



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias Médicas

**Efecto sinérgico de la Clorpromazina en combinación con antibióticos para el tratamiento de  
Enterobacterias productoras de Carbapenemasas. Estudio in vitro**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA:  
**Braulio Josué Méndez Sotelo**

TUTOR  
Rafael Franco Cendejas

Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Ciudad de México, agosto de 2023



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.

## Índice

Resumen.....	3
Marco teórico.....	4
Introducción .....	4
Epidemiología.....	5
Microbiología y definiciones .....	6
Resistencia bacteriana.....	7
Reposicionamiento de medicamentos.....	10
Clorpromazina .....	11
Antecedentes .....	12
Justificación .....	14
Pregunta de investigación .....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos .....	15
Diseño y metodología .....	16
Variables.....	17
Análisis estadístico .....	19
Material y Financiamiento .....	20
Diagrama de trabajo.....	21
Comité de investigación .....	22
Resultados .....	23
Población. Género y especie .....	23
Carbapenemasas .....	23
Susceptibilidad a Antibióticos .....	24
Concentración inhibitoria mínima de Clorpromazina .....	26
Sinergias, concentración inhibitoria fraccional (FIC).....	28
Discusión .....	31
Perspectivas a futuro. ....	33
Conclusión .....	34
Agradecimientos .....	35
Bibliografía .....	36

## Resumen

**Introducción:** La resistencia a los antimicrobianos es un creciente problema global. La OMS enfatiza la necesidad urgente de nuevos antibióticos, especialmente para BGN como *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos. Dado que desarrollar nuevos antimicrobianos es costoso y lento, se está investigando la posibilidad de reutilizar fármacos existentes, como la clorpromazina (CPZ), que ha demostrado actividad antimicrobiana y sinérgica con otros antibióticos.

**Objetivo:** Evaluar la capacidad sinérgica de CPZ en combinación con antibióticos para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.

**Material y Métodos:** Se condujo un estudio experimental en el ámbito de las ciencias básicas, empleando cepas de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas seleccionadas del banco de cepas del Laboratorio de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación. Se conformó una muestra de 32 cepas mediante un muestreo de conveniencia, abarcando distintas categorías de la Clasificación de Ambler, incluyendo las clases A, B, D y cepas mixtas. La determinación de la concentración mínima inhibitoria de la CPZ y los antibióticos, tanto por separado como en combinación con CPZ, se llevó a cabo mediante la técnica de microdilución en caldo. Posteriormente, se calculó el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) para evaluar las sinergias entre los distintos agentes.

**Resultados:** La mayoría de las cepas exhibieron una CIM de CPZ de 16 µg/ml (n=19, 59.38%). La CIM50 de CPZ fue de 16 µg/ml, la CIM90 fue de 32 µg/ml. Se realizaron ensayos de sinergia entre CPZ y cada uno de los antibióticos, generando un total de 288 combinaciones únicas y se distribuyeron de la siguiente manera: 41 FIC≤0.5 (14.24%), 247 FIC >0.5 (85.76%) con una diferencia significativa (p<0.001).

**Conclusión:** En el contexto de las *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas, la CPZ mostró una CIM50 de 16 µg/ml y una CIM90 de 32 µg/ml. Sin embargo, cuando exploramos su capacidad para interactuar sinérgicamente con antibióticos, observamos que este efecto sinérgico se presentó en solo un 14.24% de las combinaciones evaluadas, lo que equivale a 41 de las 288 combinaciones analizadas.

## Marco teórico

### Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad que adquiere una bacteria para evadir el efecto de los fármacos diseñados para eliminarla (1). En la actualidad la prevalencia de bacterias multidrogo resistentes (MDR) va en aumento y con una rápida diseminación a nivel global. Según informes del Centro de año 2019 estiman que anualmente se presentan más de 2 millones de infecciones por MDR en Estados Unidos (2). Esta situación genera un aumento significativo en los costos para el sistema de salud, ya que los pacientes con infecciones resistentes requieren hospitalizaciones más prolongadas, diagnósticos más complejos y tratamientos más costosos (3).

Para abordar este problema, en 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de bacterias para las cuales se necesitan con urgencia nuevos antibióticos, destacando la amenaza crítica de los bacilos Gram negativos (BGN), especialmente las *Enterobacterales* (4) (Tabla 1). El tratamiento actual de las infecciones por *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos es complejo y tiene pocas opciones terapéuticas disponibles (5). Desafortunadamente, el desarrollo de nuevos antimicrobianos es un proceso costoso y lento (6).

**Tabla 1. Lista OMS de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos**

Categoría	Bacterias	Resistencia
<b>Critica. Prioridad 1</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacterales</i>	Carbapenémicos, productoras de B-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)
<b>Alta. Prioridad 2</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, intermedio y resistente a vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter spp.</i>	Quinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Quinolonas
<b>Mediana. Prioridad 3</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas, quinolonas
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No susceptible a penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	Quinolonas

En la última década, se ha impulsado el desarrollo de moléculas no bactericidas que, de manera indirecta, inhiben las vías de comunicación bacteriana, así como el reposicionamiento de fármacos ya existentes con actividad antimicrobiana comprobada (7). La clorpromazina (CPZ), un antipsicótico del grupo de las fenotiazinas, ha demostrado actividad antimicrobiana desde la década de 1970. Aunque no se comprende completamente su mecanismo de acción como antimicrobiano, ensayos recientes han revelado su capacidad sinérgica *in vitro* con otros antibióticos (8).

El propósito de este estudio es determinar la actividad sinérgica de CPZ junto con antibióticos en cepas de *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas. Esta investigación busca aportar nuevas perspectivas para abordar las infecciones resistentes a los antibióticos, en un esfuerzo por combatir una creciente amenaza para la salud global.

### Epidemiología

La carga global de la resistencia a los antimicrobianos se refleja en las devastadoras estadísticas de 2019, cuando se registraron 1.27 millones de muertes atribuibles a esta creciente amenaza. Este número marcó un alarmante aumento de casi el 50% en comparación con 2015. Es importante destacar que esta cifra superó en mortalidad a la combinación de VIH, malaria y tuberculosis. Las regiones más afectadas fueron África subsahariana y el oeste de Asia, donde la resistencia a los antimicrobianos es especialmente alta y el acceso a la atención médica limitado (9).

Entre las infecciones relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos más comunes se encuentran las del tracto respiratorio inferior, las infecciones del torrente sanguíneo y las infecciones intraabdominales. En cuanto al microorganismo causal de muerte atribuibles a la resistencia a los antimicrobianos en 2019, predominó *E. coli*, siendo responsable de la mayoría de los fallecimientos, seguido de cerca por *K. pneumoniae* (9).

Por otro lado, el Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) publicó en 2021 un informe que reveló que el 1% de los aislamientos de *E. coli* eran resistentes a los carbapenémicos en 8 de los 44 países evaluados (18%). Sin embargo, la resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae*, especialmente en meropenem e imipenem, fue más pronunciada. En 2021, se observó que 14 de los 45 países analizados (31%) tenían menos del 1% de aislamientos invasivos de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos. En contraste, 15 países (33%) presentaron tasas iguales o superiores al 25%, de los cuales 8 países tuvieron tasas iguales o superiores al 50% (10).

En el año 2019, en los 35 países de la Región de las Américas de la OMS, se estimaron un total de 569,000 muertes relacionadas con la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, con un intervalo de confianza del 95% que oscila entre 406,000 y 771,000. De estas muertes, se atribuyeron directamente a la resistencia bacteriana a los antimicrobianos alrededor de 141,000, con un intervalo de confianza del 95% entre 99,900 y 196,000. Estos datos subrayan la gravedad de la resistencia bacteriana como un problema de salud pública en la región (11)

En América latina la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) ha monitoreado la resistencia a los carbapenémicos en BGN's durante más de 15 años. Entre 2006 y 2010, la resistencia era esporádica. Sin embargo, desde 2010 hasta 2019, se observó un aumento constante, con prevalencias superiores al 60% en algunos países. La diseminación de carbapenemasas, como *Klebsiella pneumoniae Carbapenemasas* (KPC), se volvió endémica en varios

países de la región. Durante la pandemia, se emitieron alertas en varios países debido a la aparición de *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas no previamente documentadas. Por ejemplo, en Argentina, la coproducción de KPC y *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM) se volvió prevalente (16%). En Uruguay, hubo un aumento del 1% al 3.3% en aislamientos productores de KPC y NDM. Ecuador, Guatemala y Paraguay también informaron la aparición de estas enzimas, y se detectaron por primera vez NDM en Belice y carbapenemasas tipo OXA-48 (Oxacillin-hydrolyzing carbapenemase) en Chile y Guatemala (12)

En México, en 2020, la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) publicó un informe que revela un aumento en la resistencia a los antimicrobianos. Se comparó la proporción de resistencia en el período de 2009 a 2018. Para el grupo de *Enterobacteriales*, se encontró que *E. coli* mantuvo una resistencia a los carbapenémicos del 2.8%, sin cambios significativos a lo largo del tiempo. Sin embargo, se observó un aumento relevante en la resistencia al meropenem en *Enterobacter spp.* en muestras urinarias ( $p=0.0042$ ). Además, la resistencia al meropenem en cepas de *Klebsiella spp.* aisladas de hemocultivos también experimentó un incremento significativo ( $p=0.004$ ). Estos hallazgos reflejan un aumento preocupante en la resistencia a los carbapenémicos en México durante la última década (13). Reportes más recientes muestran una prevalencia del 3.5-9.8% en resistencia a Meropenem en cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* recolectadas de hemocultivos del 2019 al 2020 (14).

Como resultado de la pandemia de SARS-CoV-2, se ha observado un marcado aumento en la resistencia a los antimicrobianos. El informe del grupo INVIFAR ha destacado un significativo incremento en la resistencia a los carbapenémicos (meropenem e imipenem) en hemocultivos con aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* ( $p<0.01$ ) al comparar el último semestre de 2019 con el último semestre de 2020 (15).

#### Microbiología y definiciones

La familia de *Enterobacteriales* se caracteriza por ser anaeróbica facultativa, Gram negativa y no formadora de esporas. Estos microorganismos suelen ser móviles gracias a flagelos o pili, fermentan glucosa, reducen nitrato a nitrito y producen catalasa, pero no oxidasa. Dentro de esta familia, se encuentran géneros comunes como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Shigella* (16).

La definición de bacterias multidrogo resistentes ha evolucionado con el tiempo, variando según el país y los grupos de estudio. En la actualidad, se acepta a nivel global que "multidrogo resistente" implica la falta de susceptibilidad en al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos. "Extensamente resistente" se refiere a la falta de susceptibilidad en al menos un agente en todas las categorías, excepto una o dos. Por último, "pan drogo resistente" se aplica cuando la bacteria no es susceptible a todos los agentes disponibles (17).

Un bacilo Gram negativo resistente a carbapenémicos se define como un microorganismo que muestra una concentración inhibitoria mínima (CIM) intermedia o resistente para al menos uno de los fármacos pertenecientes al grupo de los carbapenémicos, considerando los puntos de corte más apropiados para cada especie (18).

## Resistencia bacteriana

La resistencia a los antimicrobianos puede manifestarse de dos maneras principales: intrínseca y adquirida. La resistencia intrínseca se refiere a la capacidad inherente de ciertas bacterias para resistir los efectos de los antibióticos debido a características estructurales o funcionales específicas presentes en su naturaleza. Una de las claves de esta resistencia intrínseca en las bacterias Gram negativas radica en la compleja estructura de su pared celular, que consta principalmente de tres capas distintas (17,19).

En contraste con las bacterias Gram positivas, cuya pared celular está compuesta por una sola capa de peptidoglicano, los bacilos Gram negativos poseen una estructura de envoltura más elaborada. Esta envoltura consta de tres capas: la membrana interna, una capa delgada de peptidoglicano intermedio y la membrana externa (17,19).

Una de las clases de antibióticos a los que estas bacterias Gram negativas pueden mostrar resistencia intrínseca son los glucopéptidos, como la vancomicina. Estos antibióticos tienen dificultades para atravesar la membrana externa (17,19).

Por otro lado, la resistencia adquirida, ya sea debido a mutaciones en genes cromosómicos o a la adquisición de estos genes de otras bacterias, representa un desafío significativo en la propagación de la resistencia antimicrobiana. La convergencia de varios factores está impulsando la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos. El uso indebido y excesivo de antibióticos, las redes de comercio global, el turismo médico, las condiciones de saneamiento deficientes, los sistemas de gestión de residuos inadecuados y la urbanización contribuyen al desarrollo y expansión de la resistencia a los antibióticos. Además, la transferencia horizontal de genes a través de procesos como la transformación, transducción y conjugación desempeña un papel significativo en la propagación de la resistencia. Estos genes de resistencia pueden ser transportados por transposones o integrones vinculados a elementos genéticos móviles (1).

Se ha acumulado evidencia que sugiere que los genes de resistencia y los elementos de inserción asociados a plásmidos a menudo se concentran en grandes regiones de multiresistencia. Por ejemplo, los plásmidos que codifican enzimas como las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas pueden llevar consigo determinantes de resistencia para otros grupos de antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos y fluorquinolonas. Estas regiones genéticas complejas facilitan la propagación de la resistencia entre bacterias y contribuyen a la aparición de cepas resistentes a múltiples tipos de antibióticos (1,19).

La expresión de los genes de resistencia se traduce en tres mecanismos básicos para contrarrestar los efectos de los antibióticos. Estos incluyen la reducción de la concentración intracelular del antibiótico, que puede ser mediada por proteínas como porinas o bombas de flujo. También se pueden producir mutaciones en los sitios de acción de los antibióticos, como las modificaciones en la girasa del ADN (GyrA), lo que reduce la eficacia de los antibióticos. Además, se pueden inactivar los antibióticos mediante procesos de hidrólisis o modificación, siendo las  $\beta$ -lactamasas un ejemplo destacado en este último grupo. Las carbapenemasas son un subconjunto de estas enzimas, clasificadas como  $\beta$ -lactamasas, con la capacidad específica de hidrolizar los carbapenémicos. Esto significa que un microorganismo puede desarrollar resistencia a los carbapenémicos (*Carbapenem resistant*

*organismos*, CRO) y/o convertirse en un productor de carbapenemasas (*Carbapenemase producing organisms*, CPO)(20).

Las enzimas  $\beta$ -lactamasas se describieron poco después del descubrimiento de la penicilina en una cepa de *Escherichia coli* (21). Desde entonces, se han identificado más de 2600 enzimas que interactúan con diversos tipos de betalactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. A pesar del tiempo transcurrido, las  $\beta$ -lactamasas mantienen su estatus como el mecanismo de resistencia más relevante en las bacterias Gram negativas, particularmente en el grupo ESKAPE. Estas enzimas se encuentran principalmente en el periplasma, donde descomponen los antibióticos  $\beta$ -lactámicos antes de que lleguen a sus objetivos, las proteínas de unión a la penicilina en la pared celular (20,22).

Existen dos grandes clasificaciones de  $\beta$ -lactamasas; la Clasificación de Ambler (Clases A-D), establecida en 1980, se fundamenta en la estructura molecular de la enzima y la secuencia de aminoácidos. Por otro lado, en 2010 surgió el sistema de clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (grupos 1-4), que combina la estructura molecular con la capacidad hidrolítica y los inhibidores funcionales (23,24). Se puede observar cierta similitud estructural en las clases A, C y D, las cuales son de tipo serina. En contraste, la Clase B (metalo- $\beta$ -lactamasas) contiene uno o dos iones de zinc en sus sitios activos (20).  
Tabla 2.

La Clase A abarca un conjunto de enzimas que se encuentran con frecuencia en bacilos Gram negativos (BGN) y en cocos Gram positivos (CGP), entre las que destacan TEM, SHV, CTX-M y KPC. No obstante, son pocas las enzimas de la Clase A que presentan actividad contra los carbapenémicos, y en este selecto grupo se incluyen las KPC, así como GES, Nmc-A, IMI y SME. En la actualidad, en Estados Unidos, la mayoría de los casos de resistencia a los carbapenémicos se atribuye a enzimas de tipo KPC (20,22). Es importante resaltar que estas enzimas exhiben una resistencia *in vitro* que difícilmente puede ser superada por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas comúnmente disponibles, como tazobactam, clavulanato y sulbactam. Sin embargo, nuevos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como avibactam, relebactam y vaborbactam han demostrado eficacia en la inhibición de las enzimas de Clase A (25,26).

En contraste, las enzimas de la Clase B son capaces de degradar los  $\beta$ -lactámicos con la asistencia de un cofactor de metal que contiene iones de Zinc, denominadas Metalo  $\beta$ -lactamasas (MBL). Estas enzimas presentan resistencia no solo a las penicilinas y cefalosporinas, sino también a los carbapenémicos y a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa. Un detalle interesante es que los monobactámicos se mantienen estables frente a estas enzimas, lo que los convierte en una opción eficaz en ausencia de otros factores de resistencia concurrentes. Sin embargo, el sistema catalítico de las MBLs puede ser inhibido por agentes quelantes de metales como el EDTA. Entre las MBLs con mayor dispersión en todo el mundo se incluyen las NDM, IMP y VIM, destacándose la NDM como la carbapenemasa con mayor probabilidad de convertirse en la más prevalente a nivel mundial (20,26).

La Clase C comprende en su mayoría a las enzimas de tipo serina AmpC, que generalmente se encuentran codificadas en los genes de los cromosomas bacterianos. Los organismos que expresan estas enzimas muestran resistencia a las penicilinas, a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato y el tazobactam, así como a la mayoría de las cefalosporinas. Sin embargo, estas enzimas hidrolizan con poca eficacia la cefepime y rara vez afectan a los carbapenémicos, lo que representa un mecanismo distintivo de resistencia (20,25,26).

Por último, la Clase D, originalmente llamada Oxacilinasas debido a su capacidad para hidrolizar la oxacilina a una tasa un 50% más rápida que la bencilpenicilina. La mayoría de estas enzimas no pueden ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas comerciales, pero su actividad puede ser inhibida in vitro mediante el uso de cloruro de sodio (NaCl). Se han identificado más de 490 tipos diferentes de enzimas de Clase D, y aunque la mayoría no muestra actividad frente a los carbapenémicos, en la actualidad se ha observado un aumento significativo en el aislamiento de la OXA-48 en *Enterobacteriales*, convirtiéndose en la variante más común. Cabe destacar que la eficacia de estas enzimas para hidrolizar los carbapenémicos suele ser menor en comparación con otras carbapenemasas, y generalmente se expresan junto con otros mecanismos de resistencia (20,26).

**Tabla 2. Carbapenemasas más importantes en *Enterobacteriales*.**

Ambler	Gen representativo	Numero de variantes	Localización del Gen	Bacteria origen
A	KPC ( <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> )	>84	Plásmido	<i>K. pneumoniae</i>
	GES ( <i>Guiana extended spectrum</i> )	>27	Plásmido	<i>P. aeruginosa</i>
	IMI ( <i>Imipenem-hydrolysing beta-lactamase</i> )	>9	Cromosoma	<i>E. cloacae</i>
	SME ( <i>Serratia marcescens enzyme</i> )	>5	Cromosoma	<i>S. marcescens</i>
	SFC ( <i>Serratia fonticola carbapenemase-1</i> )	>1	Cromosoma	<i>S. fonticola</i>
	NMC-A ( <i>not metalloenzyme carbapenemase A</i> )	>1	Cromosoma	<i>E. cloacae</i>
B	NDM ( <i>New Delhi metallo-lactamase</i> )	>29	Plásmido	<i>K. pneumoniae</i>
	VIM ( <i>Verona integron-encoded metallo-lactamase</i> )	>69	Plásmido	<i>P. aeruginosa</i>
	IMP ( <i>Imipenemase</i> ),	>85	Plásmido	<i>S. marcescens</i>
	GIM ( <i>German imipenemase</i> )	>2	Plásmido	<i>P. aeruginosa</i>
	SIM ( <i>Seoul imipenemase</i> )	>1	Plásmido	<i>P. aeruginosa</i>
D	OXA ( <i>Oxacillin-hydrolyzing carbapenemase</i> )	>40	Plásmido	<i>K. pneumoniae</i>

Adaptado de Caliskan-Aydogan, A Review of Carbapenem Resistance in *Enterobacteriales* and Its Detection Techniques.

## Reposicionamiento de medicamentos

En el contexto actual de la resistencia a los antimicrobianos, las opciones de tratamiento para organismos MDR se han visto disminuidas a lo largo de los años. A pesar de la introducción de nuevas moléculas, el arsenal terapéutico se reduce continuamente, y es preocupante el hecho de que en las últimas cinco décadas no se haya desarrollado una nueva clase de antibióticos efectivos contra bacilos Gram negativos (BGN), lo que plantea un panorama médico desafiante (6,27).

Para abordar esta creciente amenaza de organismos resistentes, en particular aquellos que son resistentes a carbapenémicos, se han propuesto diversos enfoques terapéuticos innovadores. Uno de ellos se centra en el desarrollo de moléculas que, aunque no son directamente bactericidas, inhiben vías moleculares clave para la comunicación bacteriana, como el proceso de *Quorum Sensing*. Este enfoque ha despertado un gran interés en la comunidad científica, ya que podría proporcionar nuevas estrategias para combatir la resistencia antibiótica (7).

Además, la terapia combinada ha surgido como una estrategia efectiva para abordar la resistencia bacteriana. Se han desarrollado inhibidores de enzimas, como los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, algunos de los cuales ya están en el mercado, mientras que otros están en proceso de investigación y se espera que proporcionen resultados clínicos positivos en un futuro cercano (28).

Una perspectiva adicional para abordar esta crisis es la reutilización de medicamentos. Este enfoque busca aprovechar medicamentos existentes que ya han sido aprobados por las agencias reguladoras y darles un nuevo propósito, adaptándolos para combatir las infecciones causadas por organismos resistentes. Esta estrategia de "reciclaje" de fármacos ofrece la posibilidad de ampliar las opciones terapéuticas disponibles y optimizar el uso de recursos médicos (8).

El enfoque de reposicionamiento de fármacos no implica modificar la estructura de los medicamentos, sino que se centra en encontrar nuevas aplicaciones terapéuticas basadas en sus propiedades biológicas. Esta estrategia ofrece ventajas como una menor probabilidad de fracaso, perfiles de seguridad mejorados, procedimientos de desarrollo más rápidos gracias a las pruebas preclínicas previamente realizadas y costos financieros reducidos. Puede ser una alternativa atractiva para abordar diversas enfermedades humanas, como el cáncer, las enfermedades infecciosas, las neurodegenerativas y las autoinmunitarias. Sin embargo, enfrenta desafíos como la comprensión de los requisitos regulatorios, limitaciones financieras y de recursos, obstáculos en ensayos clínicos, problemas de propiedad intelectual y análisis de mercado (8).

Existen diferentes estrategias para el reposicionamiento de fármacos. Tales como:

- Acoplamiento molecular. Es un método computacional que predice la afinidad entre la estructura objetivo y el ligando en forma de energía de unión. Se utilizan diversas técnicas de acoplamiento basadas en tipos de bases de datos, y se realizan múltiples pasos de acoplamiento contra un objetivo con diferentes fármacos relacionados con distintas enfermedades. Ampliamente usado como primera línea ante enfermedades nuevas o emergentes (28,29).
- Experimental. El tamizaje implica la prueba simultánea de compuestos en un ensayo farmacológico contra el objetivo: cuantos más compuestos se evalúen, más candidatos de reposicionamiento se obtienen. Luego, se separan los compuestos más favorables para realizar el acoplamiento de un fármaco con muchos objetivos (*off-target*) o de un objetivo con muchos fármacos (*on-target*). Se

utilizan la cromatografía de afinidad y la espectrometría de masas para identificar socios de unión para muchos fármacos (28,29).

- Adyuvantes. Se realiza al unir compuestos con antibióticos para aumentar su eficacia y reducir la resistencia bacteriana. Estos compuestos, llamados adyuvantes, tienen varias ventajas, como disminuir la resistencia, mejorar la eficacia y ampliar el espectro de acción de los antibióticos. Los adyuvantes trabajan de diversas maneras, como aumentar la absorción del antibiótico y bloquear mecanismos de resistencia bacteriana, lo que puede prolongar la utilidad de los antibióticos (28,29).
  - Tipo 1a. Se unen a antibióticos y actúan inactivando enzimas hidrolíticas, inhibiendo bombas de flujo o alterando los sitios de unión. Ejemplo: inhibidores de betalactamasas.
  - Tipo 1b. El adyuvante de tipo 1b potencia la acción de los antibióticos al bloquear mecanismos de resistencia y factores no relacionados con el sitio objetivo. Por ejemplo, la loperamida mejora la captación de tetraciclina al modificar el pH intracelular.
  - Tipo 2. Estos no se unen a los antibióticos, sino que influyen en las propiedades del huésped para potenciar su acción. Suelen dirigirse a los mecanismos inmunitarios del huésped, como las proteínas que suprimen el sistema inmunológico y la inflamación. La estreptazolina es un ejemplo que activa el factor nuclear- $\kappa$ B para potenciar la actividad de los macrófagos.
- Modo de implementación: Cambiar la forma de administración de un medicamento puede aumentar su efectividad; por ejemplo, la inhalación de anfotericina B en pacientes con fibrosis quística (28,29).
- Blanco a vías de señalización en las células del huésped. Estos medicamentos bloquean o activan rutas de señalización en las células huésped, protegiendo contra infecciones virales y bacterianas (28,29).

Un ejemplo de lo anterior es el ticagrelor, un medicamento utilizado en enfermedades cardiovasculares, posee actividad antibacteriana contra cepas *S. aureus* resistentes a meticilina y *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina. Aunque las concentraciones antibacterianas no se alcanzan en pacientes con dosis típicas, la actividad antibacteriana podría lograrse a través de la acumulación local, posiblemente impulsada por plaquetas, en sitios de infección. Estos hallazgos podrían explicar la reducción de muertes por infección con ticagrelor en el estudio PLATO (30). El ticagrelor no mostró actividad antibacteriana en BGN. Además, se abre la posibilidad de desarrollar nuevos antibióticos basados en el ticagrelor sin efectos antiplaquetarios (31).

Se ha descrito también efectos antimicrobianos de otros fármacos, el ejemplo son los antipsicóticos que en diferentes ocasiones se han evaluado en modelos *in vitro* en curvas de tiempo-muerte mostrando CIM reducidas para cepas de CGP y BGN. Un grupo de científicos europeos publicó en el 2018 el efecto antibiótico que tienen los antipsicóticos, principalmente clorpromazina y tioridacina (32,33).

### Clorpromazina

La clorpromazina (CPZ) fue sintetizada en diciembre de 1951 en Francia por el investigador Paul Charpentier en los laboratorios de *Rhône-Poulenc*, liberada en 1952 para su investigación clínica como posible agente potenciador de la anestesia general (34). En 1952, Henri Laborit descubrió su potencial uso en la rama de la psiquiatría, a dosis de 50 a 100 mg en vía intravenosa produjeron “desinterés sin pérdida de conciencia y con solo una ligera tendencia al sueño”. En ese mismo año se probó su efecto en un paciente esquizofrénico con un episodio psicótico controlando su agitación. A partir de este

momento se iniciaron estudios para evaluar su efecto y seguridad en pacientes esquizofrénicos. Por casi 70 años se consideró el estándar de oro de los fármacos antipsicóticos (34).

La CPZ (3- [2-clorofenotiazin-10-il] -N, N-dimetilpropan-1-amina), antipsicótico de primera generación (típico), es un derivado, de bajo peso molecular, de la fenotiazina. Aprobada en 1957 por la FDA para el tratamiento de esquizofrenia. Actualmente se encuentra en forma de tableta a dosis de 10, 25, 50, 100 y 200 mg; y una formulación intravenosa de 25 mg/ml (35).

Dentro de sus características farmacológicas, la CPZ presenta alta afinidad por los receptores de dopamina (D2R) actuando como antagonista, inhibiendo la actividad del adenilato ciclasa. También exhibe un fuerte efecto de bloqueo alfa-adrenérgico y deprime la liberación de hormonas hipotalámicas e hipofisarias; Se cree que deprime el sistema de activación reticular, lo que afecta el metabolismo basal, la temperatura corporal, la vigilia, el tono vasomotor y la emesis (36,37).

En sus características farmacocinéticas destaca: inicio de acción a los 15 minutos por la vía intramuscular y 30 a 60 minutos por la ruta oral; con una duración de 4 a 6 horas. Tiene una biodisponibilidad oral de 32% y presenta un primer paso hepático. Con un volumen de distribución de 15.7 L/kg en la primera dosis y 8.38 L/Kg en su estado estable. Su unión a proteínas es de 92-97% y cuenta con metabolismo hepático mediante desmetilación y oxidación de aminas. Su excreción es por vía urinaria, sin ajuste renal por tasa de filtración glomerular (38).

Actualmente la CPZ no se encuentra dentro los fármacos de primera línea (ni segunda línea) para el tratamiento de la esquizofrenia, dado a sus efectos adversos y el mejor perfil de seguridad de los nuevos antipsicóticos (atípicos). Otras indicaciones como tratamiento alternativo en el mercado son: desorden bipolar, hipo intratable, hiperactividad, náusea y vómito (refractarias) y tétanos (36,37).

#### Antecedentes

El efecto antibiótico de la CPZ se conoce desde publicaciones de los años 70s, 80s y 90s donde se demostraron secuelas deletéreas en los pilis de *E. coli* y en los factores de virulencia de *Bordetella spp*. Más contemporáneo, en el 2008 se demostró su efecto *in vitro* en la inhibición de los genes de bombas de flujo (*acrB*, *arcD*, *acrF*, *tolC*) de *Salmonella typhimurium*, lo que derivó en un efecto sinérgico con los antibióticos sobre las cepas de *Salmonella spp* (39–41).

El mecanismo por el cual las fenotiazinas actúan sobre las células bacterianas *in vitro* ha sido estudiado por varios investigadores durante los últimos años. A dosis bajas logra un efecto bacteriostático en cepas de *S. aureus* posiblemente interfiriendo en transporte de potasio a través de la membrana bacteriana. Por otro lado, a dosis más altas genera un efecto bactericida en las mismas cepas (32,42).

Nehme *et al* publicaron en 2018 la CIM para múltiples agentes antipsicóticos y diferentes cepas de bacterias (33). Las CIMs de CPZ expresadas en µg/ml para *Enterobacteriales* fueron:

	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>E. coli</i> BLEE	<i>K. pneumoniae</i> DSM 16609	<i>K. pneumoniae</i> BLEE
<b>CPZ</b>	64	64	64-128	64-128

No se tiene evidencia del efecto de la CPZ en *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas y su posible sinergia con el uso de antibióticos. Estudios en CGP han demostrado sinergia con β-lactámicos.

Un experimento *in vitro* analizó el efecto de CPZ más ampicilina u oxacilina en cepas de MSSA y en MRSA. Además, se analizó mediante microscopía de transmisión de electrones los efectos de la CPZ en las cepas de MRSA. Los resultados confirmaron la sinergia de CPZ con  $\beta$ -lactámicos, especialmente las cepas de MRSA. Las imágenes de microscopía de MRSA mostraron un cambio de la membrana citoplásmica y la pared celular después de la exposición a CPZ. Las cepas de MRSA no tratadas con CPZ estaban intactas (32).

Un estudio reciente de Aguilar-Vega y colaboradores probaron derivados de fenotiazina, como la prometazina y la clorpromazina, en cepas MDR de *A. baumannii*. En sus resultados CPZ inhibió el desarrollo de *A. baumannii* sensible y resistente en concentraciones de 0.05 g/L a 0.6 g/L. Todos los derivados de fenotiazina fueron efectivos contra el biofilm, con concentraciones mínimas de erradicación de biofilm que oscilaban entre 0.5 y  $>3 \text{ g l}^{-1}$ . La clorpromazina promovió la producción de especies reactivas de oxígeno y causó daño en la membrana celular y el ADN. La clorpromazina mostró sinergia con antibióticos como la ceftazidima, el meropenem y la colistina, y fue un tratamiento efectivo en *Galleria mellonella* infectada experimentalmente cuando se combinó con ceftazidima (43)

## Justificación

La resistencia antimicrobiana se proyecta como una amenaza inminente, estimándose que para el 2050 podría causar más muertes que la diabetes y el cáncer combinados. Este escenario plantea una seria preocupación, ya que procedimientos médicos fundamentales, como cirugías mayores y trasplantes, podrían volverse inviables en ausencia de antibióticos efectivos contra esta nueva generación de bacterias resistentes.

En este contexto, los BGN ocupan un lugar destacado en la lista de MDR que requieren con urgencia nuevos antimicrobianos, con un enfoque particular en las *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.

El desarrollo de nuevos fármacos con propiedades antimicrobianas es un proceso largo y costoso. Por lo tanto, la reutilización de moléculas previamente aprobadas por las entidades regulatorias nacionales o internacionales surge como una estrategia prometedora. Aunque varias moléculas en el mercado han demostrado tener potencial antibiótico, es esencial realizar estudios *in vitro* para determinar su concentración mínima inhibitoria, tanto como fármaco único como en combinación con otros antibióticos.

Un ejemplo interesante es la CPZ, una fenotiazina comúnmente utilizada en el tratamiento de la esquizofrenia, que ha mostrado propiedades antibióticas. A pesar de ello, existe una escasez de literatura que explore en profundidad el efecto antimicrobiano de la CPZ, su mecanismo de acción y su capacidad de interactuar sinérgicamente con otros antibióticos. Los experimentos que investigan su impacto en cepas resistentes, como el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), han arrojado resultados alentadores y sugieren la posibilidad de reposicionar este fármaco para combatir infecciones resistentes.

Hasta la fecha, no se han documentado publicaciones que aborden el efecto sinérgico *in vitro* de la CPZ en *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas. Descubrir su utilidad en este contexto podría abrir nuevas puertas en el diseño de estrategias terapéuticas innovadoras y contribuir significativamente a hacer frente al desafío global de la resistencia antimicrobiana.

## Pregunta de investigación

¿La CPZ disminuirá las CIMs de los antibióticos para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas?

## Hipótesis

La CPZ disminuirá las CIMs de los antibióticos para para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.

## Objetivos

### Objetivo General:

- Evaluar la capacidad sinérgica de CPZ en combinación con antibióticos para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.

### Objetivos secundarios:

- Identificar el tipo de enzima de las *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas mediante métodos moleculares.
- Determinar las CIM para  $\beta$ -lactámicos, colistina, quinolonas, amikacina, trimetoprima/sulfametoxazol y tetraciclinas de las *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.
- Determinar la CIM de CPZ para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.
- Determinar el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) para la combinación de CPZ con  $\beta$ -lactámicos, colistina, quinolonas, amikacina, trimetoprima/sulfametoxazol y tetraciclinas para *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.
- Describir la proporción de combinaciones con efecto sinérgico con base en microorganismo y carbapenemasa.

## Diseño y metodología

**Tipo de estudio:** Experimental, ciencias básicas.

**Población diana:** *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas.

**Población de estudio:** Aislados clínicos de *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas del cepario de *Enterobacteriales* productoras de carbapenemasas del laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Rehabilitación.

### Tamaño de muestra:

Dado que es un estudio de investigación básica, el tamaño de muestra no se puede calcular con exactitud. Se consideró a conveniencia una N de 32 cepas, de las cuales: 10 son productoras de enzimas clase A, 10 son productoras de enzimas clase B, 10 son productoras de enzimas clase D y 2 son mixtas.

Sin embargo, se calculó un tamaño de muestra con una prevalencia estimada del 5%, considerando los hallazgos del estudio de Garza-González E et al; un margen de error del 2% para una muestra infinita y un alfa de 0.5. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 pq}{M^2}$$

Donde:

$z=1.96$

$p=0.05$

$q=0.95$

$M=0.02$

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.05) (0.95)}{(0.02)^2} = 438$$

Por lo tanto, se requieren 438 muestras de *Enterobacteriales* para encontrar una prevalencia estimada de 5% de resistencia a carbapenémicos, lo anterior es una N de 22 cepas de *Enterobacteriales* resistentes a carbapenémicos.

## Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo	Unidad de medida
<b>Microorganismo</b>	Bacterias del orden de <i>Enterobacterales</i>	Género y especie de las bacterias seleccionadas	Nominal Independiente	Ejemplo: <i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>
<b>CIM de antibióticos</b>	Unidad de medida en µg/ml que determina la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación	Se calculará con el método de microdilución en caldo con las reglas y puntos de corte del CLSI 2021, de los siguientes antibióticos:  Ceftazidima Meropenem Ertapenem Colistina Levofloxacino Amikacina Trimetoprim/ Sulfametoxazol Tigeciclina(se usarán los puntos de corte de EUCAST) Doxiciclina Aztreonam	Cuantitativa discreta Independiente	Diluciones en µg/ml preestablecidos en las siguientes medidas  512 256 128 64 32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.125 0.0625
<b>Genes de carbapenemasas</b>	Las carbapenemasas se sintetizan a través de genes ya determinados. Los más importantes se engloban son los siguientes:  GES KPC NDM VIM IMP OXA-48 like	Mediante reacción en cadena de polimerasa punto final se buscará la presencia de genes constitutivos de carbapenemasas antes descritos	Nominal Independiente	-Positivo (1): Presencia de uno o más genes constitutivos de carbapenemasas  -Negativo (2): Ausencia de genes de carbapenemasas
<b>CIM de CPZ</b>	Unidad de medida en µg/ml que determina la concentración más baja de CPZ que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación	Se calculará con el método de microdilución en caldo con las reglas y puntos de corte del CLSI	Cuantitativa discreta Independiente	Diluciones preestablecidas en las siguientes medidas  512 256 128 64 32 16 8 4 2

				1 0.5 0.25 0.125 0.0625
<b>CIM de CPZ en combinación con antibióticos</b>	Unidad de medida en µg/ml que determina la concentración más baja de CPZ + diferentes antibióticos que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación	Unidad de medida en µg/ml que determina la concentración más baja para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de su incubación mediante la combinación de un antibiótico y una medida estándar de CPZ.  Combinaciones: Ceftazidima + CPZ (CAZ-CPZ) Meropenem + CPZ (MEM-CPZ) Ertapenem + CPZ (ETP-CPZ) Colistina + CPZ (CL-CPZ) Levofloxacino + CPZ (LVX-CPZ) Amikacina + CPZ (AN-CPZ) Trimetoprim/ Sulfametoxazol + CPZ (SXT-CPZ) Tigeciclina + CPZ (TGC-CPZ) Doxiciclina + CPZ (DO-CPZ) Aztreonam + CPZ (ATM-CPZ)	Cuantitativa discreta  Dependiente	Diluciones preestablecidas en las siguientes medidas  512 256 128 64 32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.125 0.0625
<b>Índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC)</b>	Razón de la comparación de la CIM combinado entre el CIM del agente microbiano solo.  FIC: $\left(\frac{CIM_{a+b}}{CIM_a}\right) + \left(\frac{CIM_{a+b}}{CIM_b}\right)$  Donde: CIM <sub>a</sub> : Valor de CIM de un antibiótico cualquiera CIM <sub>b</sub> : Valor de la CIM determinada de CPZ CIM <sub>a+b</sub> : Es la CIM de combinación de un antibiótico y la CPZ	Interpretación del resultado de FIC:  ≤ 0.5: Sinergia >0.5- 4: Indiferente >4: Antagonismo	Cuantitativa continua  Dependiente	Cualquier número natural.

## Análisis estadístico

El procesamiento de datos se realizó utilizando el programa Excel, mientras que el análisis estadístico se llevó a cabo en el programa STATA versión 16. En el análisis descriptivo, se presentaron las medidas centrales y de dispersión adecuadas según la distribución de las variables. Para aquellas variables con una distribución normal, se reportaron la media y la desviación estándar, mientras que para aquellas con distribución no normal, se presentaron la mediana y el rango intercuartil. Las variables nominales se describieron mediante la frecuencia absoluta.

En el análisis de la significancia estadística, se estableció un nivel de significancia de 0.05 y se consideró un enfoque de dos colas, con un poder estadístico del 90%. Para evaluar la sinergia entre los antibióticos y la CPZ, se calculó el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC), donde se consideró que existe sinergia cuando el FIC era igual o menor a 0.05.

Para comparar las diferencias entre las combinaciones con  $FIC \leq 0.5$  y las combinaciones con  $FIC > 0.5$ , se aplicó la prueba de rangos de Wilcoxon. Asimismo, para evaluar las diferencias entre grupos, como los tipos de antibióticos, la presencia de carbapenemasas y los microorganismos evaluados, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

## Material y Financiamiento

Lugar: Laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Rehabilitación

Material: Instrumentos de rutina de microbiología para identificación y determinación de resistencia bacteriana. Sal de CPZ y sales de antibióticos como:

- Amikacina (AN)
- Aztreonam (ATM)
- Ceftazidima (CAZ)
- Colistina (CL)
- Doxiciclina (DO)
- Ertapenem (ETP)
- Meropenem (MEM)
- Levofloxacino (LVX)
- Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT)
- Tigeciclina (TGC)

**Financiamiento:** Todo el material será proporcionado por el laboratorio de infectología.

## Diagrama de trabajo

1. Identificación de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos.
  - a. Cepario: cepas almacenadas en ultracongelación a 70°.
  - b. Identificar en la base de datos género y especie de cada bacteria.
2. Se sembraron las cepas (viabilidad) y se corroboró resistencia a carbapenémicos mediante método de microdilución en caldo.
  - a. Viabilidad. Resiembra de las cepas en agar sangre de carnero
  - b. Resistencia a los carbapenémicos. Microdilución en caldo.
3. Se documentó la presencia de carbapenemasas por métodos fenotípicos y moleculares
  - a. Fenotípicos:
    - i. mMIC: Método de identificación de carbapenemasas modificado.
    - ii. eMIC: Método de identificación de carbapenemasas modificado-EDTA.
  - b. Moleculares:
    - i. Reacción en cadena de polimerasa punto final de genes codificantes para las siguientes carbapenemasas: KPC, GES, IMP, VIM, NDM, OXA-48.
4. Se seleccionaron aleatoriamente 32 cepas de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.
  - a. Clase A: 10 cepas
  - b. Clase B: 10 cepas
  - c. Clase D: 10 cepas
  - d. Mixtas: 2 cepas
5. Se determinó la CIM mediante el método de microdilución en caldo para el resto de los antibióticos en las cepas seleccionadas. Los antibióticos para estudiar fueron:
  - a. Ceftazidima
  - b. Colistina
  - c. Levofloxacino
  - d. Amikacina
  - e. Trimetoprim/Sulfametoxazol
  - f. Tigeciclina
  - g. Doxiciclina
  - h. Aztreonam
  - i. Meropenem
  - j. Ertapenem
6. Se determinó la CIM mediante el método de microdilución en caldo para la CPZ.
  - a. Primero se realizó en Cepas de control de calidad (ATCC):
    - i. *Enterobacter cloacae* ATCC-BAA-2468. Cepa control tipo Carbapenemasa NDM.
    - ii. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853. Cepa control pruebas de susceptibilidad. No resistencias.
    - iii. *Escherichia coli* ATCC- 25922. Cepa control de CLSI para pruebas de susceptibilidad. No resistencias.

iv. *Klebsiella pneumoniae* ATCC-BAA-1705. Cepa control tipo Carbapenemasa KPC.

v. *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC- 700603. Cepa control de CLSI tipo BLEE para pruebas de susceptibilidad.

b. Posteriormente se realizó CIM de CPZ para las cepas seleccionadas.

7. Se realizó la prueba de sinergias tipo tablero de ajedrez entre los antibióticos y las cepas seleccionados

8. Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional con la siguiente formula:

$$FIC = \left( \frac{MIC_{a+b}}{MIC_a} \right) + \left( \frac{MIC_{a+b}}{MIC_b} \right)$$

Interpretación del resultado de FIC:

- $\leq 0.5$ : Sinergia
- $>0.5- 4$ : Indiferente
- $>4$ : Antagonismo

## Comité de investigación

Autorización Comité de investigación, con numero de registro definitivo:

**INRLGII 39/22**

## Resultados

### Población. Género y especie

En el presente estudio, se incorporaron 32 cepas de *Enterobacterales* que eran productoras de carbapenemasas. Entre estas cepas, se observó que el género y especie más prevalente fue *Klebsiella pneumoniae*, con una frecuencia del 46.9%, seguido de *Escherichia coli*, con un 25%; en tercer lugar, *Klebsiella oxytoca* con un 12.5%. Los detalles adicionales se encuentran en la tabla 1.

**Tabla 1. Frecuencias de Genero y Especie**

Microorganismo	Numero de cepas (frecuencia)
<i>K. pneumoniae</i>	15 (46.9%)
<i>E. coli</i>	8 (25%)
<i>K. oxytoca</i>	4(12.5%)
<i>E. cloacae</i>	2(6.3%)
<i>P. mirabilis</i>	2(6.3%)
<i>M. morganii</i>	1(3.1%)

### Carbapenemasas

La Tabla 2 ofrece una visión detallada de los microorganismos clasificados según la Clasificación Ambler y las carbapenemasas que expresan.

En la Clase A, que comprende principalmente *K. pneumoniae* y *E. coli*, KPC-2 es el gen de carbapenemasa más prevalente (n=9, 90%), presente en todas las cepas de *K. pneumoniae* y en dos de las tres cepas de *E. coli* en este grupo. Únicamente una cepa de *E. coli* exhibe KPC-82.

Dentro de la Clase B, el gen de carbapenemasa NDM-1 destaca como el más predominante (n=6, 60%), encontrado en cuatro cepas de *K. pneumoniae* y dos de *E. cloacae*. Las cuatro cepas restantes son portadoras de VIM, de las cuales tres son VIM-2 y una es VIM-67.

En la Clase D, se observa una combinación de OXA-232, OXA-48 y OXA-181 en diversas cepas de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *K. oxytoca*. Destacan dos cepas co-productoras de KPC-2/NDM-1, una en *K. pneumoniae* y la otra en *E. coli*.

**Tabla 2. Carbapenemasas.**

Clasificación Ambler	Microorganismos	N	Carbapenemasa	N
Clase A	<i>K. pneumoniae</i>	5	KPC-2	5
	<i>K. oxytoca</i>	2	KPC-2	2
	<i>E. coli</i>	3	KPC-2	2
KPC-82			1	
Clase B	<i>K. pneumoniae</i>	5	NDM-1	4
			VIM-2	1
	<i>E. cloacae</i>	2	NDM-1	2
	<i>P. mirabilis</i>	2	VIM-2	2
	<i>M. morgani</i>	1	VIM-67	1
Clase D	<i>K. pneumoniae</i>	4	OXA-232	2
			OXA-48	1
			OXA-181	1
	<i>E. coli</i>	4	OXA-232	2
			OXA-48	2
	<i>K. oxytoca</i>	2	OXA-232	2
Co-productoras	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2/NDM-1	1
	<i>E. coli</i>	1	KPC-2/NDM-1	1
<b>Total</b>		32		32

#### Susceptibilidad a Antibióticos

Los datos completos de susceptibilidad a los antibióticos se describen en la Tabla 3 y el gráfico 1. Ertapenem y Meropenem, ambos carbapenémicos, muestran altas tasas de resistencia, con 84.37% y 68.75% respectivamente. Trimetoprim/sulfametoxazol presenta resistencia del 84.37%. Doxiciclina, Tigeciclina y Levofloxacino tienen tasas de resistencia del 56.25%, 81.25% y 75%, respectivamente. Aztreonam muestra resistencia en el 71.87% de las cepas. En contraste, Amikacina presenta la mayor tasa de susceptibilidad con un 53.12%. Colistina tiene la tasa de resistencia más baja con 15.62%.

En relación con la expresión de las carbapenemasas y su resistencia a meropenem, se observó lo siguiente (Gráfico 2): en el grupo KPC, ninguna cepa fue susceptible, el 60% resultó resistente y el 40% mostró resistencia intermedia. En el grupo KPC/NDM, ambas cepas fueron resistentes (100%). En el grupo NDM, todas las cepas exhibieron resistencia (100%). En cuanto al grupo OXA-48, el 70% de las cepas se catalogaron como resistentes, el 20% mostró resistencia intermedia y el 10% fue susceptible. Por último, en el grupo VIM, el 75% de las cepas fueron susceptibles (3 cepas), mientras que el 25% se consideró resistente (1 cepa).

**Tabla 3. Perfil de susceptibilidad de las 32 cepas a los antibióticos evaluados**

Antibióticos	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ertapenem	3(9.37)	2(6.25)	27(84.37)
Meropenem	9(28.1)	1(3.1)	22 (68.75)
Trimetoprim/sulfametoxazol	5(15.62)	0	27(84.37)
Colistina	NA	27(84.37)	5 (15.62)
Doxiciclina	9(28.12)	5(15.62)	18(56.25)
Tigeciclina	6 (18.75)	0	26 (81.25)
Levofloxacino	6 (18.75)	2 (6.25)	24(75)
Aztreonam	9(28.12)	0	23(71.87)
Amikacina	17(53.12)	2(6.25)	13 (40.625)

**Gráfico 1. Susceptibilidad de las 32 cepas a los antibióticos**

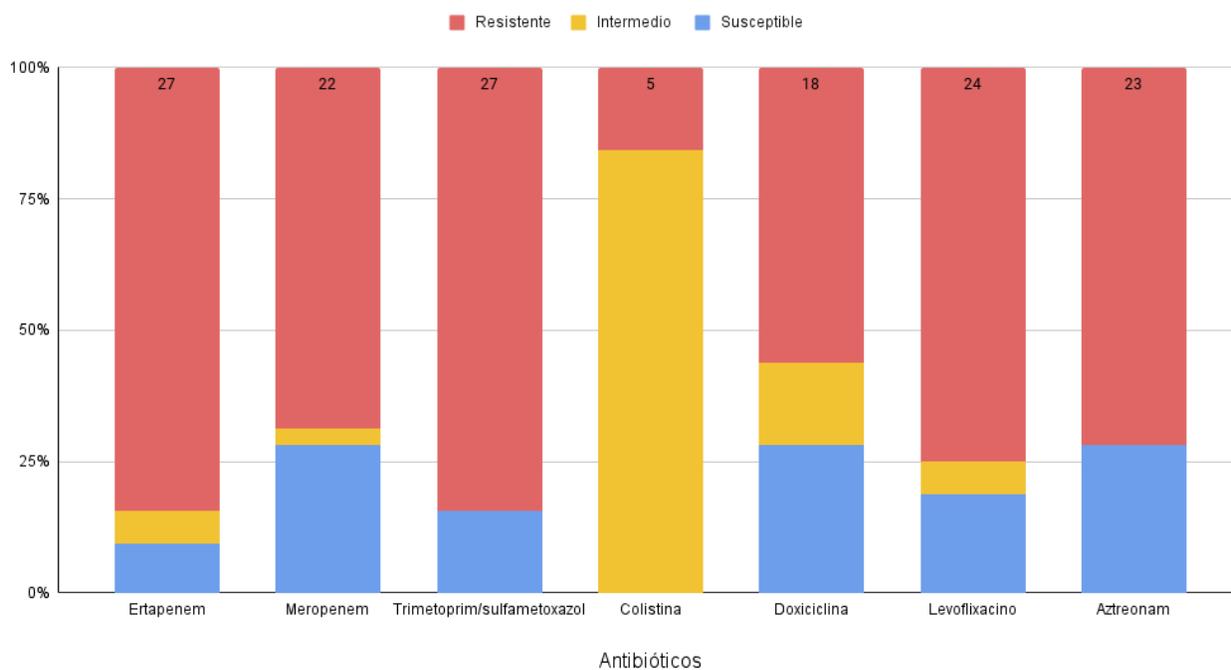


Gráfico 2. Susceptibilidad a Meropenem con base en las carbapenemasas

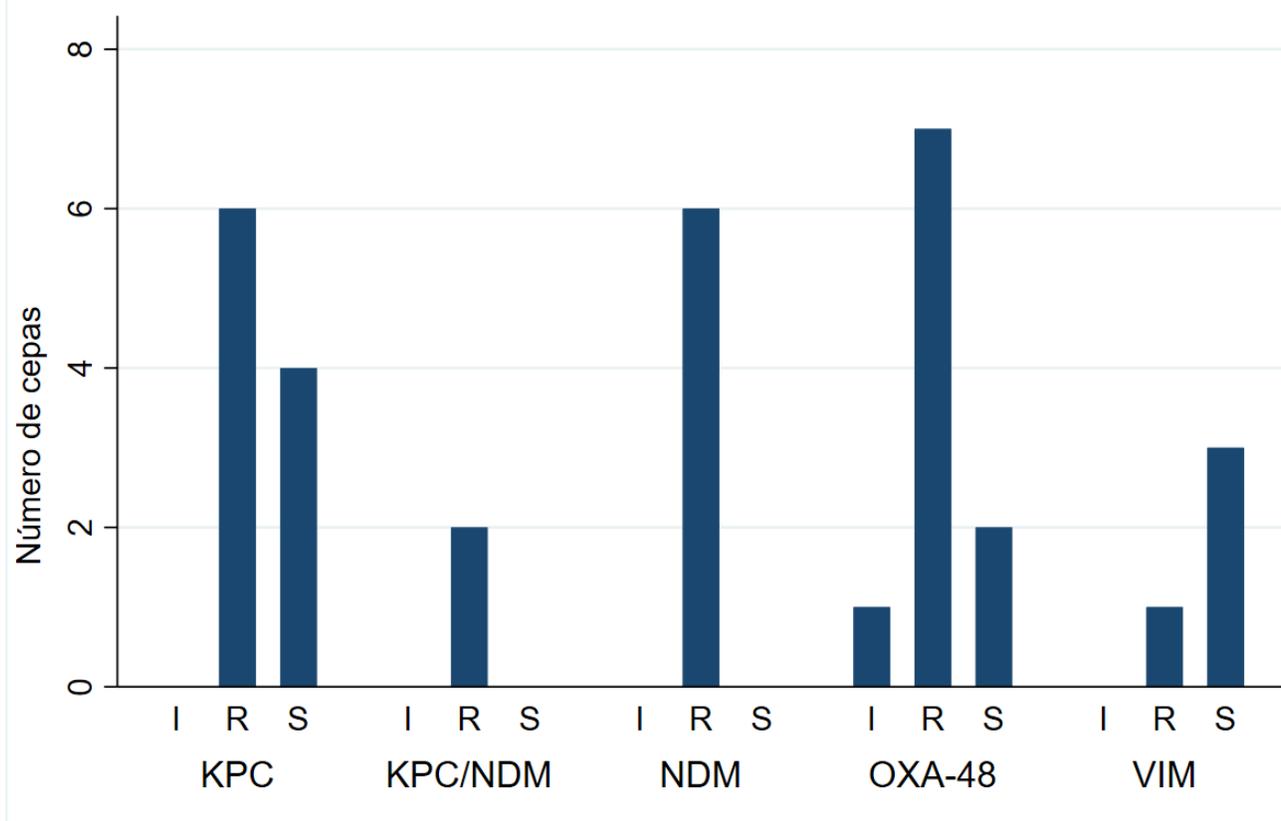


Gráfico 2. I: intermedio, R: resistente, S: susceptible

#### Concentración inhibitoria mínima de Clorpromazina

Los resultados de la CIM para CPZ indican que la mayoría de las cepas tienen una concentración de 16 µg/ml (n=19, 59.38%), seguida por un número más reducido de cepas con concentraciones de 8 µg/ml (n=5, 15.36%), 32 µg/ml (n =5, 15.36%) y 128 µg/ml (n=3, 9.38%). La CIM50 de CPZ fue 16 µg/ml y la CIM90 fue 32 µg/ml. En la Tabla 4 se encuentran los resultados de las cepas de control de calidad ATCC. La tabla 5 contiene los datos resumidos de la CIM para CPZ y en la tabla 6 se encuentran las CIM de CPZ para cada cepa. Por último, en la tabla 7 se observan los datos de la CIM con base en el microorganismo.

**Tabla 4. CIM de CPZ en cepas de control de calidad ATCC**

Microorganismo	Resistencia	CIM µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC-27853	Sin resistencia	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC- 25922	Sin resistencia	64
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> ATCC- 700603	BLEE	64
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC-BAA-2468	NDM	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC-BAA-1705	KPC	256

**Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de clorpromazina**

CIM de clorpromazina µg/ml	Frecuencia	Porcentaje
8	5	15.63%
16	19	59.38%
32	5	15.63%
128	3	9.38%

**Tabla 6. CIM de CPZ de cada cepa**

Cepa	CIM µg/ml						
EB2024	16	EB3487	8	EB4338	16	EB4407	16
EB2572	32	EB3789	32	EB4339	16	EB4409	16
EB2637	8	EB3828	16	EB4340	16	EB4411	16
EB2841	8	EB3877	8	EB4350	32	EB4412	16
EB2896	8	EB4161	16	EB4375	16	EB4416	16
EB3034	16	EB4286	128	EB4376	16	EB4433	16
EB3081	16	EB4332	32	EB4390	16	EB4438	16
EB3349	32	EB4335	16	EB4400	128	EB4816	128

Tabla 6. EB2024-EB4816: etiqueta de identificación asignada a cada cepa dentro del cepario del Laboratorio de Microbiología del INRLGII.

**Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria de clorpromazina con base al microorganismo**

CIM de clorpromazina µg/ml	Microorganismo					
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>M.morganii</i>
8	1	3	1	0	0	0
16	10	5	3	1	0	0
32	4	0	0	1	0	0
128	0	0	0	0	2	1

## Sinergias, concentración inhibitoria fraccional (FIC)

Se llevaron a cabo ensayos de sinergia entre la clorpromazina y diferentes antibióticos, lo que resultó en un total de 288 combinaciones únicas. Sin embargo, se excluyó la combinación con colistina debido a los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias, donde la mayoría de las cepas mostraron CIM por debajo de 0.5  $\mu$ /ml.

En lo que respecta a las combinaciones restantes con otros antibióticos, los resultados se distribuyeron de la siguiente manera: de las 288 combinaciones, 41 mostraron una FIC  $\leq 0.5$ , mientras que 247 presentaron un FIC  $> 0.5$ . Esto se tradujo en un porcentaje del 14.24% y 85.76%, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 8. Sumatoria de combinaciones del FIC**

Total de combinaciones	FIC $\leq 0.5$	FIC $> 0.5$	P
288	41 (14.24%)	247 (85.76%)	$< 0.001$

**Tabla 9. Índice de concentración inhibitoria fraccional por combinación de antibióticos.**

Combinaciones	Índice de Concentración inhibitoria fraccional (FIC)							Total
	0.1	0.3	0.5	0.6	0.75	1	1.25	
MEM + CPZ	0	0	4	1	10	17	0	32
ETP + CPZ	0	0	2	0	17	13	0	32
ATM + CPZ	0	0	5	0	16	10	1	32
CAZ + CPZ	0	0	8	0	18	6	0	32
ANK + CPZ	0	0	6	0	19	7	0	32
LVX + CPZ	0	0	6	1	20	5	0	32
TIG + CPZ	0	1	1	0	8	22	0	32
DOX + CPZ	1	0	3	0	5	23	0	32
STX + CPZ	0	0	4	0	21	6	1	32

Basándonos en las combinaciones de antibióticos y clorpromazina, se destaca que la ceftazidima registró la mayor proporción de sinergias (FIC  $\leq 0.5$ ) con un 25% de las cepas. Esta proporción resulta estadísticamente significativa cuando se compara contra las sinergias de tigeciclina ( $p < 0.001$ ), ertapenem ( $p = 0.01$ ), meropenem ( $p = 0.02$ ) y doxiciclina ( $p < 0.001$ ). En segundo lugar, en términos de proporción de sinergias se encuentran levofloxacino y amikacina, ambos con un porcentaje del 18.75%. Por otro lado, tigeciclina y ertapenem registraron el porcentaje más bajo con un 6.25% (Tabla 10).

**Tabla 10. Proporción de sinergias por antibiótico**

FIC	AN (32)	ATM (32)	CAZ (32)	DO (32)	ETP (32)	LVX (32)	MEM (32)	SXT (32)	TGC (32)
>0.5	26	27	24	28	30	26	28	28	30
≤0.5	6	5	8	4	2	6	4	4	2
<b>Sinergia (%)</b>	18.75	15.625	25	12.5	6.25	18.75	12.5	12.5	6.25

En cuanto a los resultados divididos por subgrupos de carbapenemasas, se observó que la enzima VIM, con un total de 36 combinaciones, presentó 13 de estas con sinergia (FIC ≤ 0.5). Esta diferencia se reveló estadísticamente significativa al compararla con otras enzimas como KPC (7/83, p < 0.001), KPC/NDM (0/18, p < 0.001), NDM (10/44, p = 0.01) y OXA-48 (11/79, p < 0.001). En la Tabla 11 se muestran más detalles sobre las proporciones de sinergias por subgrupos de enzimas.

**Tabla 11. Proporción de sinergias por tipo de enzima**

FIC	Enzimas (número de combinaciones)				
	KPC (90)	KPC/NDM (18)	NDM (54)	OXA-48 (90)	VIM (36)
>0.5	83	18	44	79	23
<0.5	7	0	10	11	13
<b>Sinergia (%)</b>	7.70%	0%	18.50%	13.90%	36%

Según el género y la especie de las cepas, *Proteus mirabilis* destacó como el género con la mayor proporción de sinergias en todas las combinaciones, registrando 9 sinergias de 18 combinaciones (50%). Esta proporción resultó estadísticamente significativa al compararla con otras especies, ya que *P. mirabilis* mostró diferencias notables con *E. cloacae* (0/18, p < 0.001), *E. coli* (3/72, p < 0.001), *K. oxytoca* (2/36, p < 0.001) y *K. pneumoniae* (24/135, p = 0.002). Otra especie que presentó una proporción significativa de sinergias fue *M. morganii*, con 3 de 9 combinaciones (33.33%). Esta diferencia en proporción también fue significativa en comparación con *K. oxytoca* (2/36, p = 0.008), *E. coli* (3/2, p = 0.005) y *E. cloacae* (0/18, p = 0.003). La Tabla 12 para contiene los detalles sobre las proporciones de combinaciones sinérgicas para cada microorganismo.

**Tabla 12. proporciones de sinergias para cada microorganismo**

FIC	Microorganismos (número de combinaciones)					
	<i>E. cloacae</i> (18)	<i>E. coli</i> (72)	<i>K. oxytoca</i> (36)	<i>K. pneumoniae</i> (135)	<i>M. morganii</i> (9)	<i>P. mirabilis</i> (18)
>0.5	18	69	34	111	6	9
<0.5	0	3	2	24	3	9
<b>porcentaje de sinergia</b>	0.00%	4.10%	5.80%	17.70%	33%	50%

En el análisis por cepas, destaca la cepa EB4816, un *P. mirabilis* con carbapenemasa tipo VIM2, que exhibió el mayor número de sinergias, con 5 de 9 posibles. Estas sinergias se observaron con los

antibióticos CAZ, AN, TGC, DO y ATM. En segundo lugar, la cepa EB4350, una *K. pneumoniae* con Carbapenemasa tipo NDM1, mostró 4 sinergias de 9 posibles, relacionadas con los antibióticos LVX, ATM, MEM y ETP. Además, la cepa EB4400, otra *P. mirabilis* con carbapenemasa VIM2, presentó 4 sinergias de 9, en este caso con los antibióticos CAZ, LVX, DO y MEM. La Tabla 13 contiene una visión más detallada del número de sinergias para cada cepa

**Tabla 13. Proporción de sinergias por enzima**

Número de Cepa	Microrganismo	Carbapenemasa	FIC >0.5	FIC <0.5	Antibióticos con los que se generó sinergia
EB2024	<i>K. oxytoca</i>	KPC	9	0	
EB2572	<i>E. cloacae</i>	NDM	9	0	
EB2637	<i>E. coli</i>	OXA-48	8	1	AN
EB2841	<i>K. oxytoca</i>	OXA-48	9	0	
EB2896	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	7	2	TGC, DO
EB3034	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	7	2	SXT, ATM
EB3081	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	7	2	ATM
EB3349	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	6	3	AN, SXT, MEM
EB3487	<i>E. coli</i>	KPC/NDM	9	0	
EB3789	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	6	3	AN, ATM, ETP
EB3828	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	8	1	SXT
EB3877	<i>E. coli</i>	OXA-48	9	0	
EB4161	<i>K. pneumoniae</i>	VIM	8	1	AN
EB4286	<i>M. morgani</i>	VIM	6	3	CAZ, LVX, MEM
EB4332	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	8	1	SXT
EB4335	<i>E. coli</i>	KPC	9	0	
EB4338	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	7	2	CAZ, LVX
EB4339	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	9	0	
EB4340	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	9	0	
EB4350	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	5	4	LVX, ATM, MEM, ETP
EB4375	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	7	2	CAZ, AN
EB4376	<i>K. pneumoniae</i>	KPC/NDM	9	0	
EB4390	<i>E. cloacae</i>	NDM	9	0	
EB4400	<i>P. mirabilis</i>	VIM	5	4	CAZ, LVX, MEM, DO
EB4407	<i>E. coli</i>	OXA-48	9	0	
EB4409	<i>K. oxytoca</i>	OXA-48	7	2	CAZ, LVX
EB4411	<i>K. oxytoca</i>	KPC	9	0	
EB4412	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	8	1	CAZ
EB4416	<i>E. coli</i>	KPC	9	0	
EB4433	<i>E. coli</i>	OXA-48	8	1	LVX
EB4438	<i>E. coli</i>	KPC	8	1	CAZ
EB4816	<i>P. mirabilis</i>	VIM	4	5	CAZ, AN, TGC, DO, ATM

## Discusión

Este estudio investigó la eficacia de la clorpromazina, tanto en su forma individual como en combinación con antibióticos, para suprimir el crecimiento de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas. La actividad se evaluó utilizando ensayos de microdilución en caldo, siguiendo las pautas del CLSI. En ausencia de antibióticos, la concentración mínima inhibitoria de la clorpromazina (CPZ) se determinó en 16 µg/ml para el CIM50 y 32 µg/ml para el CIM90.

La literatura es escasa en cuanto al efecto de CPZ en *Enterobacterales*, particularmente no se han encontrado otros estudios relacionados con el uso de CPZ en *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas. Sin embargo, se realizó un estudio que investigó cepas de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL1344 en las que se inactivaron genes de bombas de eflujo (*acrB*, *acrD*, *acrF*, *tolC*) o genes reguladores (*marA*, *soxS*, *ramA*). Estas cepas se cultivaron con 48 agentes antimicrobianos y no antimicrobianos, y se observó que los mutantes que carecían de *tolC*, *acrB* y *ramA* mostraron un crecimiento significativamente deficiente, entre estos se encontraba CPZ. Este efecto se debió a la regulación génica, y no a la inhibición de las bombas de eflujo. Además, se demostró que el tratamiento con CPZ provocó un aumento en la expresión de *ramA* y una reducción en la expresión de *acrB* en *Salmonella typhimurium* (39)

En un estudio adicional, se observó que la CPZ a una concentración de 60 µg/ml logró inhibir por completo la replicación de *Escherichia coli* ATCC 25922 (41). Por otro lado, en *Enterobacter aerogenes*, la CPZ pudo inhibir la resistencia al cloranfenicol, revirtiendo la resistencia de estas cepas. Se observó una reducción de 32 veces en la CIM original de cloranfenicol en presencia de CPZ; sin embargo, no se logró este efecto con el ciprofloxacino (44).

Nuestros resultados muestran una CIM inferior a las documentadas por Nehme y sus colegas en cepas de aislamientos clínicos (ref); sin embargo, se observaron similitudes en las cepas de referencia. Es importante destacar que las cepas de aislamientos clínicos mencionadas por Nehme y su equipo presentan un fenotipo de resistencia tipo BLEE, aunque no se informaron los mecanismos genotípicos subyacentes. En contraste, todas nuestras cepas aisladas en entornos clínicos son productoras de carbapenemasas(33). La Tabla 14 muestra nuestros hallazgos y lo reportados por otros grupos.

**Tabla 14. Comparación de hallazgos de CIM de CPZ entre diferentes investigaciones.**

Microrganismos	Concentración mínima inhibitoria de CPZ (µg/ml)			
	Nosotros	Amaral et al	Nehme et al	McCusker et al
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	60	64	-
<i>E. coli</i> aislado clínico	8-16	-	64	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	64	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> DSM16609	-	-	64-128	-
<i>K. pneumoniae</i> aislado clínico	16-32	-	64-128	-
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	-	100
<i>E. cloacae</i> ATCC BAA-2468	128	-	-	-
<i>Enterobacter spp</i> aislado clínico	16-32	-	-	50-100

Nuestro estudio reveló que, en general, el efecto sinérgico de la CPZ se obtuvo en solo el 14.24% de las combinaciones (41 de 288). Esto indica que, en su mayoría, las combinaciones no lograron un efecto sinérgico significativo. Sin embargo, cuando analizamos los subgrupos, observamos resultados interesantes:

- Ceftazidima fue el antibiótico que mostró la mayor proporción de sinergias, alcanzando un 25%. Estos resultados son coherentes con un estudio previo de Aguilar-Vega sobre *Acinetobacter baumannii*, donde también se observó sinergia entre ceftazidima y clorpromazina en ensayos de curvas de tiempo-mortalidad(43).
- Por otro lado, tigeciclina y ertapenem mostraron las proporciones más bajas de sinergias. Esto sugiere que la CPZ no tiene un efecto sinérgico tan marcado con estos antibióticos en particular.
- En el subgrupo de cepas que producen la enzima VIM, observamos la mayor proporción de sinergias.

Este último hallazgo podría explicarse ya que la mayoría de las enzimas VIM se encontraron en cepas de *Proteus mirabilis* y *Morgagnella morganii*. Curiosamente, la familia *Morganellaceae*, a la que pertenecen estas bacterias, también mostró una mayor proporción de sinergias. Además, notamos que la CIM de la clorpromazina en esta familia fue de 128 µg/ml, pero al combinarla con antibióticos, principalmente ceftazidima y levofloxacino, esta CIM disminuyó a 32 µg/ml. Esto nos lleva a especular que la clorpromazina podría estar inhibiendo las bombas de flujo, lo que abre nuevas oportunidades para futuros experimentos con mutantes de estas bombas.

Esta teoría se encuentra respaldada por el trabajo de revisión titulado "¿Poseen las fenotiazinas propiedades antimicrobianas e inhibidoras del eflujo?" realizado por Elizabeth M. Grimsey y Laura J. V. Piddock. En su revisión, estas autoras exploran cómo ciertos compuestos derivados de fenotiazina poseen efectos antimicrobianos. Aunque el mecanismo exacto de acción de las fenotiazinas aún no se comprende completamente, se ha sugerido que interactúan con sistemas de expulsión bacteriana, como AcrAB-TolC, funcionando como inhibidores competitivos (45,46)

Específicamente, la clorpromazina ha demostrado aumentar la acumulación intracelular de compuestos como el bromuro de etidio y varios antibióticos, incluyendo norfloxacino y ciprofloxacino. Se cree que este aumento en la acumulación intracelular podría estar relacionado con la capacidad de las fenotiazinas para alterar la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo una mayor entrada inicial de estos compuestos (44,45)

Es importante señalar que la investigación existente se ha centrado principalmente en antibióticos no betalactámicos, como las quinolonas y el cloranfenicol, y hasta el momento no ha abordado la familia *Morganellaceae* en sus estudios. Estos hallazgos resaltan la necesidad de futuras investigaciones para comprender mejor el potencial terapéutico de las fenotiazinas, especialmente en el contexto de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos.

Este estudio presenta varias fortalezas significativas. En primer lugar, es el primer análisis conocido de las sinergias entre CPZ y antibióticos en *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas. Esta contribución llena un vacío importante en la comprensión de cómo CPZ puede interactuar con estas cepas resistentes.

Además, la inclusión de 10 cepas representativas de cada clase Ambler, junto con 2 cepas co-productoras, proporciona una amplia diversidad de muestras para el análisis. Esta diversidad se confirmó mediante pruebas de PCR y secuenciación de Sanger, lo que aumenta la validez y la aplicabilidad de los resultados. Los hallazgos de este estudio pueden extrapolarse a diversas zonas epidemiológicas, donde la prevalencia de una carbapenemasa particular puede variar, lo que lo convierte en un recurso valioso para la comprensión global de la resistencia a los antibióticos.

La inclusión de cepas de la familia *Morganellaceae*, un grupo poco estudiado en este contexto agrega profundidad a la investigación. Si bien sólo se incluyeron tres cepas de esta familia, esta inclusión representa un punto de partida para futuras investigaciones que podrían explorar más a fondo la actividad de CPZ en este grupo.

Por otro lado, este estudio también presenta algunas limitaciones. La falta de otros análisis de sinergia, como las curvas de tiempo-mortalidad o ensayos en modelos *in vivo*, es una limitación que ofrece oportunidades para investigaciones posteriores. Estos enfoques adicionales podrían proporcionar una comprensión más completa de la eficacia de CPZ en situaciones clínicas más cercanas a la realidad.

## Perspectivas a futuro.

Los resultados presentados demuestran la actividad *in vitro* que presenta la CPZ ante Enterobacterales MRD, con CIM's menores a lo reportado en otros estudios. Si bien su actividad sinérgica fue limitada, consideramos que se deben de buscar otras estrategias que determinen su actividad antimicrobiana.

Primero, consideramos que es necesario buscar otros ensayos de sinergia, como curvas de tiempo-mortalidad. Este tipo de ensayos permitiría evaluar la eficacia de CPZ en un contexto más dinámico, lo que podría proporcionar información valiosa sobre su capacidad para eliminar las bacterias resistentes.

Segundo, un modelo *in vivo* simulando modelos de infección en invertebrados, como *Galería Mellonella*, podría ser beneficioso. Estos modelos proporcionan un entorno más cercano a una infección real y permitirían evaluar el efecto de CPZ en un sistema biológico más complejo.

Por último, realizar ensayos en cepas con mutación en porinas o bombas de eflujo que ayuden a dilucidar la actividad de CPZ. Al explorar cómo las mutaciones específicas pueden influir en la eficacia de CPZ, podríamos obtener información más detallada sobre su mecanismo de acción y su potencial como agente antimicrobiano.

## Conclusión

En el contexto de las *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas, la CPZ mostró una CIM50 de 16 µg/ml y una CIM90 de 32 µg/ml. Sin embargo, cuando exploramos su capacidad para interactuar sinérgicamente con antibióticos, observamos que este efecto sinérgico se presentó en sólo un 14.24% de las combinaciones evaluadas, lo que equivale a 41 de las 288 combinaciones analizadas. Estos resultados subrayan la complejidad de las interacciones entre CPZ y los antibióticos en estas cepas resistentes. Este hallazgo puede considerarse un paso importante en la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas para abordar las infecciones causadas por *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas. Sin embargo, es esencial tener en cuenta que se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos de acción de la CPZ, los mecanismos subyacentes de estas interacciones y su aplicabilidad clínica.

## Agradecimientos

Agradezco sinceramente al Dr. Rafael Franco Cendejas, por su orientación, paciencia y apoyo a lo largo de este viaje académico. Sus conocimientos y guía fueron fundamentales para la realización de esta tesis. También quiero agradecer al Dr. Esaú López Jácome, por sus valiosas contribuciones, ideas, perseverancia y asesoramiento. A ambos, gracias por creer en un servidor.

Además, extendiendo mi gratitud al equipo del Laboratorio de Microbiología del INR, en particular a la MC. Melisa Hernández y la Dra. Claudia Colin, por su colaboración y apoyo incondicional. Su experiencia y recursos fueron esenciales para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Por último, no puedo estar más agradecido por el apoyo inquebrantable de mi familia y amigos a lo largo de mi trayecto académico. Sus palabras de aliento, paciencia y comprensión fueron una fuente constante de inspiración para enfrentar los desafíos de este viaje. A todos ellos, gracias por ser mi red de apoyo. Su cariño y respaldo fueron fundamentales para que pudiera llegar a este momento.

## Bibliografía

1. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). *Br J Biomed Sci.* 2023;80:11387.
2. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019 nov [citado el 8 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
3. Manoukian S, Stewart S, Graves N, Mason H, Robertson C, Kennedy S, et al. Bed-days and costs associated with the inpatient burden of healthcare-associated infection in the UK. *J Hosp Infect.* el 1 de agosto de 2021;114:43–50.
4. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [citado el 20 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
5. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* el 18 de julio de 2023;ciad428.
6. Nielsen TB, Brass EP, Gilbert DN, Bartlett JG, Spellberg B. Sustainable Discovery and Development of Antibiotics — Is a Nonprofit Approach the Future? *N Engl J Med.* el 8 de agosto de 2019;381(6):503–5.
7. Zheng W, Sun W, Simeonov A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *Br J Pharmacol.* enero de 2018;175(2):181–91.
8. Rácz B, Spengler G. Repurposing Antidepressants and Phenothiazine Antipsychotics as Efflux Pump Inhibitors in Cancer and Infectious Diseases. *Antibiot Basel Switz.* el 10 de enero de 2023;12(1):137.
9. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl.* el 12 de febrero de 2022;399(10325):629–55.
10. European Centre for Disease Prevention and Control., World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023: 2021 data. [Internet]. LU: Publications Office; 2023 [citado el 19 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://data.europa.eu/doi/10.2900/63495>
11. Aguilar GR, Swetschinski LR, Weaver ND, Ikuta KS, Mestrovic T, Gray AP, et al. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Reg Health – Am* [Internet]. el 8 de agosto de 2023 [citado el 22 de agosto de 2023];0(0). Disponible en: <https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667193X23001357/fulltext>
12. Alerta Epidemiológica: Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacterales en Latinoamérica y el Caribe - 22 octubre 2021 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado el 22 de agosto de 2023]. Disponible en:

<https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas>

13. Garza-González E, Franco-Cendejas R, Morfín-Otero R, Echaniz-Aviles G, Rojas-Larios F, Bocanegra-Ibarias P, et al. The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico During the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microb Drug Resist*. el 1 de noviembre de 2020;26(11):1372–82.
14. Garza-González E, Camacho-Ortiz A, Ponce-de-Leon A, Ortiz-Brizuela E, López-Jácome LE, Colin C, et al. Bacterial incidence and drug resistance from pathogens recovered from blood, cerebrospinal and pleural fluids in 2019-2020. Results of the Invifar network. *PeerJ*. 2023;11:e14411.
15. López-Jácome LE, Fernández-Rodríguez D, Franco-Cendejas R, Camacho-Ortiz A, Morfin-Otero MDR, Rodríguez-Noriega E, et al. Increment Antimicrobial Resistance During the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar Network. *Microb Drug Resist* Larchmt N. marzo de 2022;28(3):338–45.
16. Nelson GE. 218 - Enterobacteriaceae.
17. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control*. 2017;12:Doc05.
18. Clinical & Laboratory Standards Institute [Internet]. [citado el 6 de septiembre de 2022]. M100Ed32 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
19. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. enero de 2015;13(1):42–51.
20. Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. *Microorganisms*. junio de 2023;11(6):1491.
21. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677–8.
22. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. el 17 de junio de 2020;33(3):e00181-19.
23. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. el 16 de mayo de 1980;289(1036):321–31.
24. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. marzo de 2010;54(3):969–76.
25. Karaikos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. el 1 de febrero de 2019;15(2):133–49.

26. Bonomo RA.  $\beta$ -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. el 3 de enero de 2017;7(1):a025239.
27. Nathan C. Resisting antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*. mayo de 2020;18(5):259–60.
28. Konreddy AK, Rani GU, Lee K, Choi Y. Recent Drug-Repurposing-Driven Advances in the Discovery of Novel Antibiotics. *Curr Med Chem*. 26(28):5363–88.
29. Dubey KK, Indu, Sharma M. Reprogramming of antibiotics to combat antimicrobial resistance. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2020;353(11):2000168.
30. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. el 10 de septiembre de 2009;361(11):1045–57.
31. Lancellotti P, Musumeci L, Jacques N, Servais L, Goffin E, Pirotte B, et al. Antibacterial Activity of Ticagrelor in Conventional Antiplatelet Dosages Against Antibiotic-Resistant Gram-Positive Bacteria. *JAMA Cardiol*. el 1 de junio de 2019;4(6):596–9.
32. Kong R, Kang OH, Seo YS, Mun SH, Zhou T, Shin DW, et al. The inhibition effect of Chlorpromazine against the  $\beta$ -lactam resistance of MRSA. *Asian Pac J Trop Med*. el 1 de junio de 2016;9(6):542–6.
33. Nehme H, Saulnier P, Ramadan AA, Cassisa V, Guillet C, Eveillard M, et al. Antibacterial activity of antipsychotic agents, their association with lipid nanocapsules and its impact on the properties of the nanocarriers and on antibacterial activity. *PLoS ONE*. el 1 de enero de 2018;13(1).
34. Ban TA. Fifty years chlorpromazine: A historical perspective. Vol. 3, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. Neuropsychiatr Dis Treat; 2007. p. 495–500.
35. Boyd-Kimball D, Gonczy K, Lewis B, Mason T, Siliko N, Wolfe J. Classics in Chemical Neuroscience: Chlorpromazine. Vol. 10, *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society; 2019. p. 79–88.
36. Gareri P, Segura-García C, Manfredi VGL, Bruni A, Ciambrone P, Cerminara G, et al. Use of atypical antipsychotics in the elderly: A clinical review. Vol. 9, *Clinical Interventions in Aging*. Dove Medical Press Ltd.; 2014. p. 1363–73.
37. Gareri P, De Fazio P, Stilo M, Ferreri G, De Sarro G. Conventional and atypical antipsychotics in the elderly: A review. Vol. 23, *Clinical Drug Investigation*. Clin Drug Investig; 2003. p. 287–322.
38. Yeung PKF, Hubbard JW, Korchinski ED, Midha KK. Pharmacokinetics of chlorpromazine and key metabolites. *Eur J Clin Pharmacol*. diciembre de 1993;45(6):563–9.
39. Bailey AM, Paulsen IT, Piddock LJV. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 2008;52(10):3604–11.
40. Hewlett EL, Myers GA, Pearson RD. Susceptibility of *Bordetella* species to growth inhibition and killing by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983;23(2):201–6.

41. Amaral L, Lorian V. Effects of chlorpromazine on the cell envelope proteins of *Escherichia coli*. Vol. 35, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991. p. 1923–4.
42. Dastidar SG, Kristiansen JE, Molnar J, Amaral L. Role of phenothiazines and structurally similar compounds of plant origin in the fight against infections by drug resistant bacteria. Vol. 2, *Antibiotics*. MDPI AG; 2013. p. 58–72.
43. Aguilar-Vega L, López-Jácome LE, Franco B, Muñoz-Carranza S, Vargas-Maya N, Franco-Cendejas R, et al. Antibacterial properties of phenothiazine derivatives against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *J Appl Microbiol*. noviembre de 2021;131(5):2235–43.
44. McCusker MP, Alves Ferreira D, Cooney D, Martins Alves B, Fanning S, Pagès JM, et al. Modulation of antimicrobial resistance in clinical isolates of *Enterobacter aerogenes*: A strategy combining antibiotics and chemosensitisers. *J Glob Antimicrob Resist*. marzo de 2019;16:187–98.
45. Grimsey EM, Piddock LJV. Do phenothiazines possess antimicrobial and efflux inhibitory properties? *FEMS Microbiol Rev*. el 1 de noviembre de 2019;43(6):577–90.
46. Grimsey EM, Fais C, Marshall RL, Ricci V, Ciusa ML, Stone JW, et al. Chlorpromazine and Amitriptyline Are Substrates and Inhibitors of the AcrB Multidrug Efflux Pump. *mBio*. el 2 de junio de 2020;11(3):10.1128/mbio.00465-20.