



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Diseño de un modelo de lesión por daño térmico en ratones para la evaluación del efecto protector de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

FITOQUÍMICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

SÁNCHEZ CERVANTES IVÁN ADOLFO

Director de Tesis:

Dr. Israel Castillo Juárez.

Asesor Interno:

Dra. Hortensia Rosas Acevedo

Lugar de adscripción: Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo.



CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE 2016



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.

La presente investigación se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Israel Castillo Juárez en el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Km 36.5 Carretera México -Texcoco. Edo. De México.
“Diseño de un modelo de lesión por daño térmico en ratones para la evaluación del efecto protector de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.”



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **SÁNCHEZ CERVANTES IVÁN ADOLFO**, con número de cuenta **410018493**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de septiembre de 2016** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ALFONSO MACARIO LUNA VÁZQUEZ

VOCAL Dr. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ*

SECRETARIO Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

Hortensia Rosas

SUPLENTE M. en C. MARÍA DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA OYARZABAL

SUPLENTE M. en C. MARÍA MAGDALENA AYALA HERNÁNDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Diseño de un modelo de lesión por daño térmico en ratones para la evaluación del efecto protector de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 18 de agosto de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ ZARAGOZA
DIRECTOR DIRECCIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES



VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de estudiar, por tantas alegrías. Nunca he deseado algo más en la vida que estudiar en la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a cada uno de mis maestros que me impartieron clase por enseñarme todo lo que se y motivarme con su conocimiento.

Al Fideicomiso COLPOS 2013. Proyecto 167304. Estudio fitoquímico de especies de uso medicinal en México con actividad inhibidora de la comunicación bacteriana.

Al apoyo complementario del Programa Cátedras-CONACyT 2014. Proyecto 2112. Fitoquímicos inhibidores de comunicación bacteriana: alternativa a la resistencia de antibióticos, con el cual se adquirió equipo para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Marcos Soto Hernández y al Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por haberme permitido realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Israel Castillo Juárez, por haberme aceptado en su grupo de investigación y tener la confianza en mí, por haber dirigido este trabajo gracias por su enseñanza, amistad, apoyo, comprensión y sobre todo paciencia.

Al Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina de la UNAM, por proporcionarnos las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

A cada uno de mis asesores Dra. Hortensia Rosas Acevedo, M en C. Alfonso Luna Vázquez, M en C. María Magdalena Ayala Hernandez por su apoyo y comprensión en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi Mama por todo el apoyo y amor que cada día me das, aún recuerdo cuando me tomabas de la mano y me llevabas a la escuela, lo conseguimos, sé que tu sabías que lo lograría no te falle, te amo.

A mi Papa por inculcarme buscar una respuesta a los fenómenos naturales, por ser un ejemplo a seguir, algún día seré como tú, el mejor maestro y el mejor padre, te quiero mucho.

A mi Hermano porque siempre has estado cuando más te he necesitado, por enseñarme otra forma de ver el mundo y saber que siempre contare contigo.

A mi abuelito Manuel Cervantes. Y todavía no puedo dar crédito a la terrible realidad, Y mi torturado espíritu cree encontrarlo todavía en sus sitios favoritos en el campo, inclinado sobre el arado, trabajando, trabajando, trabajando. Nunca oí de sus labios una queja ocasionada por la fatiga de sus pesadas labores. Te quiero mucho.

A mi abuelita María porque nadie me ha demostrado cual anhelada es mi visita, por tu forma de recibirnos siempre con una sonrisa te quiero mucho.

A mis tías Eli y Malena porque sin el apoyo y el cariño que me han brindado toda mi vida no hubiese sido posible terminar la universidad, siempre estaré muy agradecido por todo lo que me han dado y ya vieron no les falle, las quiero mucho.

A Jacqueline Campiran por haber estado conmigo en las carencias económicas como emocionales siempre lo arreglabas con una sonrisa, por todo el apoyo que me brindaste sin ti yo no hubiera podido concluir esto muchas gracias. "Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; **pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.**

Siempre te voy a RECORDAR: del latín re-cordis, volver a pasar por el corazón...
(Eduardo Galeano)

A mis muertos que seguramente me estarían acompañando en este día tan especial.

A mis tíos y primos Sánchez Eugenia, Yolanda, Maura, Elvia, Xóchitl, Patricia, Marcos, Rey ,Elvira, Jesús, Álvaro, Eva, Claudia, Salvador, Arturo, Paquito, Daniel, Laura, Luz por haberme regalado la infancia más feliz que uno puede desear y haberme enseñado el concepto de familia.

A mi tío Néstor por darme trabajo que gracias a su apoyo podía ir a las prácticas de campo .

A mis tios y primos Cervantes Eli, Malena, Fidencio, Ignacio, Tomas ,A Mario que es como otro hermano, Cinthya por apoyarme con los trabajos que me consiguieron, Kelly, yarely, Magaly, Lizeth, Adael, Omar, Josué, Daniela, Itaye, Cesar, Marcos, Bryan, sebas ojala muy pronto estemos todos juntos.

A mis amigos de la infancia por haberme regalado tantas historias que contar por tantas cosas que pasamos juntos, los mejores amigos que uno puede desear.

A mis amigos de la universidad Araceli, Noemi, Christian, Manuel, Cata, Mary por su apoyo y su gran amistad que me brindaron en todos estos años de universidad.

A la clase trabajadora, para quienes son los únicos productores de la riqueza, para quienes no poseen nada más que un par de brazos para procurarse el sustento propio y el de sus familias, a todos los oprimidos, explotados, humillados, desesperados, para quienes no tuvieron oportunidad de adquirir una regular cultura que los emancipase de la cadena del salario, para los nadie que cuestan menos que la bala que los mata, algún día tiene que cambiar. Para los héroes de la clase obrera sus enormes sacrificios no pueden ser olvidados. Nunca en el olvido en vosotros siempre pienso.

“Trabaja, cerebro trabaja; da luz. Trabaja hasta que te aniquile la fatiga. Dentro de los cráneos de las multitudes hay muchas sombras: ilumina esas tinieblas con el incendio de tu rebeldía”

No sobreviviré a cautiverio, pues ya estoy viejo; pero cuando muera mis amigos quizá inscriban en mi tumba. “Aquí yace un soñador” y mis enemigos: “Aquí yace un loco”. Pero no habrá nadie que se atreva a estampar esta inscripción: “Aquí yace un cobarde y traidor a sus ideas”

(Ricardo Flores Magón)

“Hemos derramado nuestra sangre y nuestras lagrimas por ti. Tú recogerás nuestra herencia. “Hijo de los desesperados, tú serás un hombre libre.”

Por que quien no conoce la realidad es un ignorante, pero quien la conoce y la calla un criminal.



CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. <i>Amphipterygium adstringens</i>	4
2.1.2. Taxonomía.....	6
2.1.3. Uso etnobotánico.....	6
2.1.4. Actividad de <i>A. adstringens</i>	8
2.1.5. Estudios fitoquímicos de <i>A. adstringens</i>	11
2.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos.....	12
2.3. Quemaduras y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.4. Percepción de Quorum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.5. Modelos animales infectados con <i>P. aeruginosa</i>	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos particulares.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1. Obtención del material biológico.....	23
6.2. Obtención del extracto de hexano de la corteza de <i>A. adstringens</i>	23
6.3. Identificación de material biológico.....	23
6.4. Cepas bacterianas.....	24
6.5. Animales.....	24
6.6. Inóculo bacteriano.....	25
6.7. Modelo de infección por <i>P. aeruginosa</i> en lesiones causadas por daño térmico.....	26

6.7.1. Reemplazamiento de fluidos.	27
6.7.2. Infección.	27
6.7.3. Tratamiento.	28
6.7.4. Aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en animales infectados.	29
6.8. Análisis estadísticos.	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Obtención del extracto de hexano e identificación de la corteza de <i>A. adstringens</i>	31
7.2. Modelo de lesión por daño térmico en ratón e infección con <i>P. aeruginosa</i>	32
7.3. Supervivencia de ratones infectados vía intraperitoneal con <i>P. aeruginosa</i>	35
7.4. Supervivencia en ratones con lesión producida por daño térmico e infección con <i>P. aeruginosa</i>	36
7.5. Efecto del extracto de hexano de la corteza de <i>A. adstringens</i> en la supervivencia de ratones con lesiones provocadas por daño térmico e infectadas con <i>P. aeruginosa</i>	39
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	45
10. BIBLIOGRAFÍA	46
11. GLOSARIO	55
12. ANEXOS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Amphipterygium adstringens</i>	4
Figura 2. Distribución geográfica de <i>A. adstringens</i> en México.....	5
Figura 3. Componentes y mecanismo general del funcionamiento del sistema de percepción de quórum.....	10
Figura 4. Sistema de percepción de quórum, componente central de múltiples funciones en las comunidades bacterianas.....	14
Figura 5. Mecanismo de sistema de percepción de quórum.....	15
Figura 6. Modelo de infección con implante.....	16
Figura 7. Modelo de infección pulmonar.....	17
Figura 8. Estructuras inhibitoras de percepción de quórum evaluadas en modelos animales	18
Figura 9. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 WT y mutante de PA14 Δ LasR	24
Figura 10. Cuarto de experimentación Laboratorio de Fitoquímica Colpos.....	25
Figura 11. Fotografía que muestra la parte dorsal de los animales rasurada y que fue expuesta al daño térmico.....	26
Figura 12. Anestesia, inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico.....	27
Figura 13. Inoculación bacteriana.	28

Figura 14. Aplicación tópica del extracto de hexano en la lesion.....	28
Figura 15. Diagrama de flujo del método empleado.....	30
Figura 16. Cromatoplasmas de estándares de referencia y extractos de hexano...	31
Figura 17. Diseño del equipo para producir lesiones por daño térmico.....	33
Figura 18. Modelo de quemadura y procedimiento de lesión por daño térmico....	34
Figura 19. Porcentaje de supervivencia de ratones infectados intraperitonealmente con distinta carga bacteriana (U.F.C.) <i>P. aeruginosa</i> PA14 WT.....	35
Figura 20. Porcentaje de supervivencia en ratones con lesión producida por daño térmico e infectados, vía subcutánea con cepas de <i>P. aeruginosa</i>	37
Figura 21. Placas de agar Lb en el que se muestra la presencia de <i>P. aeruginosa</i> PA14WT aislada de ratones infectados	38
Figura 22. Porcentaje de supervivencia en ratones lesionados e infectados con 10^7 U.F.C de <i>P. aeruginosa</i> PA14K.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Modo de empleo de *Amphipterygium adstringens* para tratar distintos padecimientos.....7

Tabla 2. Compuestos aislados a partir de la corteza de *Amphipterygium adstringens*..... 12

Tabla 3. Análisis comparativo de las condiciones empleadas en estudios previos que emplean el modelo de lesión por daño térmico..... 19

ABREVIATURAS

AI	Autoinductores
CCF	Cromatografía en capa fina
I-SPQ	Inhibición de los Sistemas de Percepción de Quórum
NADPH	Dinucleótido de Adenina Nicotinamida Fosfato
PBS	Amortiguador de fosfatos (phosphate buffer solutions)
PQ	Percepción de Quórum
SPQ	Sistemas de Percepción de Quórum
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
nm	nanómetros
msnm	metros sobre el nivel del mar
LAS I	Autoinductor que se difunde al medio extracelular se acumula y vuelve a entrar a la célula por mecanismo de difusión.
RhII	Gen que Induce la síntesis de los factores de adhesión y virulencia.

RESUMEN

La resistencia bacteriana es un grave problema de salud pública en el nivel mundial. La presencia de cepas antibiótico multiresistentes en pacientes con quemaduras mayores provoca la muerte de los individuos debido a un proceso infeccioso no controlado más que a las lesiones mismas. *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales bacterias que infecta tejido quemado, esta presenta la peculiaridad de resistir un gran número de antimicrobianos, además de poseer una capacidad intrínseca para desarrollar resistencia a los antibióticos. Recientemente se ha propuesto el empleo de moléculas antivirulencia del tipo de los inhibidores de sistemas de percepción de quórum (I-SPQ) para combatir infecciones causadas por esta bacteria. Se ha reportado que diversos fitoquímicos tienen este efecto, uno de ellos es el extracto de hexano y los ácidos anacárdicos de la corteza de “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*). Además de, la corteza contiene metabolitos terpénicos con propiedad antimicrobiana, antiinflamatoria y cicatrizante. Por ello ha sido muy utilizado en medicina tradicional para tratar lesiones. En la siguiente investigación tuvo como objetivo desarrollar un modelo de lesión por daño térmico e infección por *P. aeruginosa*, así como la evaluación de la supervivencia de los animales tratados con el extracto de hexano de la corteza de “cuachalalate”. El material biológico fue colectado en un mercado de plantas medicinales en el estado de Morelos y la identificación de sus componentes se realizó mediante cromatografía en placa fina con estándares de referencia. El extracto de hexano fue obtenido por extracción continua en un sistema Soxhlet. Se desarrolló un modelo que permite generar lesiones homogéneas, así como la infección por *P. aeruginosa*. Bajo las condiciones experimentales empleadas no se registró un efecto positivo en el aumento de la supervivencia de ratones tratados tópicamente con el extracto hexánico a 55.3 mg/ml, no obstante, tampoco se registró para la sulfadiazina de plata usada como control positivo.

1. INTRODUCCIÓN

La Asociación Americana de Quemaduras estima que de aproximadamente 500,000 casos en los Estados Unidos que fueron tratados en los últimos años por lesiones térmicas, 4000 (0.8%) resultaron en decesos (American Burns Association, 2007). Asimismo, la Organización Mundial de la Salud reportó que el 90% de las quemaduras ocurre en países en vía de desarrollo, en donde se estima una probabilidad de muerte del 100% de los pacientes cuando las lesiones son mayores al 40% de la totalidad del cuerpo (Potokar *et al.*, 2008). En México las quemaduras son reportadas dentro de los primeros cinco lugares en etiología de infecciones nosocomiales (Dirección General de Salud Pública de México, 2004). No obstante, las estadísticas anteriores, reportan que el 75% de los decesos de los pacientes quemados es debido a infecciones no controladas causadas por cepas antibiótico resistentes, más que por las lesiones (McManus *et al.*, 1985).

En las últimas décadas, la resistencia bacteriana a los antibióticos representa un serio problema de salud pública en el nivel mundial (Casellas, 2011). La presencia de cepas multiresistentes es cada vez más común, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas de tratamiento, así como nuevos mecanismos de acción distintos al de los antibióticos (Hirsch y Tam 2010).

Una de las principales bacterias que infectan las lesiones por quemaduras térmicas es *Pseudomonas aeruginosa*, la cual se asocia con la muerte de más del 75% de los pacientes con quemaduras mayores (McManus *et al.*, 1985). El daño causado por esta bacteria se debe a la producción de numerosos factores de virulencia que favorecen su rápida colonización del tejido quemado, el cual le proporciona un ambiente húmedo y rico en nutrientes (Schaber *et al.*, 2007).

Existen diversos estudios en los que se ha empleado el modelo de lesión por daño térmico e infección por *P. aeruginosa* en ratones (Stieritz y Holder, 1975;

Rumbaugh, 1999; Lesic *et al.*, 2007). Este modelo ha ayudado a comprender el papel que juega la bacteria en el daño al tejido, además permiten el estudio de nuevos antibacterianos que contrarresten más eficientemente la infección (Papaioannou *et al.*, 2013).

México cuenta con una riqueza importante de recursos naturales, de ellos las especies vegetales son una fuente valiosa para la obtención de nuevos fármacos y tratamientos que ayuden a solucionar problemas de salud como las quemaduras y las infecciones bacterianas. En este aspecto durante muchos siglos, la medicina tradicional mexicana ha sido un recurso empleando por diversos sectores de nuestra población, en el que el uso empírico ha sido la principal evidencia para avalar su uso.

Una de las plantas que ha sido empleada desde tiempos prehispánicos para tratar distintos padecimientos es la corteza de *Amphipterygium adstringens* “cuachalalate”. Es un árbol dioico de 5 a 10 metros localizado en el centro y sur de México, aunque su distribución se ha reportado se extiende hasta Centroamérica (Linares *et al.*, 1999). A la corteza se le atribuyen propiedades medicinales y se recomienda su empleo para tratar gastritis, úlceras, cáncer de estómago, como antimicrobiano y para tratar lesiones en general (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

En la corteza de esta especie se han identificado terpenos y fenoles como los metabolitos activos responsables del efecto antiinflamatorio, gastroprotector, cicatrizante y antimicrobiano (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007; Rosas, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2013). Para el extracto se ha reportado actividad antiinflamatoria, cicatrizante y antimicrobiana de la corteza en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007), Así Castillo-Juárez *et al.*, 2013 recientemente publicó que el extracto de hexano presenta un mecanismo de

acción antivirulencia del tipo inhibidor de sistema de percepción de quórum (PQ) en *P. aeruginosa*. Las propiedades medicinales de *A. adstringens* sugieren que el extracto de hexano de la corteza puede ayudar en el tratamiento de lesiones causadas por daño térmico infectadas con *P. aeruginosa*. De tal manera, el presente proyecto tiene como objetivo desarrollar un modelo de lesión por daño térmico e infección con *P. aeruginosa* en ratones, así como la evaluación del posible efecto protector del extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens*.

2.- MARCO TEÓRICO

2.1 *Amphipterygium adstringens* “cuachalalate”.

La familia Anacardiaceae comprende aproximadamente 600 especies distribuidas y 74 géneros, localizados en zonas tropicales de todo el mundo, con algunos representantes en zonas templadas (Ding, 1978; Judd *et al.*, 2002).

Amphipterygium adstringens es un árbol dioico de 5 a 10 m alto, tronco torcido, corteza lisa con grandes escamas engrosadas y suberificadas pardo-grisácea, con látex blanco astringente, de olor picante (Estrada, 1985) (Zamora-Tirado, 2003). (Figura 1A). Hojas alterno espiraladas, oblongas u oblongo-lanceoladas de 6 a 15 cm de largo, agrupadas en los ápices de las ramas, haz verde opaco y envés verde grisáceo. Las flores pueden estar solitarias o agrupadas, ovario bicarpelar, seminíferos, Frutos nueces alargadas, amarillenta o pardo rojizos, alados, 2.5 - 5.0 cm de longitud, semillas 1 a 2 aplanadas, 5.0 mm de largo, sin endospermo, embrión grande (Standley, 1926; Hutchinson, 1973; Martínez, 1987; Niembro, 1989; Martínez, 1992; Argueta *et al.*, 1994). (Figura 1B).

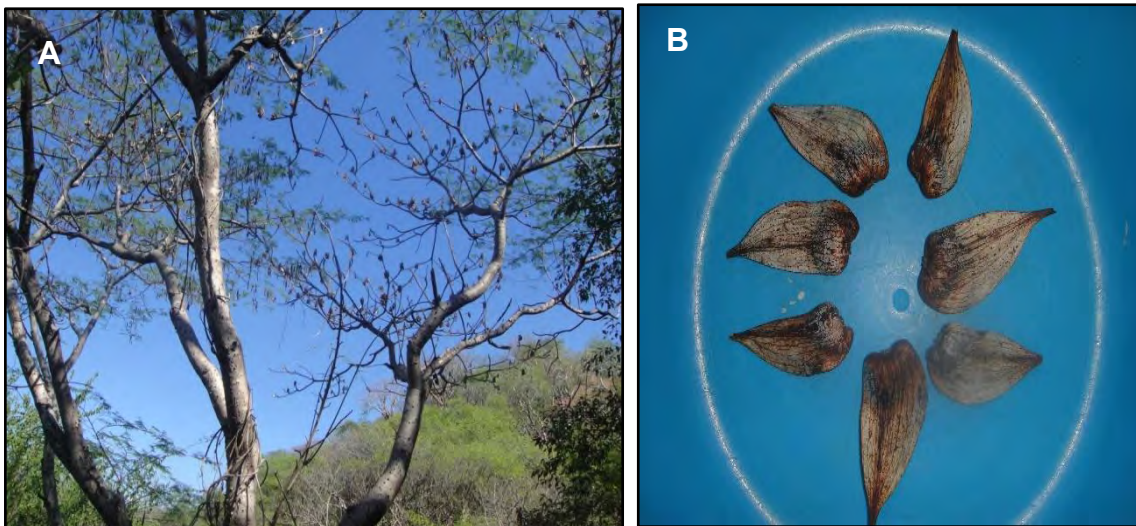


Figura 1. A) Árbol de *Amphipterygium adstringens*. **B).** Frutos alados. Fotografías tomadas en el municipio de “cerro colorado” en Guerrero por María del Rosario Hortensia Gómez Salgado y José Ángel Beltrán Gómez en 2015.

Amphipterygium es un género americano. Se distribuye desde México hasta el Perú. En nuestro país se localiza del pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, (Heywood, 1978; Stevens *et al.*, 2001). *Amphipterygium adstringens* es una especie nativa de México se distribuye en los estados de Guerrero, Morelos, Michoacán, Ciudad de México, Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Chiapas, Oaxaca (Grayum *et al.*, 2008). Esta especie habita en climas cálidos, semicálidos y templados con una temperatura media anual de 24.1°C, desde los 100 a los 3000 msnm. Crece en zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino (Argueta *et al.*, 1994) (Figura 2).



Figura 2. Mapa de distribución de *A. adstringens* en México (Cuevas, 2005).

2.1.2. Taxonomía.

De acuerdo con la base de datos APG III, 2009 la nomenclatura de *Amphipterygium adstringens* es la siguiente:

Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Rosanae
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Genero	<i>Amphipterigyum</i>
Especie	<i>Amphipterigyum adstringens</i> (Schltdl.) Standl.
Sinónimos	<i>Juliana adstringens</i> (Schltdl.) Standl.(1843). <i>Hypopterygium adstringens</i> Schltdl. (1843).

2.1.3. Uso etnobotánico

La importancia biológica y económica del *Amphipterygium adstringens* se basa en el uso medicinal de su corteza principalmente. Se conocen aproximadamente 44 usos terapéuticos tradicionales, entre el destaca el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estómago, gastritis, pesadez estomacal y lesiones cutáneas. También se ha registrado su empleo en infección vaginal, fiebre puerperal, flujo vaginal anormal, la inflamación y la caída de la matriz y de ovarios. Otros usos se encuentra el tratamiento de infecciones bucales como estomatitis herpética y aftosa, dolor de muelas y para endurecer encías, es recomendado para tratar enfermedades del hígado y de la vesícula, así como para la tifoidea. Para padecimientos respiratorios como la tos, resfriado, tuberculosis y enfermedades pulmonares. Otras propiedades que se le atribuyen son calmante, antibiótico,

hipocolesterolseminente, antiinflamatorio y algunos otros usos como son rozaduras en los bebés, golpes, mordeduras o piquetes de animales venenosos, para tratar infecciones renales, fiebre intermitente, paludismo, caída de cabello, manchas en la piel, gangrena y diabetes (Hersch-Martinez, 1995; Argueta *et al.*, 1994; Olvera., 1999).

A continuación se muestra el modo de empleo de la corteza de acuerdo al tipo de padecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Modo de empleo de la corteza de *Amphipterygium adstringens* en distintos padecimientos.

PADECIMIENTO	EMPLEO DE LA CORTEZA
Gastritis y úlceras gástrica	50g de corteza en un litro de agua y se toma como agua de uso (Rojas,1986).
Úlcera gástrica	Junto con árnica en infusión, antes de cada alimento (Baytelman y Avilés, 1981).
Gastritis	Junto con corteza de encino y “cancerina” en cocimiento. Tomar una taza de té tres veces al día (Rojas, 1986).
Infecciones vaginales, caída de matriz y de ovarios	El cocimiento se aplica en formas de lavados vaginales.
Heridas	Se lavan las heridas con la infusión. También puede aplicarse el polvo formado por sobre la herida directamente.
Pulmones y tos	Hervida y tomada como agua de uso
Riñones	Tomada diariamente junto con palo de tres costillas se (Bayertelman y Avilés, 1981).
Raspaduras, cortadas	Se utiliza como sustituto de “merthiolate” se realiza la extracción con alcohol al 96% dejándose reposar por tres días para después filtrarlo (Magdaleno, 1987).

2.1.4. Actividad de *A.adstringens*

Actividad antiinflamatoria. De acuerdo con (Ortega *et al.*, 1999). El terpeno 3 α -hidroximasticadienónico presentó una actividad del 93% en la inhibición de edema en ratones, después de tres horas de haberse administrado el tratamiento a una dosis de 10 mg/Kg . (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004) estudiaron el extracto de hexano de la corteza y documentaron la actividad antiinflamatoria tanto en ratas Wistar con edema en la oreja inducido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato) y en ratones CD1 con edema en la pata inducido con el reactivo carragenan. Los resultados mostraron una actividad antiinflamatoria del 49.1% dosis dependiente, utilizando el modelo con TPA, sin embargo, el extracto acuoso no fue activo (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). Mientras tanto utilizando el modelo de inducción con carragenan, el extracto acuoso presento una mayor actividad antiinflamatoria que el extracto de hexano con un 73.5% a una dosis de 100 mg/kg, contra 14.4% respectivamente con la misma dosis. Los autores atribuyen que esto se debe a que los extractos cuentan con diferentes mecanismos de acción antiinflamatoria.

Los terpenos ácido masticadienónico y el 3 α -hidroximasticadienónico, bajo el mismo modelo presentaron una actividad antiinflamatoria del 44% a 100 mg/kg, actividad menor a los extractos crudos, lo que indica que existan más compuestos aun no identificados en el extracto que en conjunto actúan sinérgicamente (Chávez *et al.*, 2004).

Actividad cicatrizante. (Resenos, 2003).En un estudio con ratas Wistar se midió el porcentaje de contracción de heridas, así como el contenido de colágeno de lesiones tratadas con diferentes dosis de extracto de metanol (3, 10, 30 y 100 mg). Los resultados no mostraron algún aumento en la velocidad de contracción, ni en la cantidad de colágeno, pero si una mejor epitelización y remodelación de la cicatriz, lo que favoreció la mejoría de la herida evitando que en el tejido queden marcas antiestéticas.

Actividad antimicrobiana. El extracto de metanol presentó actividad bactericida en especies de *Staphylococcus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes* y *E. agglomerans* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) 0.125 - 2.0 mg/ml (Canales *et al.*, 2005). De igual manera, los medios preparados con la corteza molida (polvo) tuvieron actividad antifúngica, principalmente en la inhibición del desarrollo del micelio y la esporulación del hongo *Fusarium moniliforme*, con una actividad del 60% en la reducción del crecimiento micelial y un 40% en la reducción de la esporulación (Luna *et al.*, 2000). El extracto de hexano al igual que una mezcla de ácidos anacárdicos muestran actividad bactericida sobre la bacteria *Helicobacter pylori*, la cual es causante de la gastritis crónica activa, úlcera péptica y cáncer gástrico (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

Así mismo, el extracto de metanol presentó actividad antimicrobiana contra patógenos orales como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. La cepa más sensible fue *S. mutans* con un (CMI) de 0.125 mg/mL y una concentración mínima bactericida (MBC) de 0.31 mg/mL; mientras que para cepas de *Candida* mostró una (CMI) y (CMB) de 0.4 mg/mL y 1.6 mg/mL respectivamente (Rodríguez-García *et al.*, 2015).

Inhibidor de sistemas de percepción de quórum bacteriano. La resistencia a los antibióticos es un grave problema de salud pública que requiere de nuevas opciones para el control de las infecciones bacterianas (Tegos y Hamblin 2013). Una alternativa que se ha propuesto en años recientes, es el empleo de moléculas que inhiben la comunicación bacteriana o sistemas de percepción de quórum (SPQ) (Galloway, 2012). Los SPQ regulan los factores de virulencia en bacterias patógenas, los cuales se expresan únicamente cuando se alcanza un umbral relacionado con el número celular (Tang y Zhang 2014). Los SPQ son un proceso de comunicación bacteriana que depende de la densidad celular. Esta comunicación involucra la generación de pequeñas moléculas

difusibles llamadas autoinductores (AI), las cuales son producidos por una sintasa y posteriormente son liberados al medio. Como consecuencia los (AI) se acumulan en proporción a la densidad bacteriana y una vez que alcanzan la concentración extracelular, una cascada de señales de transducción provoca cambios en la expresión de genes, dando como resultado la iniciación del comportamiento patógeno de la comunidad de manera coordinada (Galloway, 2012) (Figura 3).

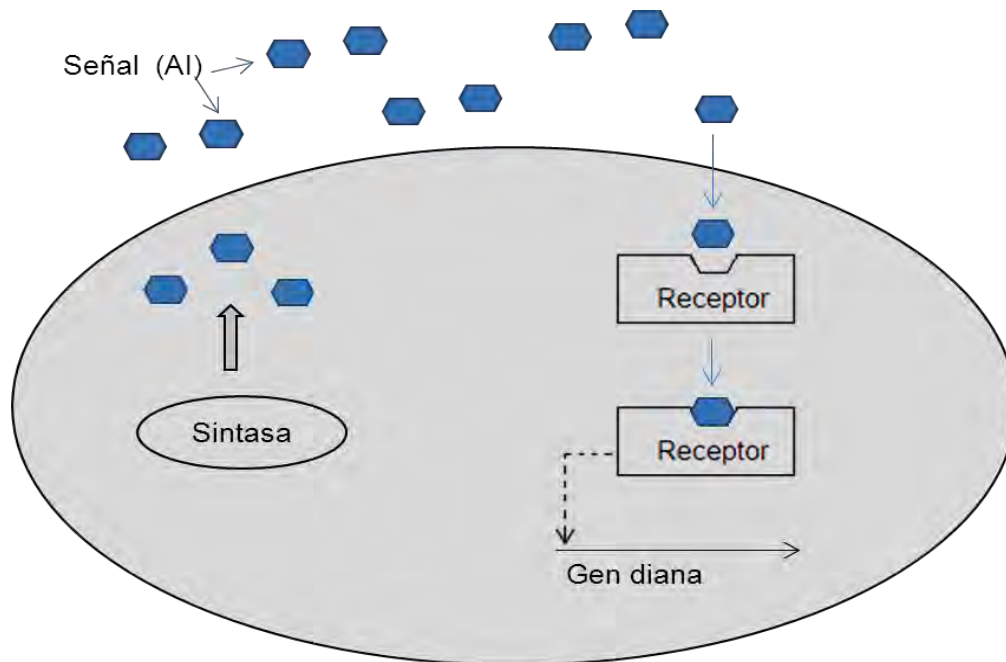


Figura 3. Componentes y mecanismo general del funcionamiento del Sistema de Percepción de Quórum (Tomado de Pérez-Lopez, 2015).

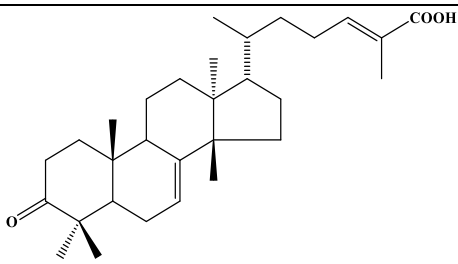
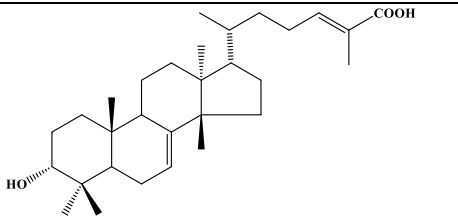
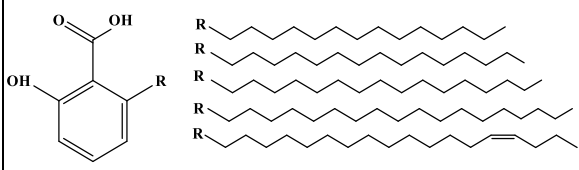
El modo de acción y blanco de las moléculas I-SPQ es distinto al de los antibióticos, debido a que no actúan directamente eliminando a las bacterias, lo que evita la aparición de resistencia al no haber presión de selección (Clatworthy *et al.*, 2007). Existen referencias que plantean que la inhibición de la comunicación bacteriana vía la interrupción de los SPQ puede ser aplicado a bacterias patógenas, inclusive aquellas que causan infecciones nosocomiales como es el caso de *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). Los SPQ de *P. aeruginosa* coordinan entre otras funciones la expresión de factores de virulencia, como los que se encuentran la producción de piocianina (fenazina con actividad redox que

presenta propiedades antimicrobianas y que es tóxica para las células de mamíferos, ya que genera especies reactivas de oxígeno y depleta los pozos de NADPH, pioverdina (sideróforo que se encarga de captar e internalizar hierro), rhamnolípidos (moléculas anfífilas que son biosurfactantes implicados en el nado tipo enjambre, la arquitectura de las biopelículas, la disolución de las membranas de los hospederos) y elastasas (serin proteasas que rompen a la elastina una de las proteínas principales de las fibras del tejido conectivo (Tan *et al.*, 1999). El SPQ en ésta bacteria regula la movilidad y la formación de biopelículas, las cuales son agregados de células que se adhieren a otras y/o a una superficie mediante una matriz de diversos polímeros extracelulares y están implicadas en la persistencia de infecciones crónicas, la resistencia a diversos tipos de estrés y la producción de moléculas de adhesión, proteasas, toxinas y sideróforos (Tan *et al.*, 1999). En estudios recientes, se ha publicado que el extracto de hexano y los ácidos anacárdicos de *A. adstringens* inhiben la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa* como la pioverdina, rhamnolípidos y la actividad de elastasa (Castillo-Juárez *et al.*, 2013).

2.1.5 Estudios fitoquímicos de *A. adstringens*.

Para el de extracto de la corteza se ha reportado actividad antiinflamatoria, cicatrizante y antimicrobiana de la corteza en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007; Castillo-Juárez *et al.*, 2013). Sin embargo, el efecto antiinflamatorio, gastroprotector, bactericida e I-SPQ de *A. adstringens* es atribuido principalmente a la corteza en la que se han identificado básicamente moléculas terpénicas como el ácido masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico; y fenólicas tal es el caso de los ácidos anacárdicos (INI, 1994; Rosas, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos aislados de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
ácido masticadienónico		Navarrete <i>et al.</i> , 2006
ácido 3 α - hidroximasticadienónico		Navarrete <i>et al.</i> , 2006
ácidos anacárdicos		Mata <i>et al.</i> , 1991

2.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos.

Las complicaciones clínicas provocadas por *P. aeruginosa* representan un problema de salud grave no solo en México sino a nivel mundial, al ser un patógeno con una capacidad intrínseca de tolerar dosis masivas de antibióticos y desinfectantes, así como con una notoria habilidad para adquirir o desarrollar mecanismos de resistencia contra nuevos antimicrobianos (Lambert, 2002).

La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* soportan altas dosis de β -láctamicos, quinolonas y aminoglucosidos, pues utilizan betalactamasas, tienen baja permeabilidad de la membrana externa y las mutaciones en porinas que evitan la entrada de los antibióticos o la activación de bombas proteína-mex (Lambert, 2002).

2.3. Quemaduras y *P. aeruginosa*

La asociación americana de quemaduras estima que tan solo en los Estados Unidos son tratados aproximadamente 500,000 individuos por lesiones termales en los últimos años, resultando en la muerte de 4000 de ellos (American Burns Association 2007). En México, las quemaduras se reportaron dentro de los cinco primeros lugares en la etiología de infecciones nosocomiales (Dirección General de Salud Pública de México, 2004). La Organización Mundial de la Salud registra que el 90% de las quemaduras ocurre en países en vías de desarrollo, y se estima la muerte del 100% cuando las lesiones son mayores al 40% en la totalidad del cuerpo (Potokar *et al.*, 2008). El 75% de los decesos de los pacientes quemados se debe principalmente a infecciones no controladas, primordialmente por cepas resistentes a antibióticos (McManus *et al.*, 1985).

P. aeruginosa es una bacteria que se establece en lesiones y se asocia con la muerte del más del 75% de los pacientes con quemaduras mayores (McManus *et al.*, 1985). Fue aislada por primera vez a partir de muestras ambientales por Schroeter en 1872. Las colonias de *P. aeruginosa* son pigmentadas, y su nombre deriva de la palabra aeruginoso (*aeruginous*) que significa el “color del cobre oxidado”, debido al característico color azul-verdoso que presentan las colonias por la producción de pigmentos (Palleroni, 1992).

2.4. Percepción de Quórum en *P. aeruginosa*.

La PQ es un proceso de comunicación bacteriana dependiente de la densidad de bacterias presentes, este proceso implica pequeñas moléculas señal que activan la expresión de numerosos genes que controlan diversas funciones como la bioluminiscencia, factores de virulencia, la formación de biopelículas y esporulación por nombrar algunas. Desde que se sabe que la PQ es responsable de la producción de factores de virulencia en bacterias clínicamente relevantes, la inhibición parece ser una estrategia prometedora para controlar la patogenicidad bacteriana (Ashima, *et al.*, 2013) (Figura 4).

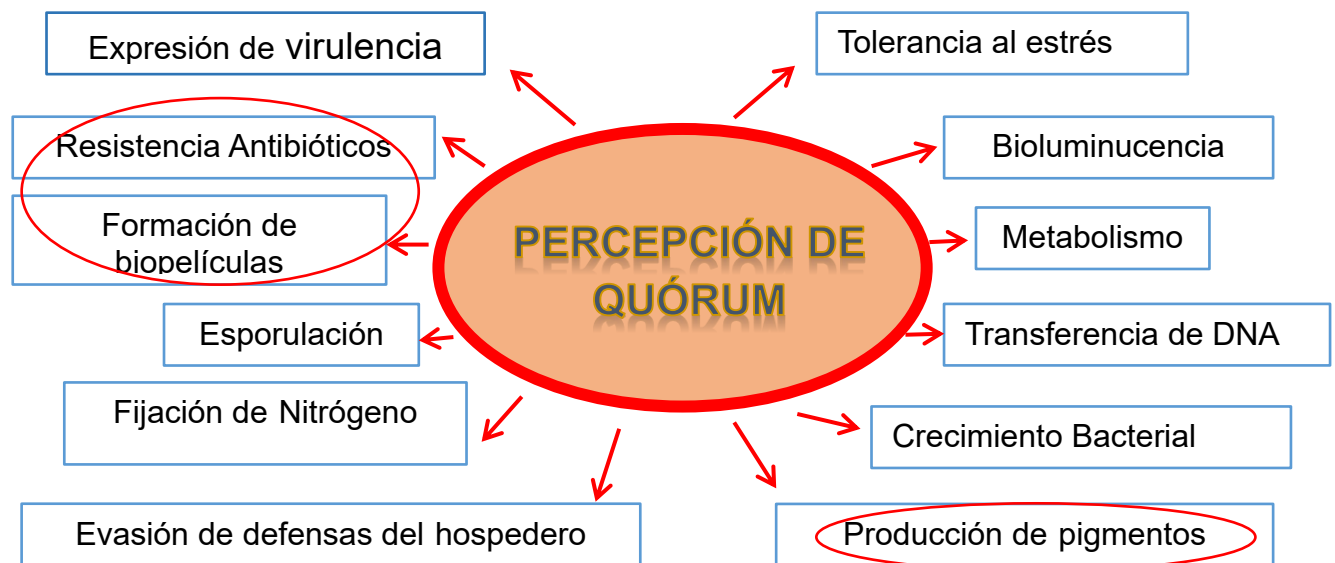


Figura 4. Sistema de percepción de quórum, componente central de múltiples funciones en las comunidades bacterianas. Tomado y modificado de (Ashima *et al.*, 2013).

La patogenicidad de *P. aeruginosa* es atribuida a la producción de factores de virulencia que incluyen exotoxina A, exoenzima S, elastasas (Las A y Las B), proteasa alcalina y fosfolipasas C (Berk *et al.*, 1981; Gilligan, 1991; Homma, 1980; Nicas *et al.*, 1985). Estas son reguladas por PQ que es un mecanismo que la bacteria usa para asegurar el suficiente número de estas para provocar una respuesta biológica a un estímulo externo. Esto incluye la expresión de un gran número de genes que permiten a la bacteria trabajar en unión durante la interacción microbio-microbio u hospedero-microbio (Williams *et al.*, 2007) El sistema de PQ involucra la generación de moléculas señal, en donde los genes *Las I* y *RhlI* codifican a las sintasas responsables de la producción de moléculas N-acyl homoserin lactonas. La acumulación de éstas moléculas señal en el medio a cierto umbral de concentración induce el reconocimiento hacia un receptor (ya sea Las R o RhlR) y la expresión de varios genes relacionados con la colonización en la infección (Miller y Bassler 2001) (Figura 5). Mediante este proceso las bacterias regulan actividades como los factores de virulencia, formación de biopelículas, luminiscencia y transferencia de DNA entre otras.

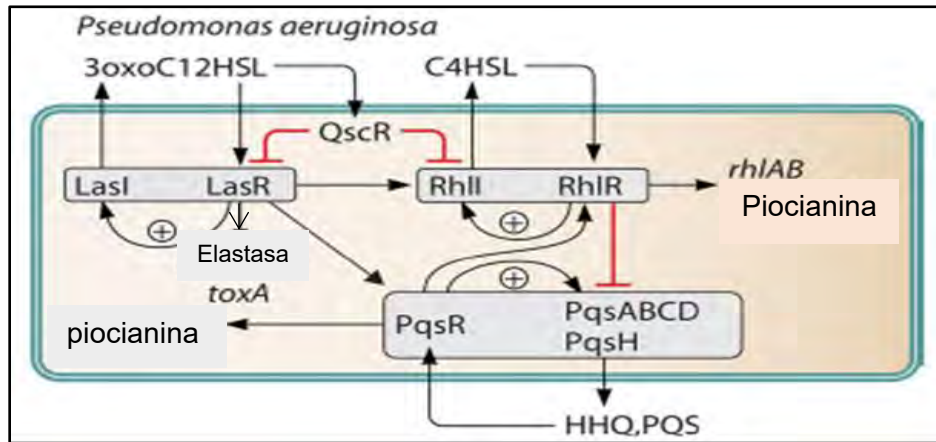


Figura 5. Mecanismo de sistema de percepción de quórum. Tomado y modificado de (Pérez, 2015).

2.5. Modelos animales infectados con *P. aeruginosa*.

Algunos modelos animales que incluyen al nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y al pez cebra (*Danio rerio*) han sido empleados para definir el papel que juega la virulencia en la patogenicidad de *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de modelos con roedores sigue siendo el sistema más importante por las similitudes fisiológicas con los seres humanos. Existen diferentes protocolos propuestos y empleados para determinar la participación de SPQ y la patogenicidad de *P. aeruginosa* y que se mencionan a continuación (Bjarnsholt *et al.*, 2010; Papaioannou *et al.*, 2013).

En el *modelo de infección por cuerpo extraño* se implanta un fragmento de silicón previamente inoculado con *P. aeruginosa* en la cavidad peritoneal del ratón (Bjarnsholt *et al.*, 2010) (Figura 6).

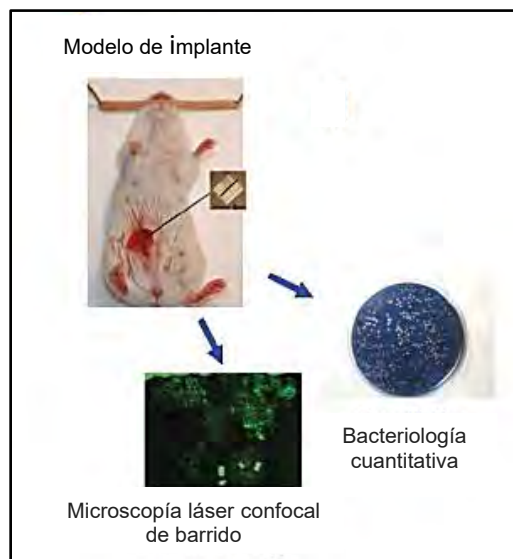


Figura 6. Modelo de infección del implante tomado y modificado de (Bjarnsholt *et al*, 2010).

Este modelo es principalmente empleado para determinar la participación del SPQ en la formación de biopelículas y en el que se ha visto que mutantes $\Delta lasR/rhlR$ se eliminan del implante en las primeras 7 horas comparadas con la cepa PAO1WT. Aunque existen diferencias en la cepa de ratón empleada, ya que en Balb/c la cepa PAO1 declina la infección dentro del implante 21 horas después, mientras que con la cepa NMRI se sigue manteniendo, además de que muestra un incremento de 10^6 U.F.C a las 15 h (Christensen *et al*, 2007).

Con el modelo de cuerpo extraño, se ha determinado el efecto de la limpieza de los implantes por parte de la furonona C-30 (Figura 8A) cuyo blanco son diversos activadores transcripcionales de la familia LuxR (Hentzer, *et al.*, 2003). Administrado intraperitonealmente este metabolito mostró una significativa reducción de la presencia de PAO1 en los implantes, comparados con el grupo control (Christensen *et al.*, 2007). Un efecto positivo también se observa en el *modelo de infección pulmonar* en ratones (Figura 7) y junto con la furonona C-56 (Figura 8B) aceleraron la eliminación de la bacteria en los pulmones, reduciendo la severidad del daño y aumentando la supervivencia de los ratones (Song 2004).

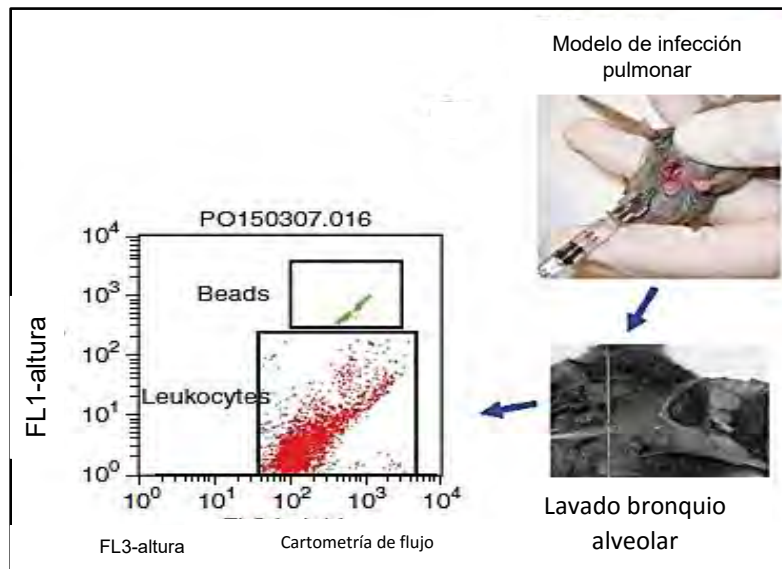


Figura 7. Modelo de infección pulmonar. (Tomado y modificado de Bjarnsholt *et al.*, 2010).

El ajoeno sintético (Figura 8C) presenta atenuación de diversos factores de virulencia regulados por SPQ de *P. aeruginosa*. En el modelo de infección pulmonar en ratón infectado con PAO1, la administración profiláctica de dos días y durante el periodo de experimentación, redujo las U.F.C. en los pulmones de los animales tratados, (Jakobsen, *et al*, 2011).

Otro modelo empleado para estudios de PQ y virulencia en *P. aeruginosa* es el de *lesión por daño térmico* desarrollado por Stieritz y Holder (Stieritz y Holder, 1975). Este modelo consiste en producir una quemadura de tercer grado en la parte dorsal de los ratones con agua a 90°C y posteriormente una inoculación de *P. aeruginosa*. Empleando la mutante *P. aeruginosa* PAO1-R1 ($\Delta lasR$), se observó una disminución de la bacteria en su capacidad de diseminación al sistema, así como en la dispersión en la lesión en estadíos tempranos (Rumbaugh, 1999). También, los ratones infectados con $\Delta rhII$ mostraron una supervivencia del 70% (Lesic *et al.*, 2007). Del mismo modo, la virulencia se redujo con PAO1 $\Delta lasR$, $\Delta lasI$, o $\Delta rhII$ registrando. El mayor efecto lo registro la doble mutante $\Delta lasI-rhII$ que disminuyó la mortalidad de los animales en un 87.6% y se redujo el número de U.F.C en lesión, hígado y bazo, se retrasó la dispersión de la infección de la lesión en estadíos tempranos, hasta por 16 horas (Rumbaugh, 1999).El modelo de

quemadura, la administración intravenosa de 6FABA, 6CABA y 4CABA , restringen la diseminación sistémica de la cepa PA14, así como la muerte de los animales de un 30 al 50% . El ácido 2-amino-6-clorobenzoico (6 CABA), ácido 2-amino-6-fluorobenzoico (6 FABA) y ácido 2-amino-4-clorobenzoico (4 CABA) (Figuras 8 D-F), derivados halogenados del ácido antranílico, tienen como blanco la inhibición de la biosíntesis de autoinductores y el bloqueo de la expresión de genes dependientes de MvfR (Lesic *et al.*, 2007).

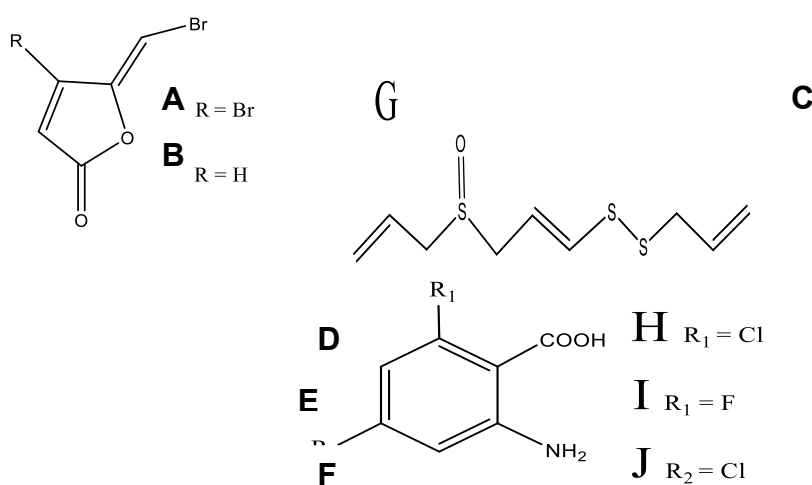


Figura 8. Estructuras inhibitoras de percepción de quórum evaluadas en modelos animales con infección de *P. aeruginosa*. **A:** furonona C-30. **B:** furonona C-56. **C:** ajoeno 4,5,9,-trithiadodeca-1,6,11-trieno-9-oxido. **D:** ácido-2-amino-6-clorobenzoico. **E:** ácido -2-amino-6-fluorobenzoico. **F:** ácido 2-amino-4-clorobenzoico. Tomado y modificado de Castillo Juárez *et al.*, 2015.

Con respecto al modelo de lesión por daño térmico, en ratones e infección con *P. aeruginosa* existen variantes (Tabla 3).

Como el uso de distintas cepas bacterianas, y de ratones, cantidad de inóculo bacteriano, así como el tamaño en el área de lesión y porcentajes de supervivencia.

Tabla 3. Análisis comparativo de las condiciones empleadas en estudios previos que emplean el modelo de lesión por daño térmico.

	Rumbaug <i>et al.</i> , 1999.	DeLeon <i>et al.</i> , 2009.	Lesic <i>et al.</i> , 2007.	En este estudio.
Cepa, edad, sexo y peso del ratón	Swiss webster, "adultos", hembras, 20-24g.	Swiss webster, 6 - 8 semanas, hembras, 17-20g.	CD 1, 6 semanas.	CD1, 4-6 semanas, hembras, 20-30g.
Área de lesión	4.5 x 1.8 cm	4.5 x 1.8 cm	-----	2 x 1 cm
Superficie total (%)	15	15	5 al 8	6.6
Cepa <i>P. aeruginosa</i>	PAO1	PAO1	PA14	PA14 y Δ LasR
Tiempo del experimento	5 días	7 días	-----	3-10 días
U.F.C.	2 x10 ² y 3 x 10 ²	2 x10 ² y 2 x 10 ³	5X 10 ⁵ U.F.C.	1 x 10 ⁷
% de muertes debido al inóculo	94 al 100%	82 al 90%	90%	70-100 %
Terapia de remplazamiento de fluidos	0.8 ml de NaCl al 0.9%	0.8 ml de lactato de Ringers.	-----	0.1ml de solución Hartman.
Muerte postinfección.	48 h a 5 días pos-infección	24 h a 7 días post infección	-----	48 h a 5 días post infección
Evaluación de infección y daño	Cantidad de bacterias en lesión, hígado y bazo.	Cantidad de bacterias en lesión, hígado y bazo.	Cantidad de bacterias en lesión, hígado y bazo.	Cantidad de bacterias en lesión e hígado.
Metabolito evaluado	Mutantes en genes de PQ de <i>P. aeruginosa</i>	Malonato de galio. (antipatogénico)	4 -CABA y 6-CABA, 6-FABA.	Extracto de hexano Sulfadiazina de plata
Vehículo	PBS	PBS	PBS:etanol	Tween 80

U.F.C. =unidades formadoras de colonias, **CABA**=ácido-amino-clorobenzoico, **PBS**= amortiguador de fosfatos, **FABA**= Acido amino Fluorobenzoico.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las complicaciones clínicas provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* representan un grave problema de salud en el nivel mundial. Al ser un patógeno que tolera dosis masivas de antibióticos y desinfectantes, son muy comunes los brotes de cepas multiresistentes y panresistentes en los centros hospitalarios, donde en muchas ocasiones ya no hay antibióticos que las puedan eliminar (Lambert, 2002). En las quemaduras es muy común la aparición de infecciones bacterianas, de cepas resistentes a los antibióticos que provocan que los pacientes mueran por infecciones no controladas, más que por las lesiones. México es una fuente importante de plantas medicinales que han sido empleadas por muchos siglos para aliviar enfermedades dentro de la población. Entre las especies utilizadas para combatir infecciones y lesiones es *Amphipterygium adstringens*, cuya corteza es ampliamente comercializada en México, la cual cuenta con distintos estudios en los que se ha corroborado e identificado metabolitos activos con propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y antibióticas (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007). El extracto de hexano de la corteza es rico en los compuestos activos como los triterpenos y fenoles de cadena larga. Se reportó que el extracto de hexano, así como una mezcla de ácidos anacárdicos presentes en la corteza también exhiben actividad inhibidora de sistemas de PQ en *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). Estas propiedades sugieren un gran potencial de la corteza para ser empleada en el tratamiento de quemaduras infectadas por *P. aeruginosa*. Este estudio desarrolló un modelo animal de lesión por daño térmico e infección por *P. aeruginosa* en ratones, para evaluar el efecto protector del extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens*.

4. HIPÓTESIS

Si el extracto de hexano de la corteza de *Amphipterygium adstringens* contiene metabolitos con propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y antibacterianas, además de presentar un mecanismo de acción antivirulencia del tipo inhibidor de sistema de percepción de quórum en *P. aeruginosa*, contrarrestará el daño causado por las quemaduras infectadas con esta bacteria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Diseñar un modelo de lesión por daño térmico e infección con *P. aeruginosa* en ratones para evaluar el efecto inhibitor del extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens* en el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados (Campus Montecillo).

5.2. Objetivos particulares

- Obtener el extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens* por extracción continua empleando el método Soxhlet.
- Identificar en el extracto de hexano ácidos anacárdicos y triterpenos (ácido masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico).
- Evaluar el efecto del extracto de hexano en la supervivencia de ratones con lesiones causados por daño térmico e infectadas con *P. aeruginosa*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención del material biológico.

El material biológico (corteza de *A. adstringens*) se obtuvo de un mercado de plantas medicinales, localizado en el estado de Morelos. La corteza fue transportada hasta el laboratorio en bolsas de plástico, se secaron en una estufa a 60°C por 48 horas. Posteriormente la corteza fue fragmentada en trozos de 1 a 5 cm con ayuda de un martillo.

6.2 Obtención del extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens*.

Se pesaron 40 g de corteza y se depositaron en un cartucho de papel filtro (Whatman 4), posteriormente se sometió a un proceso de extracción continua empleando el método Soxhlet, por ocho horas en reflujo a una temperatura aproximada de 60° C con hexano (J.T. Baker) (Ixtaina *et al.*, 2011). Transcurrido este tiempo se eliminó el hexano mediante un evaporador rotatorio (BUCHI-R114, Switzerland) a 40°C y se determinó el rendimiento.

6.3 Identificación de material biológico.

Se realizó la identificación de material biológico mediante el uso de cromatografía en capa fina (CCF) y estándares de referencia de los ácidos 3 α -hidroxímasticadienónico y una mezcla ácidos anacárdicos. Se utilizaron diversos sistemas de elución con hexano/acetato de etilo y placas de aluminio de sílica gel de 0.25 mm de espesor con soporte de aluminio (TLC silica gel 60 F₂₅₄ Merck). Las placas se visualizaron con luz ultravioleta (onda corta, 254nm y onda larga a 360 nm) y fueron reveladas con vainillina 2%, H₂SO₄ 10% en etanol y se calentó hasta la visualización completa de los compuestos.

6.4 Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas de *P. aeruginosa* una silvestre (wild type) PA14 y una cepa mutante denominada Δ *LasR*, ambas fueron donadas por el Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM (Figura 9).

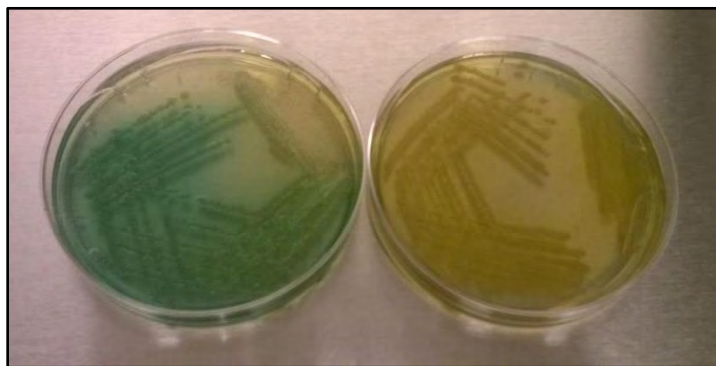


Figura 9. Cepas de *P. aeruginosa* PA14 WT (izquierda) y mutante de PA14 Δ *LasR* (derecha). En la que se aprecia una menor producción de pigmentos.

6.5. Animales.

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 con una edad de 4 a 5 semanas provenientes del Bioterio General de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron trasladados y mantenidos en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, siguiendo las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para manejo y uso de animales de laboratorio.

Para evitar o reducir la Infección por bacterias externas en las lesiones se mantuvieron en un cuarto de experimentación de 4 por 3.80 m, el cual se encuentra aislado de corrientes de aire, además de contar con un sistema de extracción (Figura 10). Las jaulas y demás equipamientos se lavaron con cloro al 10%.

Se mantuvieron en jaulas de plástico con un máximo 12 animales por jaula (32 x 47 x 20 cm), con alimentación estándar, ciclos de luz oscuridad de 12 horas y camas de aserrín estéril. (Figura 10).



Figura 10. A) Cuarto de experimentación del Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. **B)** Jaulas de (32 x 47 x 20 cm) con animales.

6.6. Inóculo bacteriano.

Las cepas fueron cultivadas en medio LB (Luria-Bertani). Se preparó un preinóculo colocando una colonia en tubos falcon con 10 mL de medio, los cuales se incubaron por 24 horas a 32°C y 150 rpm. Transcurrido este tiempo los cultivos se ajustaron a una absorbencia de $D.O_{.660nm} = 0.1$ (que equivale a 10^8 U.F.C./mL) empleado 200 μ L de inóculo y placas multipozo de 96 pozos estériles (Corning Costar).

Posteriormente, 1 mL del inóculo se centrifugó a 15,000 r.p.m., por 5 minutos en una centrifuga (Microfuge E BECKMAN, USA). Se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS estéril a la pastilla bacteriana, la cual se homogenizó en 1 ml de PBS estéril y se realizaron diluciones seriales 1/10, hasta 1×10^{-5} , que fue la dilución administrada a los animales.

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) se utilizó la metodología de cuenta viable (Reynolds, 2013). Del inóculo final, se tomaron 100 μ l y se realizaron diluciones seriales 1/10 en volúmenes de 900 μ l en PBS estéril hasta 1×10^{-10} . Se sembraron 20 μ l de las diluciones pares en una

placa de LB dividida en 5 regiones, las cuales se incubaron 37°C por dos días. Se cuantificó el número de colonias y se calcularon las diluciones que tuvieran el intervalo de 30 a 300. Para el cálculo de las U.F.C. que se inoculó a los ratones, se emplearon las siguiente formulas: número de colonias x factor de dilución = U.F.C./ 20 µl y después 300 µL x U.F.C./ 20 µl entre 20 µl = número de U.F.C./ratón.

6.7. Modelo de infección de *P. aeruginosa* en lesiones producidas por daño térmico.

Los animales fueron anestesiados 24 h antes de inducir la lesión y rasurados con una rasuradora eléctrica (WAHL CLIPPER), el exceso de pelo fue eliminado con una navaja (Figura 11).



Figura 11. Muestra el dorso de los animales en los que se eliminó el pelo y donde se indujo el daño térmico.

Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico, (PISABENTAL, PiSA) a una concentración de (63 mg/mL). Se administraron 0.35 ml por cada 20 g de peso de una solución diluida 2.06 mg/ml (Figura 12). Posteriormente los ratones fueron colocados en un templete metálico el cual tiene una abertura de (1 x 2 cm) para exponer la zona dorsal afeitada en

agua destilada a 90°C por 10 segundos y producir así una lesión por daño térmico. El daño provocado produce una quemadura de tercer grado (DeLeon *et al.*, 2009). Después del procedimiento los animales son mantenidos en una fuente de calor (calentador eléctrico) para evitar la muerte por hipotermia debida a la alta dosis del anestésico empleado.



Figura 12. Anestesia; inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico.

6.7.1. Reemplazamiento de fluidos.

La terapia de reemplazamiento de fluidos consiste en una inoculación subcutánea de 0.1 mL de solución Hartman o Lactato de sodio estéril (solución HT, PiSA). Dicha solución fue administrada inmediatamente después de provocar la quemadura.

6.7.2. Infección.

Los ratones fueron infectados por una inoculación subcutánea en la lesión de 0.1 mL de inóculo bacteriano 10^5 U.F.C. (dilución del inóculo bacteriano 1×10^{-5}) de la cepa *P. aeruginosa* PA14WT, así como la cepa mutante de PA14 Δ LasR (Figura 13).



Figura 13. Inoculación bacteriana. Se realizó mediante la inyección subcutánea de 0.1 mL en la zona de la lesión minutos después de haberla inducido.

6.7.3. Tratamientos

Se realizaron tres ensayos independientes con una $n=6$ animales. La vía de administración de los tratamientos fue tópica, con aproximadamente 0.5 mL de las muestras a evaluar y una sola aplicación cubriendo en su totalidad el área afectada. Se utilizaron el extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens* a 55.3 mg/mL diluido en tween 80 (vehículo) y como control positivo sulfadiazina de plata. Además, se emplearon como controles negativos un grupo sin tratamiento y otro con el vehículo. Se monitoreo el estado general de los animales y se registró la mortalidad durante 12 días que fue el tiempo máximo de experimentación. En la figura 15 se muestra un diagrama que resume la metodología empleada.

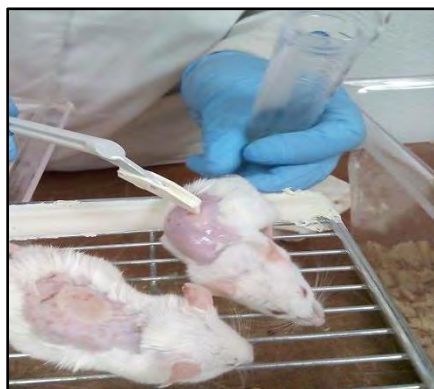


Figura 14. Aplicación tópica del extracto de hexano en la lesión.

6.7.4. Aislamiento de *P. aeruginosa* en animales infectados.

U.F.C./g de tejido: Para la lesión se diseccionó toda el área lesionada. Una cuarta parte se pesó y homogenizó en 5 mL de PBS estéril con ayuda de pinzas de disección. También, se homogenizó aproximadamente 1 gr del hígado en 5mL de PBS estéril. Para ambas muestras, se tomaron 10 µl para realizar disoluciones seriales 1/100 (10 µL + 990 µL PBS) hasta 1×10^{11} . Posteriormente se sembraron 10 µl de cada dilución, en cajas de agar Muller-Hinton con cinco divisiones.

Las placas se dejaron crecer 72 h a 37° C y se identificó la presencia de colonias de *P. aeruginosa* mediante la producción de los pigmentos piocianina y pioverdina, así como por su fluorescencia con luz ultravioleta.

6.8. Análisis estadístico

Las gráficas del porcentaje de supervivencia, se procesaron en Excell y el test de U-Man Whitney ($\alpha=0.05$) en el software SPSS versión 15 (SPSS for Windows, Chicago, SPSS Inc.).

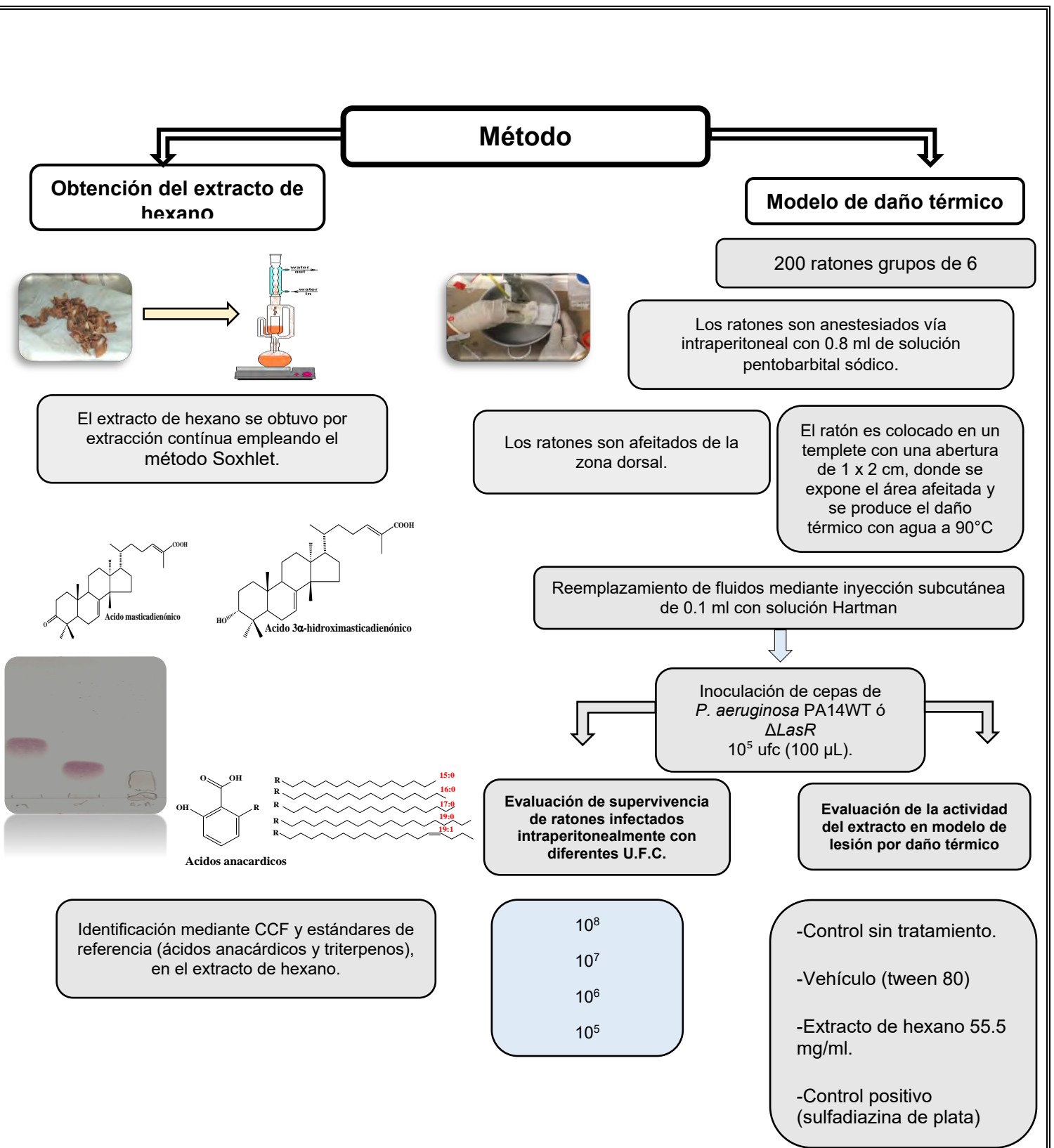


Figura 15. Diagrama de flujo del método empleado.

7. RESULTADOS

7.1.- Obtención del extracto de hexano e identificación de la corteza de *A. adstringens*.

Mediante extracción continua se obtuvo el extracto de hexano. La identificación del material biológico se realizó mediante un análisis por CCF de los principales metabolitos activos presentes en el extracto de hexano, como son los triterpenos ácido masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico y los ácidos anacárdicos (Figura 16).

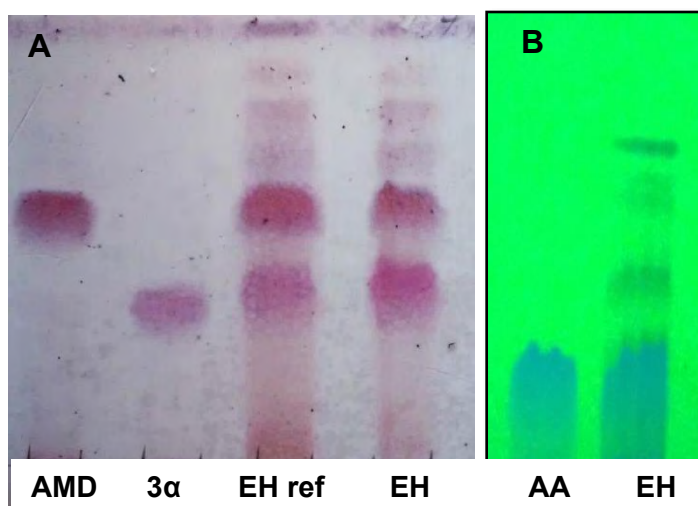


Figura 16. Cromatoplasmas de estándares de referencia y extractos hexánicos eluidos en un sistema hexano/acetato de etilo 6:4. **A)** Revelada con vainillina/ácido sulfúrico: AMD = ácido masticadienónico, 3 α = ácido 3 α -hidroximasticadienónico, EHref = extracto de hexano de referencia y EH = extracto de hexano empleado en este estudio. **B)** Estimulada con luz uv de 365 nm. AA = mezcla de ácidos anacárdicos.

Se identificaron el ácido masticadienónico y el 3 α -hidroximasticadienónico (Olvera *et al*, 1999; FEUM, 2001; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004), al igual que presentó el mismo patrón cromatográfico del extracto de hexano de referencia. (Figura 16A). También, se identificó la presencia de ácidos anacárdicos, en una señal en forma de “coquete” indicando su carácter ácido, así como emite fluorescencia cuando se estimula con luz ultravioleta debido a las dobles ligaduras del anillo aromático (Castillo-Juárez *et al.*, 2013) (Figura 16B).

7.2. Modelo de lesión por daño térmico en ratón e infección con *P. aeruginosa*

Se diseñó un sistema para inducir una lesión de tercer grado por daño térmico de 1 por 2 cm en la parte dorsal de los animales con agua a 90°C. El material utilizado en el modelo de lesión por daño térmico empleó un recipiente de aluminio de 15 cm de profundidad y un diámetro de 30 cm, al cual se añadió en el interior una resistencia eléctrica con la finalidad de que pueda calentar agua por encima de los 90°C (Figura 17 A y B). Con el mismo material se moldeó una placa metálica que sirvió para exponer la zona del animal donde se iba a producir la lesión. Esta estructura mide 19 cm por 6.5 cm con una pestaña de 3 cm en la periferia para evitar la entrada de agua a la parte superior (Figura 17C). Además, en la parte media cuenta con una abertura de 1 por 2 cm la cual es recubierta con plastilina epoxida para generar una cavidad de 1.5 cm (Figura 17 C y D). También, el templete cuenta con dos soportes a los lados con la intención de poder manipular la placa (Figura 17D).

El sistema también cuenta con una lámina de 2 cm con un orificio en el extremo donde se puede colocar el termómetro para monitorear la temperatura del agua (Figura 18 A y B).

Empleando este sistema se provocaron lesiones homogéneas de 1 por 2 cm, las cuales al cabo de unos minutos de haber inducido el daño presentan un abultamiento, endurecimiento y cambio de color de rosa a blanco (Figura 18D). Con 0.9 mL de anestesia los animales se mantienen sedados el tiempo en que se lleva a cabo el procedimiento, por lo que se logra reducir al máximo las molestias. Por otro lado, se empleó una dosis alta de anestésico para reducir el sufrimiento de los animales, sin embargo, la sustancia activa induce hipotermia. Para evitar la muerte de los animales debida a este fenómeno, después del procedimiento se mantuvieron en una cámara con un calentador eléctrico. Con esta metodología se

logró inducir una quemadura de tercer grado y reducir al 100% la muerte de los animales debida al procedimiento.

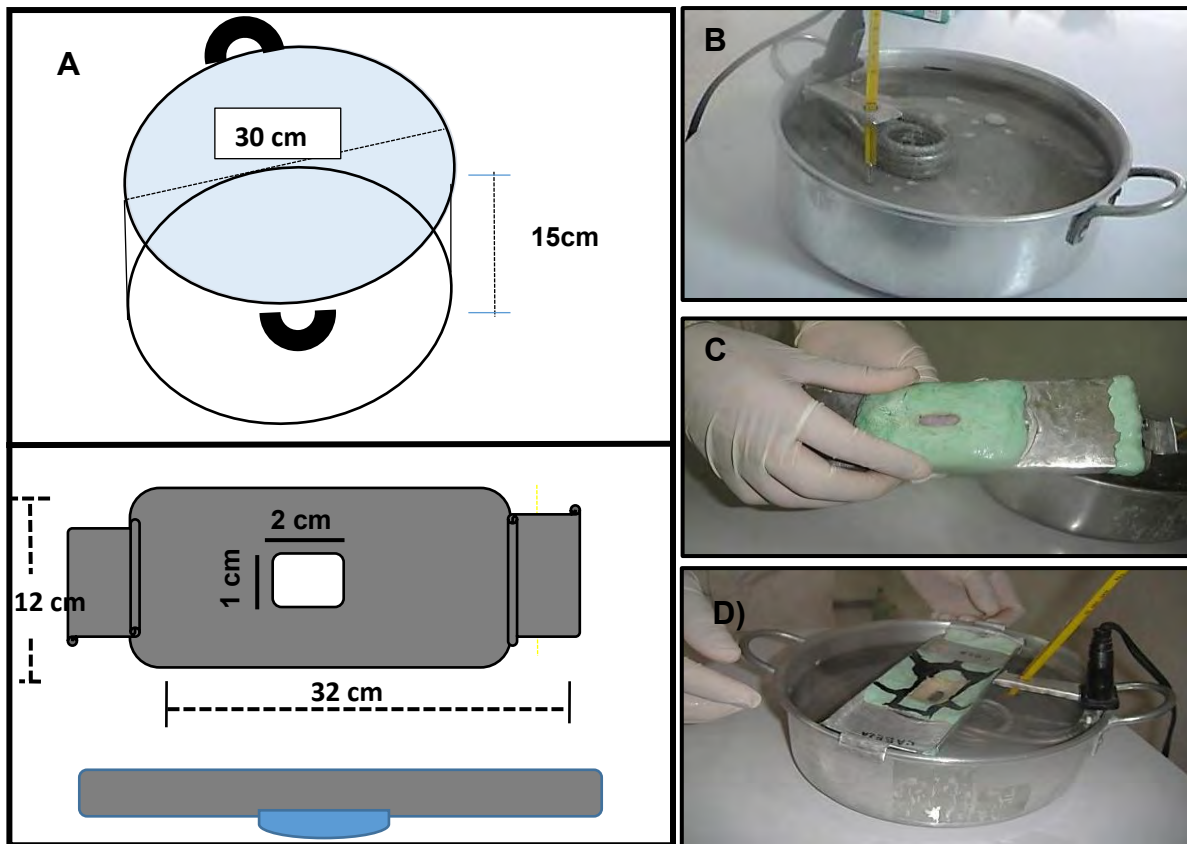


Figura 17. A) Diseño del equipo para producir lesiones por daño térmico, **B)** Recipiente con resistencia eléctrica (calentamiento de agua) **C)** Placa metálica con abertura de 1 por 2 cm (exposición del área a lesionar), **D)** Soportes laterales.

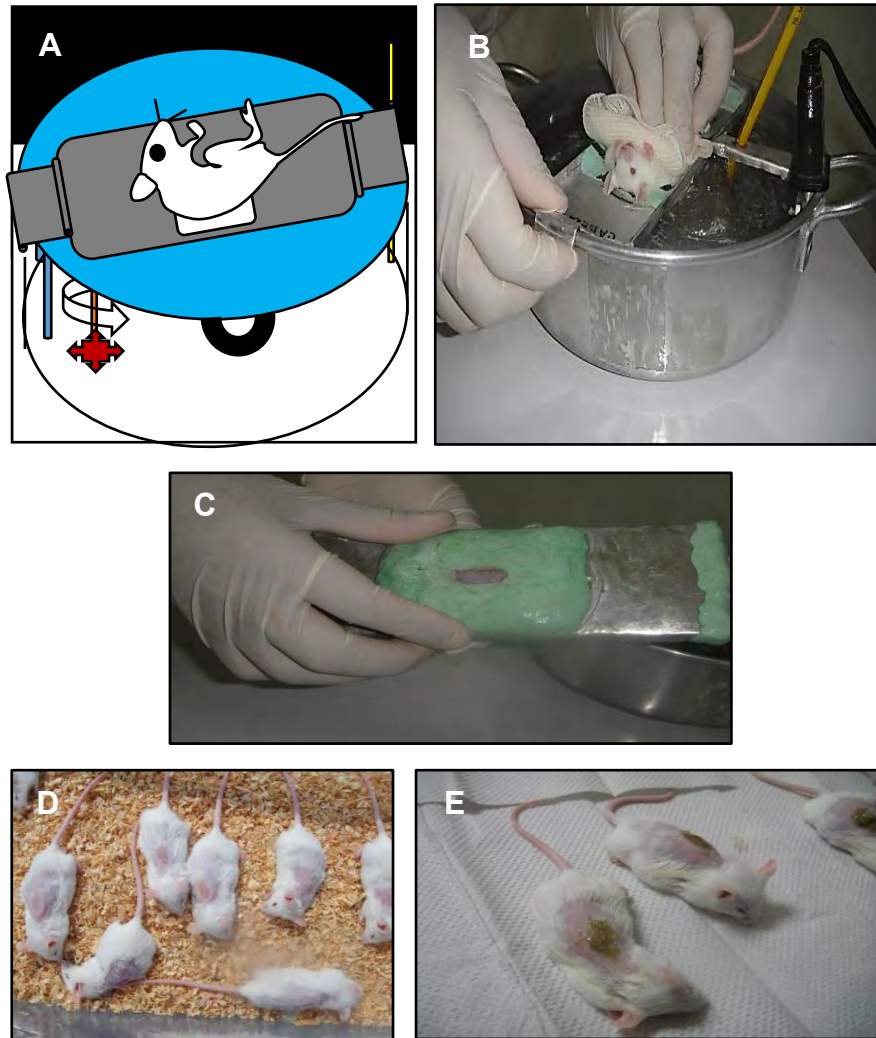


Figura 18. A) Modelo de quemadura. B) Procedimiento de lesión por daño térmico. Se expone la parte dorsal afeitada en la abertura de la placa metálica (agua destilada a 90°C por un lapso de 10 segundos). C) Área expuesta D) Ratones con quemadura de tercer grado después del procedimiento. E) Aplicación tópica del extracto de hexano.

Otro factor clave para evitar la muerte durante el procedimiento fue lograr exponer únicamente la zona donde se quería inducir la lesión, sin embargo, en algunos ensayos previos registrábamos muerte de los animales debido a que el calor afectaba órganos internos cercanos a la zona de exposición. Para evitar esto, se diseñó una capa gruesa de plastilina epóxida con una cavidad en la placa metálica. (Figura 18C). Con esto se pudo reducir el daño a otras zonas de la piel del animal, así como a órganos internos.

7.3. Supervivencia de ratones infectados vía intraperitoneal con *P. aeruginosa*.

Para determinar la capacidad patógena de las cepas de *P. aeruginosa* se inoculó vía intraperitoneal diferentes U.F.C. de la cepa PA14WT. Bajo esta condición se presentó una relación dosis respuesta, en la que se induce la muerte del 100 % de los animales a las 24 h con 1×10^{10} U.F.C. y a las 48 h con 1×10^9 U.F.C. (Figura 19).

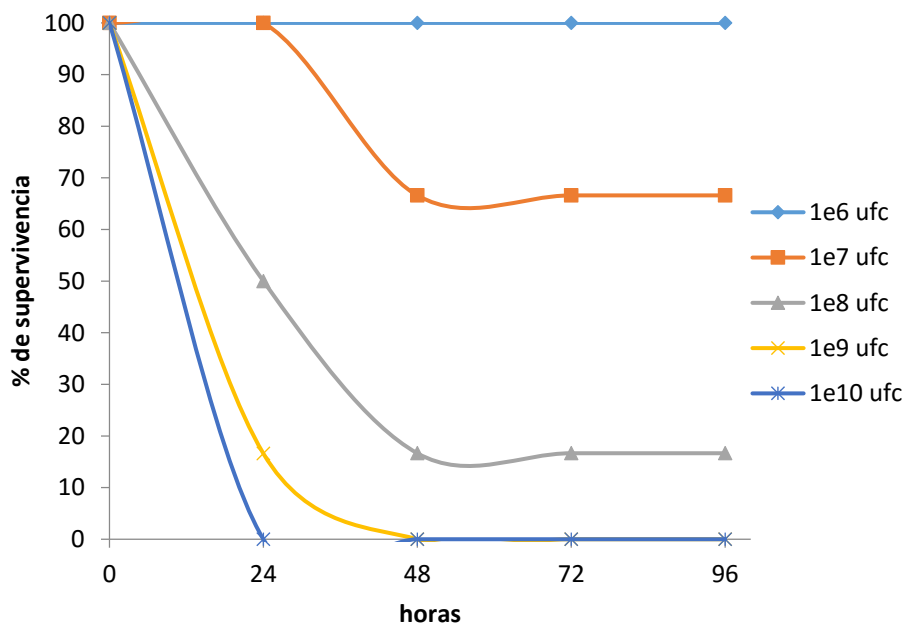


Figura 19. Porcentaje de supervivencia de ratones infectados intraperitonealmente con distinta carga bacteriana (U.F.C.) de *P. aeruginosa* PA14WT. n= 6 animales.

Los animales fueron sacrificados 96 h después de iniciado el ensayo. Para el caso de inóculo de 1×10^7 U.F.C se registró una supervivencia del 70%, mientras que, todos los animales inoculados con 1×10^6 U.F.C sobrevivieron. Cabe señalar que el estado general de los animales sobrevivientes fue bueno, presentaron movilidad y no se observaron pérdida de apetito o piloerección. Caso contrario a los que no sobrevivieron en las primeras horas después de la inoculación, los cuales presentaron piloerección, reducen su movimiento y alimentación.

7.4. Supervivencia en ratones con lesión producida por daño térmico e infección con *P. aeruginosa*.

Para determinar la capacidad de *P. aeruginosa* para infectar e inducir la muerte de los animales en el modelo de lesión por daño térmico, se inoculó vía intraperitoneal diferentes U.F.C. en dos cepas, una WT y una cepa mutante ($\Delta LasR$) que tiene deletado el gen *LasR* que codifica para el receptor de una N-acyl homoserin lactona involucrada en el proceso de PQ y la producción de factores de virulencia (Miller y Bassler 2001). En general esta cepa esta reportada en estudios previos causa un menor daño y muerte en varios modelos de infección de *P. aeruginosa* en ratones (Rumbaugh, 1999).

Se evaluaron la mortalidad en los animales con lesión de daño térmico e infección de *P. aeruginosa*, y se determinaron las condiciones experimentales se presentaba un menor daño con la cepa mutante como se ha reportado previamente. De igual manera, se utilizaron dos dosis bacterianas, una con un inóculo de 1×10^6 U.F.C y una más alta con 1×10^8 U.F.C., esto considerando los valores de supervivencia de la figura 19. Una diferencia importante es que para este ensayo se realizó la inoculación subcutáneamente en las lesiones producidas por daño térmico en los ratones.

Con ambas dosis bacterianas se registró un porcentaje de muerte de los animales, No obstante con 1×10^6 U.F.C. vía intraperitoneal no causó la muerte de los animales (figura 19), la inoculación subcutánea en la lesión induce la muerte del 50% con la cepa WT (Figura 20A). Esta misma situación se presentó con el inóculo de 1×10^8 U.F.C. en el que la lesión favorece a la colonización e infección de *P. aeruginosa* ya que se registró el 100% de mortalidad a las 120 h con la cepa WT (figura 20B), comparado con el 80% a esa misma dosis bacteriana pero administrada intraperitonealmente (Figura 19).

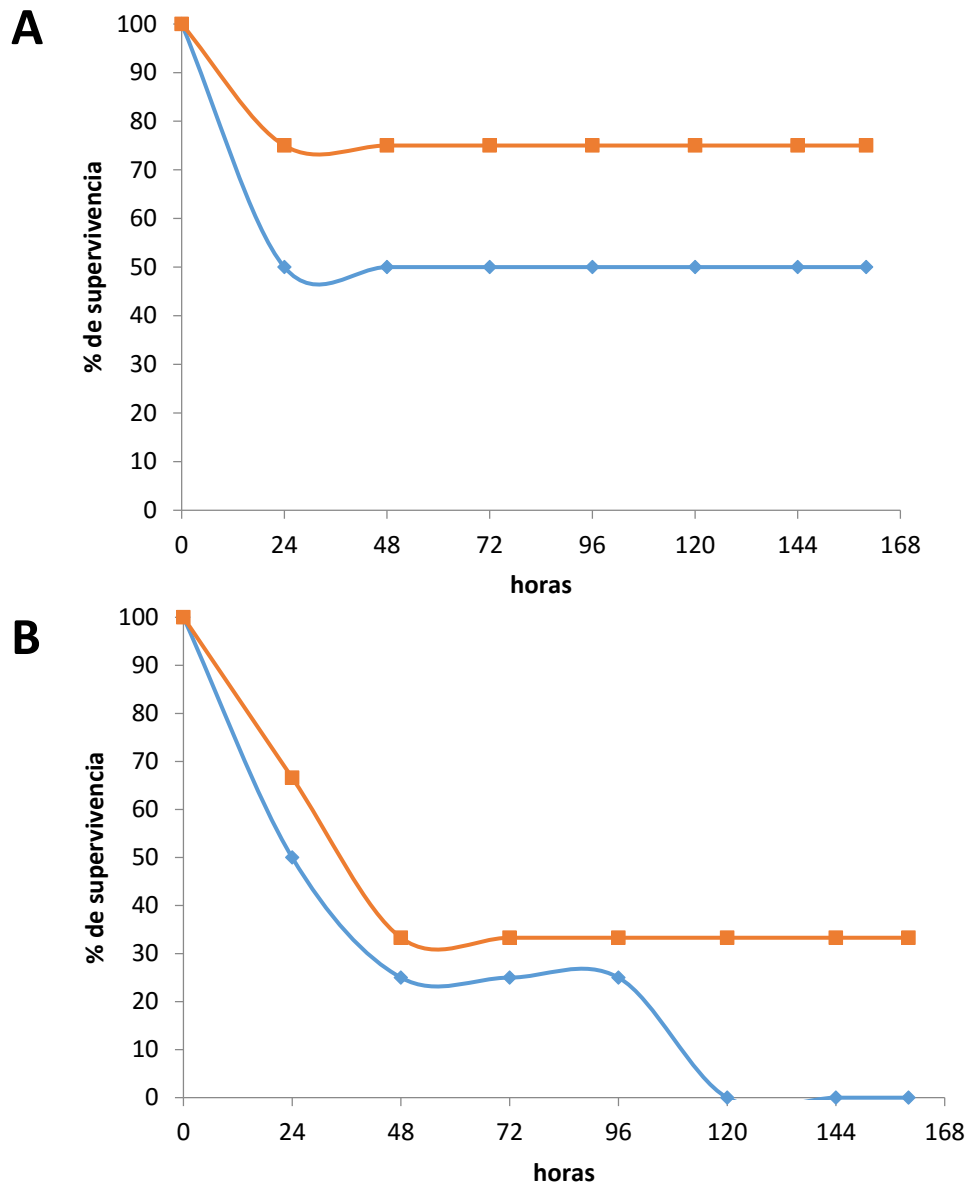


Figura 20. Porcentaje de supervivencia en ratones con lesión producida por daño térmico e infectados vía subcutánea con cepas de *P. aeruginosa* PA14WT (línea azul) y Δ LasR (línea anaranjada), **A)** Con un inóculo bacteriano de 1×10^6 U.F.C. y **B)** Con un inóculo bacteriano de 1×10^8 U.F.C. n = 4.

Con ambas dosis bacterianas se registró una menor mortalidad de los animales infectados con la cepa mutante, confirmando que con nuestro modelo y bajo nuestras condiciones experimentales se pueden detectar diferencias en la disminución de virulencia. Cabe señalar que una diferencia importante con estudios previos en los que se reporta el uso de modelos de lesión por daño térmico con ratones (Rumbaugh *et al.*, 1999; Lesic *et al.*, 2007; DeLeon *et al.*, 2009), en nuestro modelo el inóculo bacteriano utilizado para lograr el 100% de mortalidad en los animales es más alto y destaca que el tamaño del área lesionada es menor (Tabla 1).

Posteriormente, para corroborar que la muerte de los animales se debía a la presencia de *P. aeruginosa*, se realizó el aislamiento de las lesiones y los hígados de los animales que murieron. Con esto se demostró la presencia de *P. aeruginosa* tanto en la lesión como en el hígado lo que nos confirmó que la muerte fue causada por la diseminación de la lesión hacía el sistema sanguíneo y otros órganos (Figura 21).

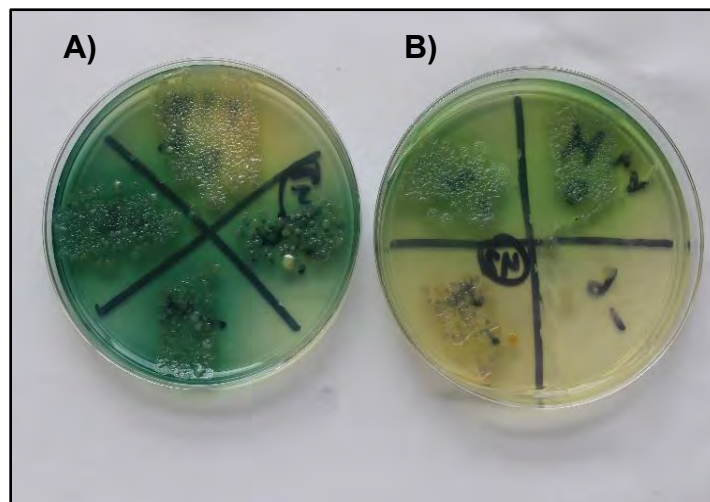


Figura 21. Placas de agar LB en el que se muestra la presencia de *P. aeruginosa* PA14WT aislada de ratones infectados y que muestran la producción de pigmentos como son pirocianina y pioverdina característicos de esta especie. **A)** Lesión y **B)** Hígado

7.5. Efecto del extracto de hexano en la supervivencia de ratones con lesiones provocadas por daño térmico e infectadas con *P. aeruginosa*.

Se evaluó el efecto sobre la supervivencia del extracto de hexano de la corteza de “cuachalalate”, para el cual se comparó con el efecto de sulfadiazina de plata medicamento ampliamente utilizado en la clínica para tratar quemaduras, cuyo principal modo de acción es su efecto bactericida. Bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio no se registró un efecto estadísticamente significativo en la reducción de la mortalidad en los animales tratados con el extracto de hexano (Figura 22). Sin embargo, este mismo efecto se registró en el grupo tratado con sulfadiazina de plata. En ambos tratamientos se registró una supervivencia entre el 50 y 60%, valores similares a los controles negativos (Figura 22).

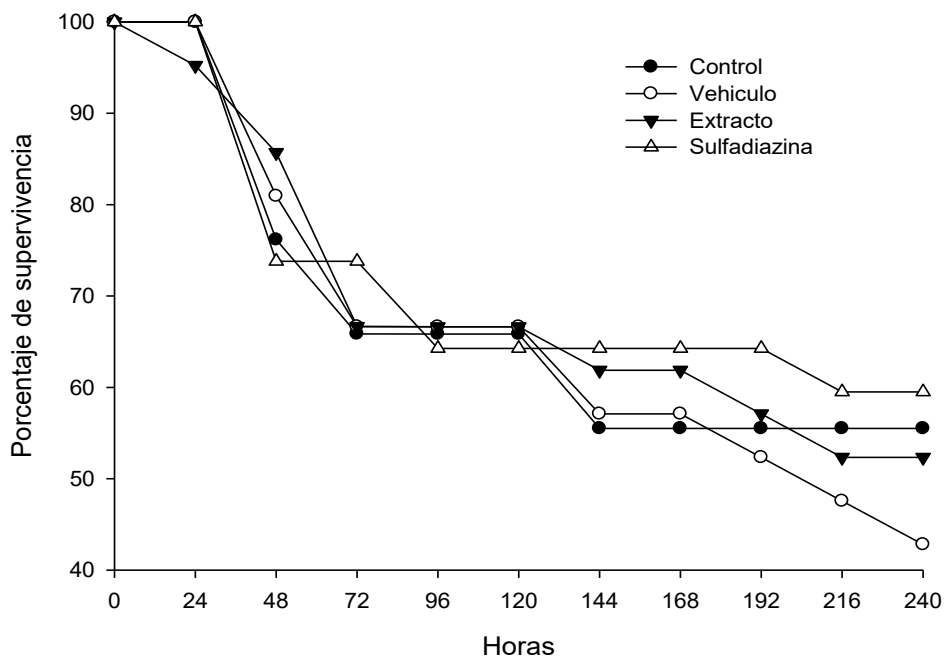


Figura 22. Porcentaje de supervivencia en ratones lesionados e infectados con 10^7 U.F.C de *P. aeruginosa* PA14K. Se realizaron tres experimentos independientes con n= 6 animales.

8. DISCUSION

Uno de los principales atributos que se ha buscado en los productos naturales es su capacidad antibiótica, no obstante, el gran problema que se tiene en la actualidad es la selección y constante surgimiento de cepas resistentes a este tipo de moléculas. La existencia de cepas multiresistentes (al menos a tres tipos de antibióticos) y panresistentes (a todos los antibióticos empleados para su tratamiento) cuya presencia va en aumento, representa un gran riesgo que de no ser abordado con mecanismos de acción alternos al de los antibióticos, no podrá ser controlado en un futuro próximo (Casellas, 2011). En la actualidad se están buscando otros mecanismos de acción que solucionen el problema de manera definitiva. Una propuesta, es el empleo de moléculas que inhiben la *comunicación bacteriana* o de manera más precisa SPQ (Lesic *et al*, 2007; Rice *et al.*, 2008; Gospodarek *et al.*, 2009; Lowery *et al.*, 2009).

Los SPQ representan un nuevo enfoque para el tratamiento de infecciones bacterianas, porque el mecanismo de acción es distinto al de los antibióticos conocidos, ya que no actúan eliminando directamente a las bacterias, situación que evita que se genere una presión de selección y se desarrollen mecanismos de resistencia (Lesic *et al*, 2007). La idea de cómo estas moléculas inhibitoras del SPQ pueden contrarrestar la infección sin tener un efecto directo en la viabilidad de las bacterias, es que una vez inhibido el SPQ, se frena la producción de factores de virulencia (entre otros fenómenos más involucrados en el daño como son la formación de biopelículas o el nado), permitiendo que el huésped se recupere y sea el sistema inmune quien se encargue de contrarrestar la infección (Lesic *et al*, 2007; Rice *et al.*, 2008; Gospodarek *et al.*, 2009; Lowery *et al.*, 2009).

Algunos autores plantean que el inhibir la comunicación bacteriana vía la interrupción de los SPQ, puede ser aplicado a bacterias que causan graves problemas de infecciones de tipo nosocomiales, como es *P. aeruginosa* (Lesic *et al.*, 2007; DeLeon *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los extractos de *A. adstringens* y compuestos obtenidos de la corteza tienen capacidad antiinflamatoria, antiulcerogástrica, citotóxica, antifúngica y antimicrobiana (Navarrete *et al.*, 1998; Olivera, 1998; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004; Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007). El efecto terapéutico se atribuye a la presencia de dos tipos de compuestos mayoritarios los triterpenos y los fenoles de cadena larga (Olivera, 1998; Rosas, 2005; Navarrete *et al.*, 2006). (Castillo *et al.*, 2013) reportó mediante estudios *in vitro*, la actividad inhibidora de factores de virulencia regulados por SPQ en *P. aeruginosa* por parte del extracto de hexano y una mezcla de ácidos anacárdicos.

Por otra parte, el 90% de las quemaduras en el nivel mundial ocurre en países en vías de desarrollo, México se encuentra dentro de estos países donde se estima que la probabilidad de muerte de un paciente es del 100% cuando las lesiones son mayores al 40% de la totalidad del cuerpo. Cabe mencionar que las quemaduras en México son reportadas dentro de los primeros cinco lugares en etiología de infecciones nosocomiales donde se reporta que el 75% de los decesos de los pacientes quemados se debe al desarrollo de infecciones no controladas y causadas por cepas antibiótico resistentes, más que por las lesiones. Una de las principales bacterias que infectan las lesiones por quemaduras térmicas es *P. aeruginosa*, la cual se asocia con la muerte del más del 75% de los pacientes con quemaduras mayores. La bacteria produce numerosos factores de virulencia los que favorecen su rápida colonización en el organismo.

En la presente investigación se analizó la actividad *in vivo* del extracto de hexano de la corteza del *A. adstringens* empleando un modelo de lesión por daño térmico e infección por *P. aeruginosa*. Con la finalidad de encontrar una alternativa al problema de la aparición de la resistencia bacteriana, así como proponer nuevas estrategias de tratamiento basadas en fitoquímicos ISPQ. Del mismo modo, el proyecto busca validar científicamente el empleo de plantas usadas tradicionalmente como antimicrobianas por un mecanismo de acción alterno al del efecto antibiótico.

En este proyecto se diseñó un modelo de lesión por daño térmico e infección con *P. aeruginosa* en ratones con la intención de reproducir lesiones similares a las de los pacientes. El modelo desarrollado permitió realizar una lesión limpia y homogénea en el área deseada, pero comparada con otros modelos es de menor tamaño. Esto es debido básicamente a que el empleo de una abertura de exposición mayor o similar a la reportada en la literatura, inducía daño en órganos internos, lo que se evitó al reducir el área de exposición. También, aunque se señala que la exposición por 10 segundos en agua a 90°C genera una quemadura de tercer grado (DeLeon *et al.*, 2009), sin embargo en el análisis visual de las lesiones no se observó una destrucción del espesor de la piel, característico de este tipo de quemaduras. Algunas características señalan que puede clasificarse dentro de segundo grado, la presencia de flictenas o ampollas en algunos casos se, así el color pálido en la zona afectada.

El modelo desarrollado, bajo estas condiciones de tamaño y grado de quemadura no provoca la muerte de los animales cuando no son infectado con *P. aeruginosa*, permitió analizar el efecto de la patogenicidad de la bacteria y la virulencia *in vivo*. Ejemplo de esto son las diferencias registradas en la mortalidad de los animales cuando se infectan con la cepa mutante que tiene interrumpido uno ($\Delta lasR$) de los tres sistemas de PQ de *P. aeruginosa*. Al respecto, se puede mencionar que se encuentra documentado que la interrupción de los SPQ mediante deleciones de genes que codifican para las moléculas autoinducidas, genera cepas menos virulentas que causan un menor daño y muerte a los animales (Rumbaugh, 1999). En nuestro modelo se registró un efecto moderado en la reducción de mortalidad de los animales infectados con la cepa mutante comparado con la silvestre. Sin embargo, hay que señalar que esto es debido a que aún tiene activos dos SPQ como son uno más de homoserinlactonas (*rhII/rhIR*) y otro de quinolonas (*pqsABC/pqsR*) (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). Por lo que es factible que empleando una doble mutante ($\Delta lasI-rhII$), como se reporta previamente, obtengamos una mayor diferencia. De igual manera, para obtener mayor información del desarrollo de la infección es necesario incluir en el modelo la medición de otros parámetros, como la cuantificación de la bacteria en los

tejidos, análisis histopatológicos, medición de procesos involucrados en la cicatrización e inflamación, así como la producción de factores de virulencia de la bacteria.

Por otra parte, en nuestro sistema se empleó un inóculo bacteriano de varias órdenes de magnitud (10^{7-8} UFC) mayor al reportado en estudios previos para lograr el 100% de mortalidad de los animales, esto puede deberse a que el tamaño de las lesiones es menor. Con los parámetros anteriores, se evaluó el efecto del extracto de hexano en la supervivencia de los animales. Se consideró utilizar un inóculo bacteriano que no indujera el 100% de la muerte de los animales, esto con el propósito de poder observar un efecto más claro. La concentración utilizada como referencia de 55.3 mg/mL fue tomada en un estudio reportado por Muñoz en 2013, en el que registró un efecto positivo por parte del extracto en la supervivencia y la disminución de la presencia de *P. aeruginosa* en lesiones. Cabe señalar que, en este estudio, se empleó un sistema para producir las lesiones que era provisional, al igual que se trabajó con grupos de animales reducidos ($n = 4$) y no se realizaron repeticiones, por lo cual el resultado no fue concluyente.

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se observó un efecto positivo estadísticamente significativo del extracto de hexano en la reducción de la mortalidad de los animales con lesión de daño térmico e infectados con *P. aeruginosa* PA14WT. Sin embargo, destaca que este mismo efecto es similar al presentado por el control positivo (sulfadiazina de plata). Este dato nos indica que es posible que el tamaño de inóculo y el tiempo de inoculación, son condiciones que no se presentan en los casos clínicos y no permiten distinguir un efecto positivo del extracto y de la sulfadiazina. Otro posible factor fue la emplear varias dosis o aumentarla podría tener un efecto positivo de las sustancias a evaluar.

Una de las principales restricciones desde el punto de vista ético debido a lo agresivo del modelo, es el empleo de un número de animales determinado. De tal manera que al no encontrar un efecto positivo por parte del extracto en esta primera etapa no se continuó con la evaluación de otras dosis, vía de

administración, cepa bacteriana o el empleo de otras sustancias bactericidas (controles positivos).

Con este trabajo, se contribuye al estudio del empleo de la corteza de “cuachalalate” para tratar quemaduras con infecciones bacterianas y es la base para estudios posteriores que busquen evaluar el efecto de otros extractos, formas de uso tradicionales o compuestos puros de la corteza del *A. adstringens*.

9. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un modelo de lesión por daño térmico e infección con *P. aeruginosa* que permite evaluar el efecto de fitoquímicos en la supervivencia.
- Se logró evaluar el efecto en la supervivencia del extracto de hexano de la corteza de *A. adstringens* de animales con quemaduras e infección con *P. aeruginosa*.
- Bajo las condiciones experimentales empleadas y a una dosis de 55.5 mg/ml no se registró un aumento en la supervivencia y eliminación de la infección de los animales tratados con el extracto de hexano.

10. BIBLIOGRAFIA

- American Burn Association (2007). Burn incidence and treatment in the US: fact sheet. American Burn Association, Chicago, IL.
- American Burn Association (2011). Advanced Burn Life Support course, Michigan, United State American.
- Argueta, A., L. Cano y Rodarte M. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. Vol. 1, pp 58.
- Arrieta J., Benitez J., Flores E., Castillo C., y Navarrete A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryl, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* 69(10):905-9.
- Ashima K., Kittappa V., Neha R. (2013). Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 8(1):68-83.
- Baytelman, G. y Aviles, F. (1981). Recetario Popular. SEP-INAH. México, pp. 21.
- Berk R., Inglewski B., Hazlett L. (1981). Age-related susceptibility of mice to ocular challenge with *Pseudomonas aeruginosa* exotocin A. *Infect Immun.* 33(1):90-4
- Bjarnsholt T., Van Gennip M., Jakobsen T. H., Chritensen L.D., Jensen P.Q., y Givskov M. (2010). In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature protocols.* 5(2): 282-92.
- Bodey G. P., Bolivar R., Fainstein V., y Jadeja L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5 (2):279–313.
- Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de vivar A., Ávila G., Duran A., y Lira R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla; Mexico. *J Ethnopharmacol.* 97 (3):429-39.

- Casellas J. M. (2011). Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control. *Rev. Panam de Salud Pública.* 30(6):519-28.
- Castillo-Juárez I., Rivero C.F., Celis H. and Romero I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol.* 114(1): 72-7.
- Castillo-Juárez I., Maeda T., Mandujano-Tinoco E.A., Tomás M., Pérez-Eretza B., García-Contreras S.J., Wood T., K. y García-Contreras R. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J Clin Cases.* 3(7):575-98.
- Castillo-Juárez I., García-Contreras R., Velázquez-Guadarrama N., Soto-Hernández M. y Martínez-Vázquez M. (2013). Anacardic acid from *Amphipterygium adstringens* inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Med Res.* 44(7):488-94.
- Chavez I., Apan T., Hernandez M. and Vazquez M. (2004) Principles of the bark *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11(5):436-45.
- Clatworthy A.E, Pierson E., y Hung D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol.* 3(9):541-8.
- Cuevas X. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara.* 13, 27-47.
- DeLeon K., Balldin F., Watters C., Hamood A., Griswold J., Sreedharan S. y Rumbaugh K.P. (2009). Gallium maltolate treatment eradicates *Pseudomonas aeruginosa* infection in thermally injured mice. *Antimicrob Agents Chemother* 53(4):1331-7.

- Díaz B. (1994). Evaluación del efecto fungicida y bactericida de extractos del árbol de “cuachalalate” (*Amphypterygium adstringens*) mediante antibiogramas y bioensayos *in vitro*. In Congreso Nacional de fitopatología. (21, Cuernavaca, México. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. P.45.
- Estrada L. (1985). Avances en la investigación sobre plantas medicinales en la Universidad Autónoma de Chapingo y Colegio de Postgraduados, Chapingo Estado de México. Mimeografo. Departamento de Fitotecnia, Sección de Plantas Medicinales Universidad Autónoma de Chapingo.
- Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S., Welch M., Spring D.R. (2012). Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. Trends Microbiol Chem. Rev. 20(9):449-58 1–10.
- Gilligan P.H (1991). Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev.4(1):35-51.
- Gospodarek E., Bogiel T. y Zalas-Wiecek P. (2009). Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. Pol J Microbiol. 58(3):191-8.
- Grayum, M., Gonzales J., Quesada, F. y Cano, C. (2008). Herbario: CR, MO. 10706. Disponible en: Michael Grayum, J. Gonzalez, F. Quesada & C. Cano 10706.
- Hirsch E.B., y Tam V.H. (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res 10(4):441-51.
- Hentzer M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22, 3803–3815 (2003).
- Hersch-Martinez, P. 1995 Commercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla, Mexico. Economic botany 49(2): 197-206.
- Heywood, V. (1978). Flowering plants of the world. Oxford University Press Oxfor.

- Holder I.A. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* burn infections: pathogenesis and treatment, In M. B. M. Campa and H. Friedman (ed.), *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Plenum Press, New York, NY. p. 275–95.
- Homma J.Y. (1980). Roles of exoenzymes and exotoxin in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and the development of a new vaccine. *Jpn J Exp Med*. 50(3):149-65.
- Hutchinson, J. 1973. The families of flowering plants. 3th. Ed. Oxford at the Clarendon Press. Alemania. Pp. 147.
- INI. 1994. Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F.
- Infecciones nosocomiales, Dirección General de Salud Pública de México; (2004). Vol. 41.
- Ixtaina V. Y.; Martínez M. L.; Sportono V.; Mateo C. M.; Maestri D. M.; Diehl B. W. K.; Nolasco S. M. and Tomas M. C. 2011. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J. Food Comp. Anal.*, 24: 166-174.
- Lambert P.A (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* *J R Soc Med* 95(41):22-26.
- Linares, M. E., Bye, B. R. A., & Flores, B. (1999). Plantas medicinales de México usos y remedios tradicionales. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología UNAM.
- Lesic B., Lepine F., Deziel E., Zhang J., Zhang Q., Padfield K., Castonguay M., Milot S., Stachel S., Tzika A., Tompkins R. and L. Rahme (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog* 3(9):1229-39.

- Lowery C.A., Abe T., Park J Eubanks L.M., Sawada D., Kaufmann G.F. and Jada K .D. (2009). Revisiting AI-quorum sensing inhibitors: direct comparison of alkyl-DPD analogues and a natural product fimbrolide J Am Chem Soc ;131(43):15584-5.
- Luna B., Torres B., Belmont M. (2000). Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Manejo integrado de plagas. (57).
- Magdaleno, R. (1987). Advances in triterpenoid research. Phytochemistry. 44(7): 1185-1236.
- Martínez, M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México. pp. 233.
- Mata, R, Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., Delgado, G., 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethno pharmacology*. 34, 147-154.
- McManus A.T., Mason A.D. Jr., McManus W.F., and Pruitt B.A. Jr. (1985). Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. Eur. J. Clin. Microbiol. 4(2):219–223.
- Miller M. B. and Bassler B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Ann Rev. Microbiol. 55:165-199.
- Muñoz C.N. (2013). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad inhibidora del sistema de censado quórum bacteriano de las cortezas de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. y Ceiba spp. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 112 pag.
- Navarrete A., Mata R. and Delgado G. (1989). Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. Planta Med; 55(6):579.
- Navarrete A., Oliva I., Sánchez-Mendoza M.E., Arrieta J., Cruz-Antonio L., Castañeda-Hernández G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of "cuachalalate" (*Amphipterygium adstringens*)

- on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. J Pharm Pharmacol. 57(12):1629-36.
- Nicas T., Bradley J., Lonchner J. Iglewski B. (1985).The role of exoenzyme S in infections with *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis.152(4):716-21.
- Niembro R., A. 1989. Semillas de plantas leñosas. Morfología comparada. Limusa. Mexico. pp. 111.
- Niembro R., A. 1990. Árboles y arbustos útiles de México naturales e introducidos. Limusa. Mexico. Pp. 33.
- Olivera, O. A.G., M. Soto, M. Martínez, T. Terrazas, and F. Solares. 1999. Phytochemical study of “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). J. Ethnopharmacology. 68:109-113.
- Oviedo-Chávez, I., T. Ramírez-Apan, M. Soto-Hernández and M. Martínez-Vázquez. (2004) Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) and its anti-inflammatory activity. Phytomedicine 11: 436-445.
- Ortega A., Hernández M., and Vázquez M. (1999). Phytochemical study of cuachalalate) *Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). J. Ethnopharmacol 68, (1-3):109-113.
- Pan J. and Ren D. (2009). Quorum sensing inhibitors: a patent overview. Expert Opin Ther Pat.19(11):1581-601.
- Papaioannou E., Utari P. and Quax W J. (2013). Choosing an appropriate infection models to study quorum sensing inhibition in *Pseudomonas* infections. Int J Mol Sci. 14(9):19309-40.
- Perez L.M. (2015). Efecto regulador de los ácidos grasos de semillas oleaginosas en sistemas de percepción de quórum bacteriano Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 78 pag.

- Pollack M., Mandell G.L., Bennett J.E., and R. Dolin R. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA. p. 2310-2335.
- Palleroni NJ. Present situation of the taxonomy of aerobic Pseudomonales. In: E. Galli, S. Silver, and B, Witholt (Eds.) *Pseudomonas*. Molecular biology and biotechnology. ASM Press, Washington, DC. 1992; 105-115.
- Potokar T.S., Ali S., Chamania S., Prowse S., and Whitaker I.S. (2008). A global overview of burns research highlights the need for forming networks with the developing world. *Burns* 34(1):3–5.
- Resenos F. (2003). Valoración del efecto cicatrizante de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Subprograma 127 “Formación básica en Investigación” de la Facultad de Química U.N.A.M., durante el periodo 2002-2003.
- Reynolds J. (2013). Serial Dilution Protocols. ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology. Disponible en: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2884-serial-dilution-protocols> (acceso: 17-07-15)
- Rice S.A., McDougald D., Givskov and Kjelleberg S. (2008). Detection and inhibition of bacterial cell-cell communication. *Methods Mol Biol.* 431:55-68.
- Rivero-Cruz I., Acevedo L., Guerrero J. A., Martinez S., Bye R., Pereda- Miranda R., Franzblau S., Timmermann B. N., and Mata R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J Pharm Pharmacol.* 57(9):1117-26.
- Rodríguez-García A., Peixoto I.T., Verde-Star M.J., De la Torre-Zavala S., Aviles Arnat H., Ruiz A.L (2015). In Vitro Antimicrobial and Antiproliferative Activated of *Amphipterygium adstringens*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:175497.

- Rivero-Cruz I., Acevedo L., Guerrero J. A., Martinez S., Bye R., Pereda- Miranda R., Franzblau S., Timmermann B. N., and Mata R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J Pharm Pharmacol.* 57(9):1117-26.
- Rojas, A. M. (1986). Lista de plantas de Coatetelco . IMMTTAC. *Med. Alternativa.* No. 2. Mexico, pp. 79-80, 92-95.
- Rosas A. H. (2005). Estudio químico y biológico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 110 pag.
- Rumbaugh K.P., Griswol J.A., Iglewski B.H. and A.N Hamood (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun.* 67(11):5854-62.
- Schaber J.A., Triffo W.J., Suh S.J., Oliver J.W., Hastert M.C., Griswold J.A, Auer M., Hamood A.N. and Rumbaugh K.P. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect. Immun.* 75 (8):3715–21.
- Solares C. A., Batra P.S., Hall G. S. and Citardi M.J. (2006). Treatment of chronic rhinosininitis exacerbations due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mupirocin irrigations. *Am J Otolaryngol.* 27(3):161-5.
- Standley, P. C. 1926. Trees and shrubs of Mexico. Washington printing office. Alemania 23: 672-673.
- Stevens, W., Ulloa, U., Pool, A. y Montiel, O. (2001). Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 85: 1-2666.
- Stieritz D.D. and Holder I. A. (1975). Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: description a burned mouse model. *J. Infect Dis.* 131(6):688-91.

- Tan M.W., Rahme L.G., Sternberg J.A., Tompkins R.G. and Ausubel F.M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 96 (5):2408-2410.
- Tegos G.P., and Hamblin M.R. (2013). Disruptive innovations: new anti-infectives in the age of resistance. Curr Opin Pharmacol. 13(5):673-7.
- Tang K., and Zhang X.H. (2014). Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. Mar Drugs. 12(6):3245-82.
- Williams P., Winzer K., Chan W. C., Camara M (2007). Look whos talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. Phil Trans R Soc Lond 362:1119-34.
- Zamora – Tirado, P. E. (2003). Evaluación del aprovechamiento potencial del cuachalalate (*Amphyterigium adstringens*) en forma de fitofármaco. Tesis profesional, Q.F.B. FES-Cuautitlan, UNAM, p. 90.

11. GLOSARIO

Antibióticos: Sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo o destruir bacterias u otros microorganismos.

Antimicrobiano: Compuestos obtenidos a partir de microorganismos ya sean bacterias, hongos, levaduras, plantas etc.; (antibiótico) y los producidos por síntesis química (quimioterapéutico).

Autoinductor: Sustancias que excretan las células, que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva.

Elastasa: Enzima encargada de la degradación de fibras elásticas la cual hidroliza principalmente a la elastina, la laminina, el fibrogénico, colágeno, y las inmunoglobulinas.

Factor de virulencia: Son moléculas producidas por un patógeno, que influyen específicamente las funciones del hospedante, para permitir al patógeno crecer.

Infeción: Término clínico que indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno, es decir, que existe invasión con lesión tisular por esos mismos gérmenes (hongos, bacterias, protozoos, virus, priones), sus productos (toxinas) puede ser local o sistémica.

Inhibición: Disminución o detección de las funciones de un organismo.

Inmunosuprimida: persona bajo tratamiento inmunosupresor, o cuyo sistema inmune está debilitado por otra razón (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, sida).

LasI: Autoinductor que difunde al medio extracelular se acumula y vuelve a entrar a la célula por mecanismos de difusión.

LasR: proteína receptora intracitoplasmática.

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

Metabolitos secundarios: Compuestos orgánicos sintetizados por organismos que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.

Mortalidad: Cantidad de personas que mueren en un lugar y en un periodo de tiempo determinados en relación con el total de la población.

Piocianina: Pigmento color azul-verdoso, que es un compuesto muy activo el cual produce múltiples efectos citopáticos en las células de los mamíferos, y que es producido únicamente por esta especie.

Pioverdina: Pigmento amarillo producido por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Sistema de Percepción de quórum (SPQ): Mecanismo bacteriano de comunicación intercelular que controla la expresión génica en función de la densidad celular.

Proteasa alcalina: Enzima que se encarga de hidrolizar la fibrina y la laminina, pueden causar la invasión tisular y necrosis.

Rhl: Induce la síntesis de los factores de adhesión y virulencia.

Triterpeno: Son los terpenos de 30 carbonos

β -lactámicos: Son una amplia clase de antibióticos incluyendo derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactams, carbacefem, carbapenems e inhibidores de la betalactamasa (β -lactamasa); básicamente cualquier agente antibiótico que contenga un anillo β -lactámico en su estructura molecular.

12. ANEXOS