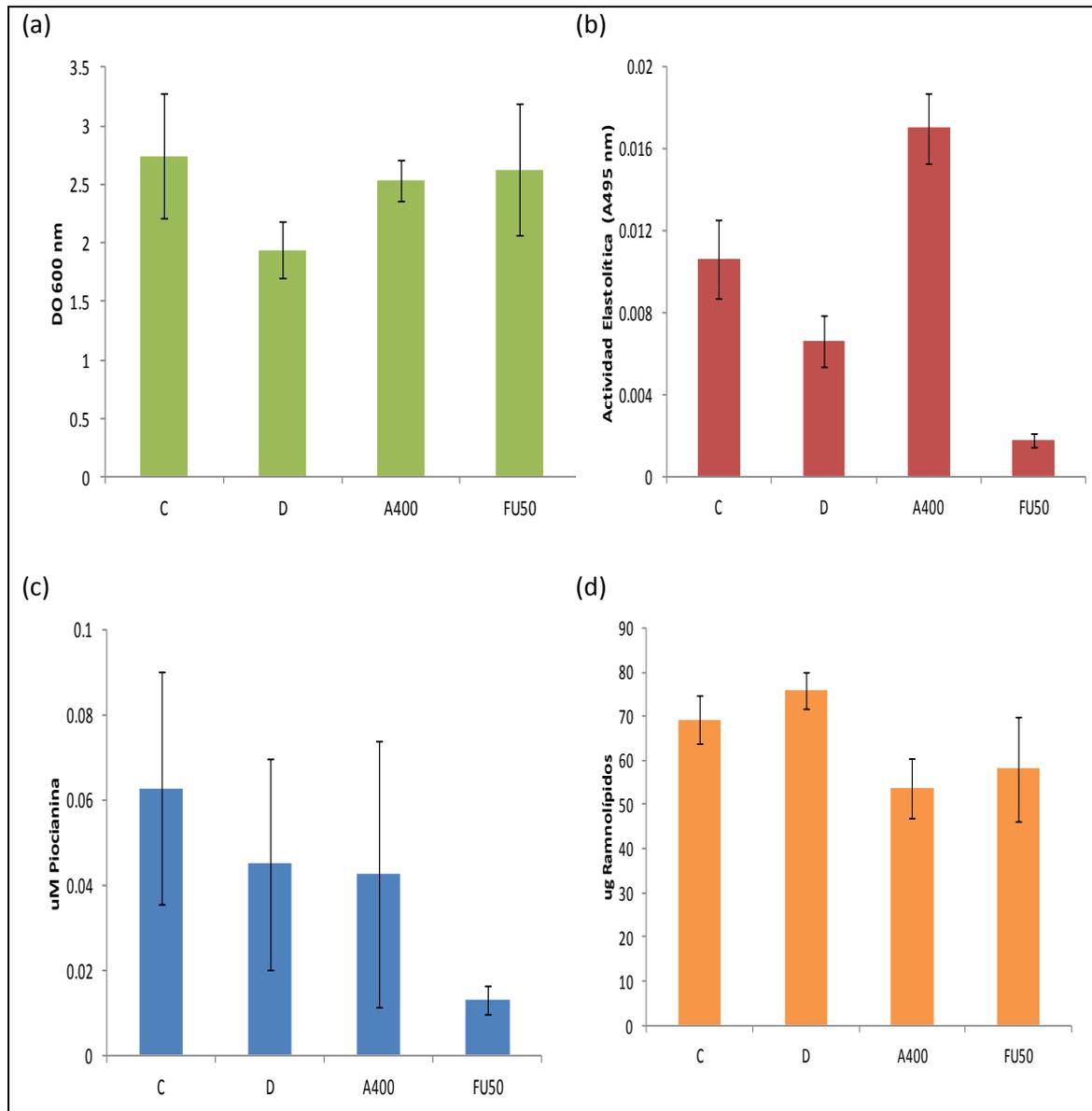


Gráfico 16. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 9.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de piocianina. Concentraciones de Piocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

*Valor estadísticamente significativo. ANOVA más Prueba de Fischer $\alpha=0.05$

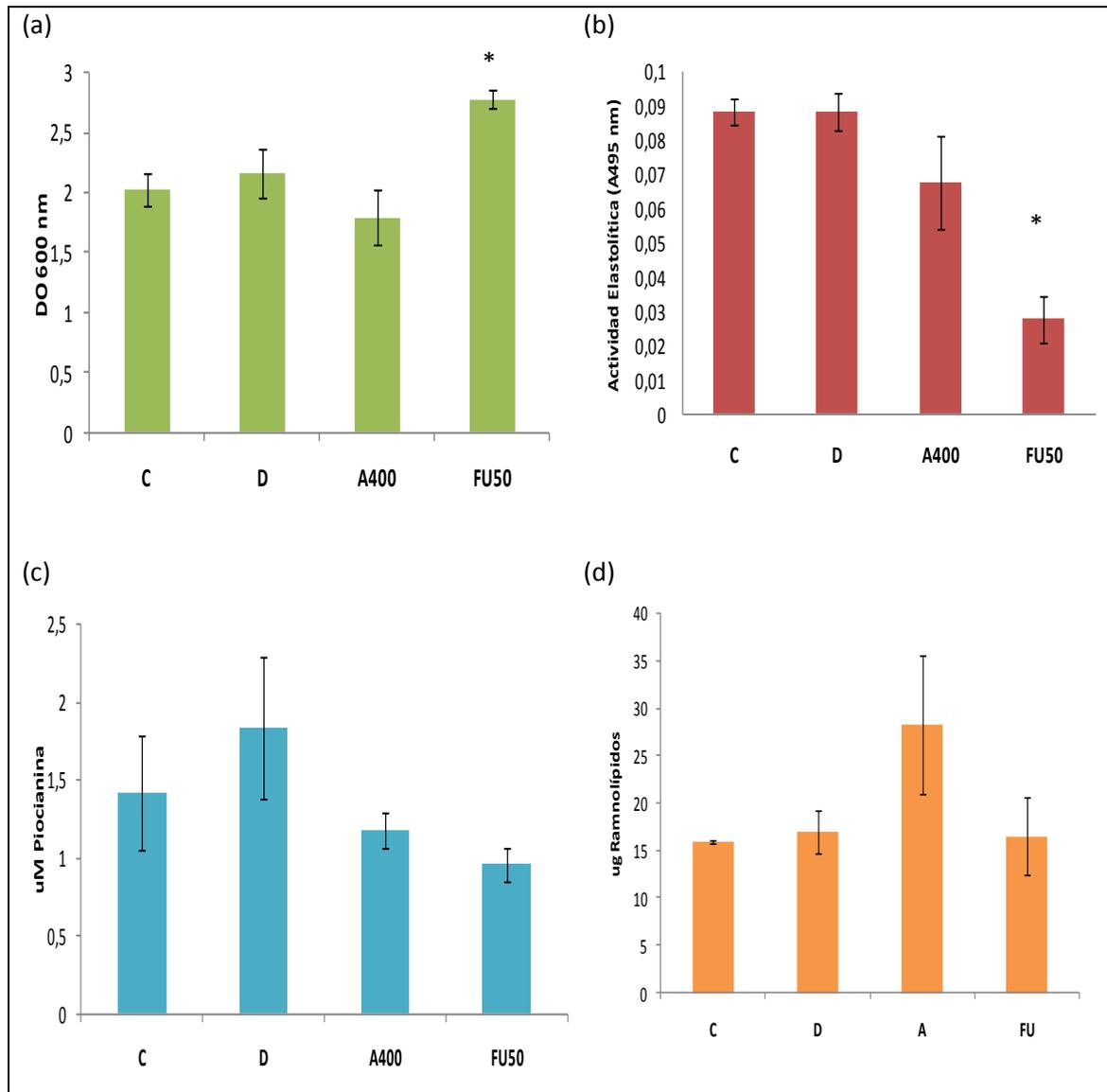


Gráfico 17. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 17.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pilocianina. Concentraciones de Pilocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolipidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

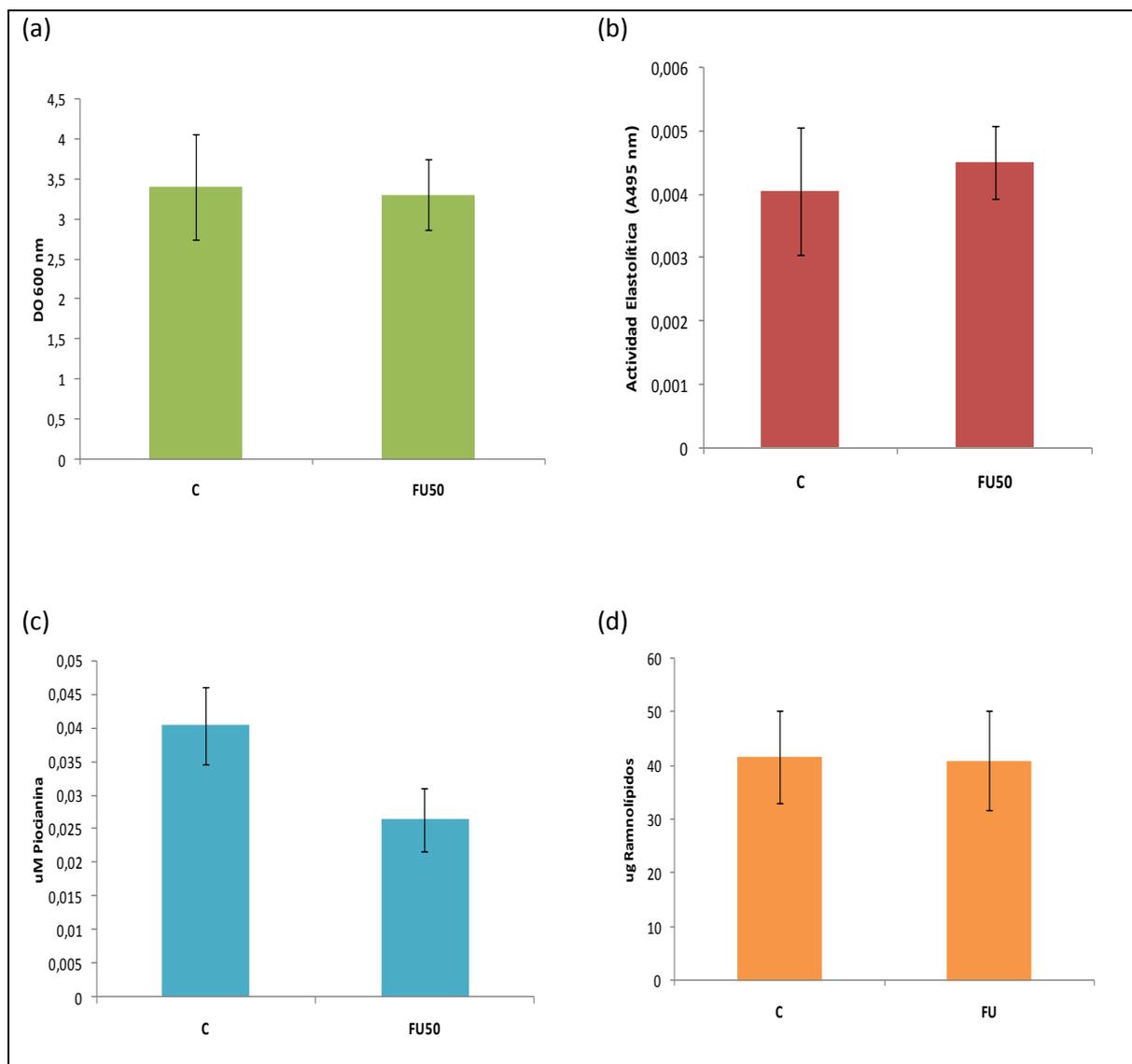


Gráfico 18. Efecto del inhibidor 5FU en los factores de virulencia expresados por la cepa 188.

Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de picianina. Concentraciones de Picianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

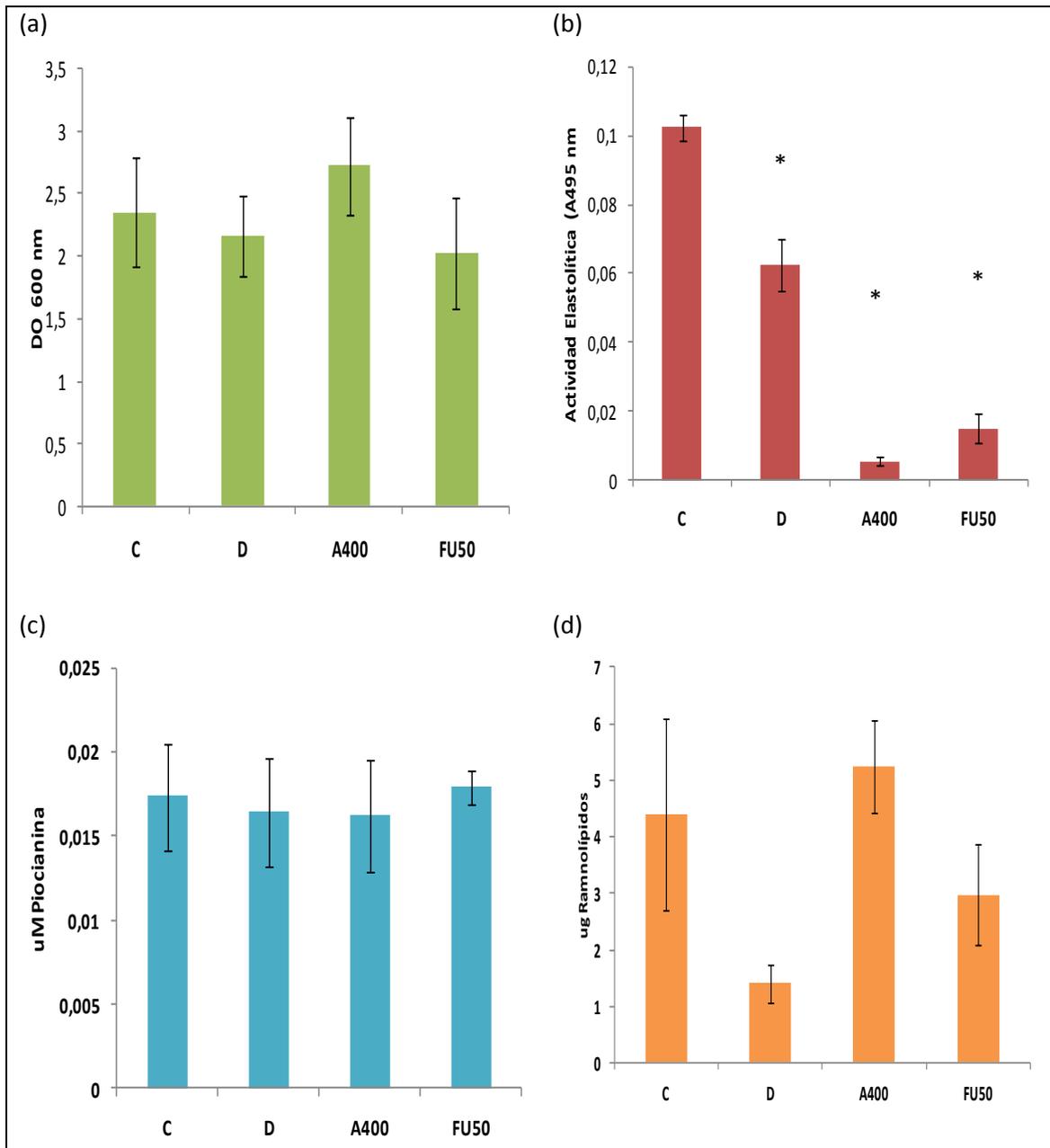


Gráfico 19. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 440. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de plicianina. Concentraciones de Plicianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

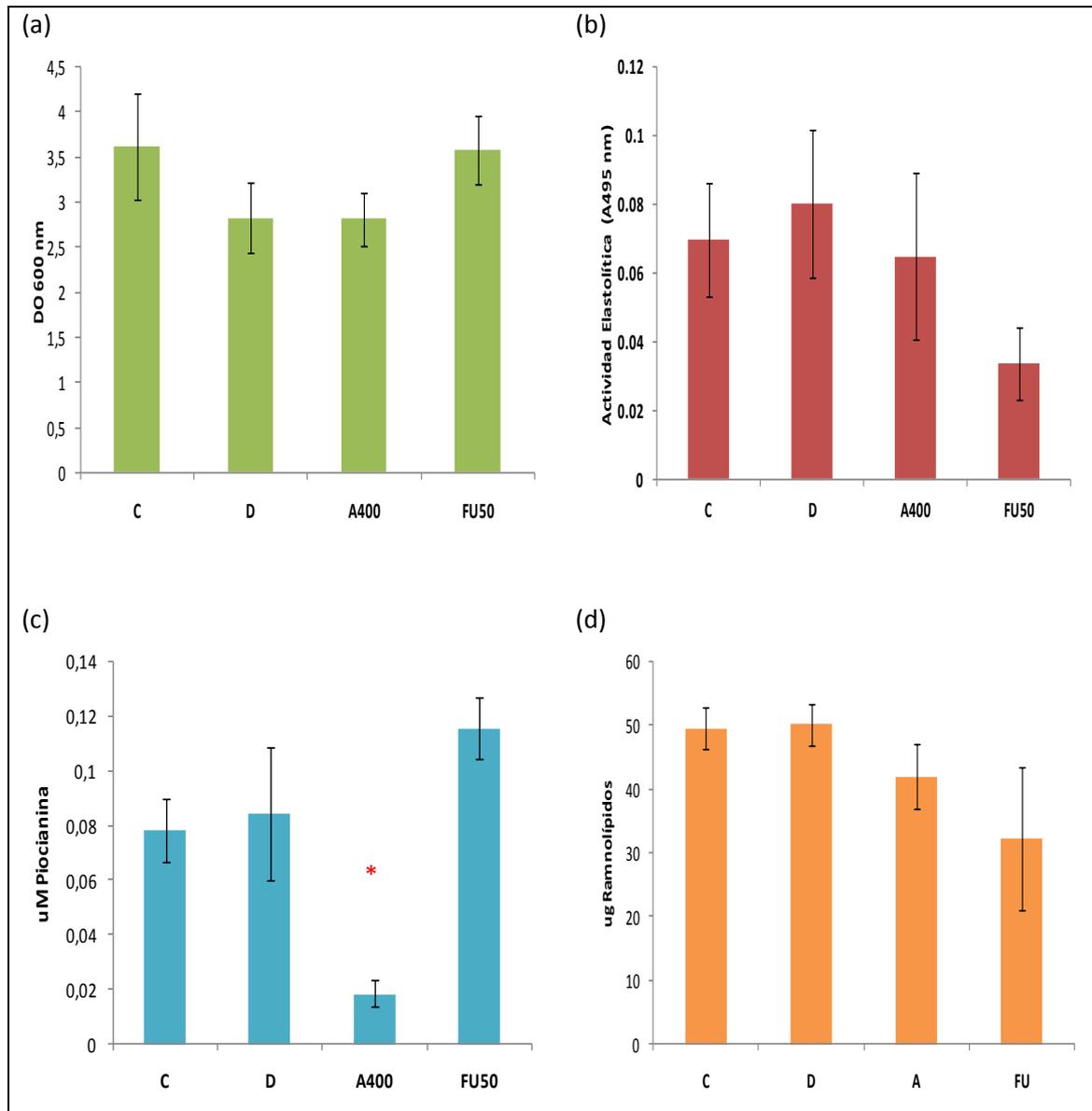


Gráfico 20. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 526. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pocianina. Concentraciones de Pocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

*Valor estadísticamente significativo. ANOVA más Prueba de Fischer $\alpha=0.05$

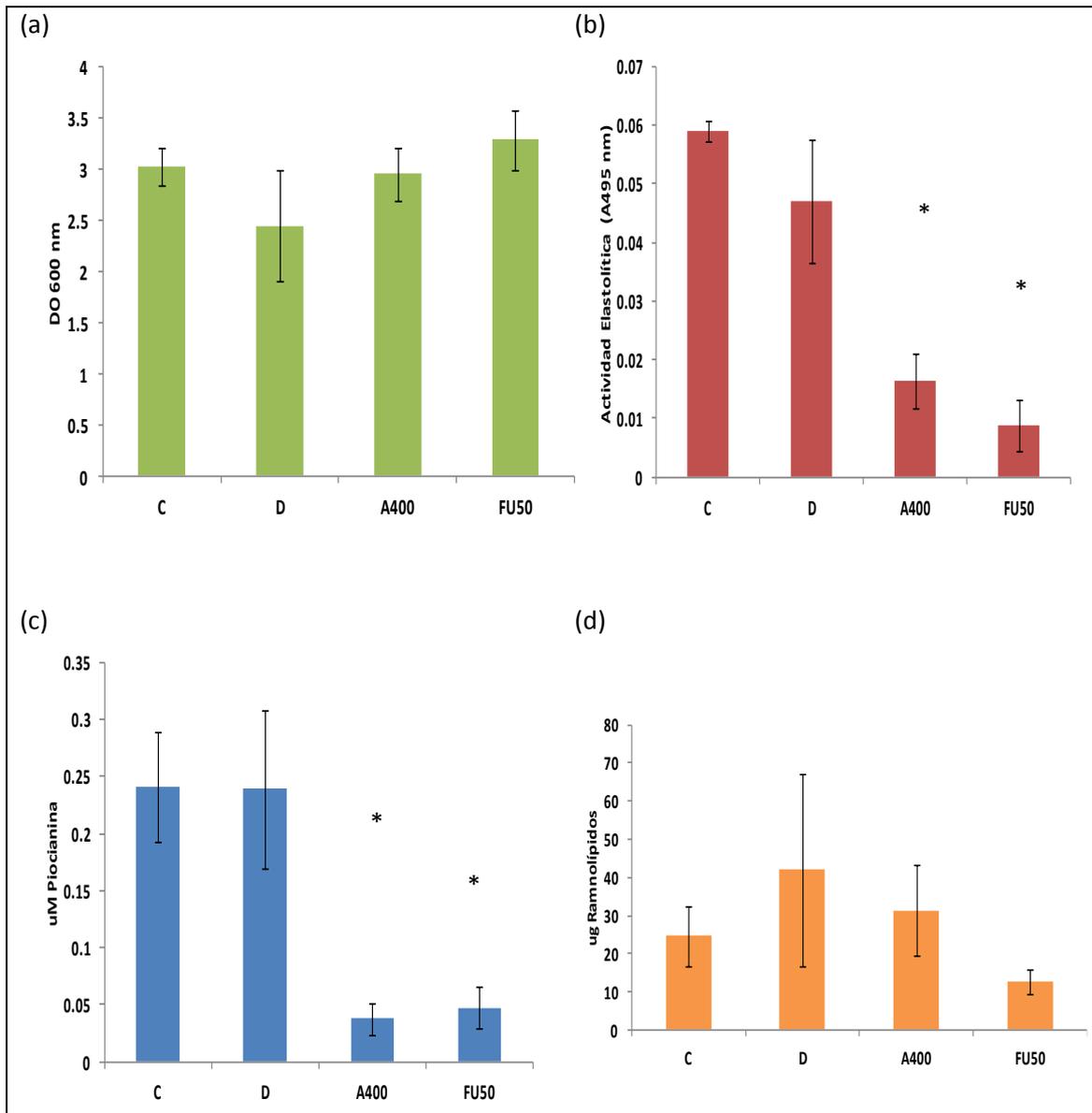


Gráfico 21. Efecto de los inhibidores en los factores de virulencia expresados por la cepa 51U. Cultivos en medio LB a 37 °C cosechados a las 24 horas. (a) Crecimiento; Densidad Óptica a 600 nm. (b) Actividad Elastolítica en sobrenadantes. (Normalizados entre el número de células) (c) Producción de pocianina. Concentraciones de Pocianina presentes en los sobrenadantes (normalizados por número de células). (d) Producción de Ramnolípidos cuantificados en sobrenadantes (normalizados por número de células). Valores correspondientes a media (3 repeticiones) y barras de error estándar.

* Valores Estadísticamente Significativos. ANOVA más Prueba de Dunnett $\alpha=0.05$

REFERENCIAS

- Abalos, A. (2010). "Caracterización química de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a partir de residuos de aceites de soja mediante HPLC-EM." *CENIC Ciencias Químicas* 41: 155-159.
- Attila C, Ueda A, Wood TK (2009). "5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator *AriR* as an antivirulence compound." *Appl Microbiol Biotechnol* 82(3): 525-33.
- Berre, R. L. (2008). "Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Clin Microbiol Infect.*
- Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, García-Quetglas E; Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient (2005). "Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients." *Clin Microbiol Infect* 11(9): 690-703.
- Castillo-Juárez I, Rivero-Cruz F, Celis H, Romero I. (2007). "Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*." *J Ethnopharmacol* 114(1): 72-7.
- Essar D. W., Eberly L., Hadero A., Crawford I. P. (1990). "Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications." *J Bacteriol* 172(2): 884-900.
- Farrand, P., D. Jones (1996). "Direction of report in spatial and verbal serial short-term memory." *Q J Exp Psychol A* 49(1): 140-58.
- Gonzalez, J. E., N. D. Keshavan (2006). "Messing with bacterial quorum sensing." *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4): 859-75.
- Hentzer, M., M. Givskov (2003). "Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections." *J Clin Invest* 112(9): 1300-7.
- Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T.B., Heydorn A., Andersen J.B., Parsek M.R., Rice S.A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S., Givskov M. (2002). "Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound." *Microbiology* 148(Pt 1): 87-102.
- Hussain M, Collins C, Hastings JG, White PJ. (1992). "Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase-negative staphylococci on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of the biofilm." *J Med Microbiol* 37(1): 62-9.
- Jagani S, Chelikani R, Kim DS. (2009). "Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*." *Biofouling* 25(4): 321-4.
- Juhas M, Eberl L, Tümmler B. (2005). "Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*." *Environ Microbiol* 7(4): 459-71.
- Kubo Isao, H. M., Masaki. Himejima, Yoshiro. Yamagiwa, Hiroyuki. Mera, Kimihiro. Tokushima, Shigeo. Ohta, Tadao. Kamikawa (1993). "Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids." *J. Agric. Food Chem.*: 1016-1019.

Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. (2005). "The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." *J Immunol* 175(11): 7512-8.

Lesic, B., Lepine F., Déziel E., Zhang J., Zhang Q., Padfield K., Castonguay MH., Milot S., Stachel S., Tzika AA., Tompkins RG., Rahme LG. (2007). "Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds." *PLoS Pathog* 3(9): 1229-39.

Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G., Villanueva J., Wei T., Ausubel MF. (2006). "An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2833-8.

Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler JF, Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L, Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D. L. (2011) "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." *Clin Microbiol Infect* 18(3): 268-81.

Martínez, E. (2007). "Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary." Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

Mata R, Calzada F, Navarrete A, del Rio F, Delgado G. (1991). "Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens* 1." *J Ethnopharmacol* 34(2-3): 147-54.

Merino, L. A. (2007). "[*Pseudomonas aeruginosa*: a bacterium with multiple personalities]." *Rev Argent Microbiol* 39(3): 143.

Murillo-Llanes, J. (2009). "Resistencia Antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en el hospital general de Culiacan." *Sociedad Médica del Hospital General de Culiacán "Dr. Bernardo J. Gastélum" A S Sin* 3(1): 6-11.

Navarrete, A., R. Mata, Delgado G. (1989). "Alkylsuccinic Acids from *Amphipterygium adstringens*." *Planta Med* 55(6): 579.

Nelson, D. L., Cox M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Omega: 876-878.

Ohman, D. E., Cryz S. J., Iglewski B.H. (1980). "Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase." *J Bacteriol* 142(3): 836-42.

Oliverartega, A. G., M. Soto-Hernandez, Martínez-Vázquez M., Terrazas S.T., Solares A.F. (1999). "Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht)." *J Ethnopharmacol* 68(1-3): 109-13.

Oviedo-Chávez I, Ramírez-Apan T, Soto-Hernández M, Martínez-Vázquez M. (2004). "Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity." *Phytomedicine* 11(5): 436-45.

Parsek, M. R., Val D. L., Hanzelka B.L., Cronan J.E., Greenberg E.P. (1999). "Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4360-5.

Rasmussen, T. B., Givskov M. (2006). "Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs." *Int J Med Microbiol* 296(2-3): 149-61.

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

Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO, Andersen JB, Koch B, Larsen TO, Hentzer M, Eberl L, Hoiby N, Givskov M. (2005). "Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species." *Microbiology* 151(Pt 5): 1325-40.

Raúl, R. C. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. E. M. panamericana.

Rocha-Gracia, R. d. C. L.-Z., Patricia y Martínez-Laguna, Ygnacio (2005). *Modelos de la patogénesis de las enfermedades infecciosas*. P. e. d. I. B. U. A. d. Puebla. Puebla, México.

Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. (2004). "Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Med Microbiol* 53(Pt 9): 841-53.

Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M. (2009). "More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules." *Trends Microbiol* 17(5): 189-95.

SSA. (2011) *Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud*. Volume, DOI:

Soberón, G. (2012). "Pseudomonas aeruginosa." Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012, from <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>.

Strateva, T. (2011). "Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections." *Annals of Microbiology*(4): 717-732.

Todar, K. (2008-2012). *Online Textbook of Bacteriology*. Madison Wisconsin.

Tuleva BK, Ivanov GR, Christova NE. (2002). "Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain." *Z Naturforsch C* 57(3-4): 356-60.

Tyman (2000). "Chemistry and biochemistry of anacardic acids." *Recent research developments in lipids*: 125-127.

Ueda A, Attila C, Whiteley M, Wood TK. (2009). "Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist." *Microb Biotechnol* 2(1): 62-74.

Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. (2007). "The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation." *J Bacteriol* 189(18): 6695-703.

Williams, P. and M. Camara (2009). "Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules." *Curr Opin Microbiol* 12(2): 182-91.

Williams, P., M. Camara, Hardman A., Swift S., Milton D., Hope V.J., Middleton B., Pritchard D.I., Bycroft B.W. (2000). "Quorum sensing and the population-dependent control of virulence." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1397): 667-80.

Yang, L., Rybtke M. T., Jakobsen T.H., Hentzer M., Bjanshort T., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2009). "Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother* 53(6): 2432-43.