



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
SUPERIORES UNIDAD LEÓN**

**Regulación del sistema de percepción de quórum
de *Pseudomonas aeruginosa* por un extracto y
metabolitos secundarios de *Larrea tridentata*
(la gobernadora).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A :

Christian Jaén Gutiérrez



TUTOR EXTERNO:
Dr. Mariano Martínez Vázquez

TUTOR INTERNO:
Dr. Julio César Amezcua Romero

León, Guanajuato, Mayo 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Instituto de Química en el departamento de Productos Naturales, Laboratorio 1-4 y en la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León de la UNAM en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria del área de Ciencias Agrogenómicas.

Reconocimientos Institucionales:

Quiero reconocer y agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme aceptado en la Licenciatura en Ciencias Agrogenómicas en la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León en la generación 2014-2018.

Al fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP- CONACYT por haberme asignado un apoyo para la elaboración de este proyecto con la referencia PDCPN-2015/402.

Así mismo, quiero agradecer al CONAFE (Consejo Nacional de Fomento Educativo) por haberme brindado una beca por 60 meses como parte de mi formación en la educación comunitaria figurando como Instructor Comunitario ahora LEC (Líder en la Educación Comunitaria).

Y al programa de Becas para la Titulación por Proyectos de la UNAM 2018-2019.

Agradecimientos personales:

Quiero agradecer a mi familia quienes son mi mayor motivación en la vida, y quienes siempre han estado conmigo en los momentos buenos y amargos, ellos siempre estarán ahí brindándome su confianza y apoyo incondicional. A ellos les digo, “gracias”, destacando que el logro es de todos y que somos el motor para que seguir mejorando en cada uno de los aspectos de nuestras vidas.

A mis padres: Irma y Felipe quienes han dado todo de sí para que este logro pudiera cumplirse, a ustedes les digo que nuestros esfuerzos y desvelos no han sido en vano y aunque el camino fue largo, al final he recibido lo mejor que me han podido dar en la vida. Gracias por guiarme y hacerme la persona que soy ahora. Esto es solo el principio y sé que vendrán cosas mejores para nuestras vidas.

A mis hermanos Jacqueline y Erick gracias por estar aquí, por confiar en mí y porque aunque muchas veces hemos reído, peleado, llorado y muchas cosas por las que hemos pasado, siempre seguimos juntos. Saben que los quiero y que siempre estaré agradecido de tenerlos como hermanos.

A mi abijada Frida Sofía, mi cuñada Isabel... gracias por formar parte de esta familia, por el apoyo y por estar aquí en las buenas y en las malas, a mis grandes amigos de toda la vida: Valeria, Samuel, Eduardo, Enrique, Vianey, Ana G, también quiero agradecerle a mis fraternales camaradas de la extinta “liga juvenil del Partido Comunista” Laura, Alejandra, Rosario, Víctor, Carlos.

A los excelentes profesores e investigadores que forman parte de la licenciatura en Ciencias Agrogenómicas, gracias por su enorme profesionalismo y sus admirables enseñanzas, a mis amigos y mis compañeros de generación. Gracias a cada uno de ellos, por tantos momentos inolvidables así como tantas buenas experiencias que compartimos a lo largo de nuestro recorrido universitario, y quiero agradecer especialmente a mi gran amigo de León, Julio, a su mamá Ariadna y su abuela Julieta, gracias por brindarme su cariño, su apoyo y su agradable compañía en todos estos años, los quiero y también los considero parte de mi familia.

También quiero dar gracias a cada uno con los que conviví en el Lab 1-4 del Instituto de Química. Gracias al líder y honorable Dr. Mariano Martínez Vázquez por haberme aceptado en su laboratorio, por ofrecerme un espacio y parte de su recurso económico, siempre guiándome y apoyándome en todo momento, aprendiendo lo mejor de él para ser un excelente profesionista.

A Verónica por ser mi asesora en la parte química de productos naturales, además de ser gran instructora es mi amiga y es una excelente persona, a Freddy, Javier, David, Atzín, Lidia, Carmen, gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme en diversas situaciones y por los buenos momentos en los que nos divertimos, ahora son mis buenos amigos. Especialmente quiero agradecer a Nelly y Víctor, gracias por la enseñanza, la asesoría y el apoyo brindado durante la realización de éste proyecto y por el valioso tiempo que me han dedicado.

Y finalmente quiero agradecerle a cada uno de mis profesores de toda la vida que formaron de mí a un mejor estudiante y una mejor persona, quiero reconocerle por brindarme sus conocimientos, su tiempo y sus consejos, especialmente al Dr. Julio César Amezcua Romero, por apoyarme, asesorarme y confiar en mí en todo este tiempo.

¡Gracias a todos ustedes, son parte de este logro!

Dedicatoria:

Para mi único y gran amor:

*‘Nunca olvides lo mucho que te amo,
a pesar de todo, después de todo y sobre todas las cosas’...*

Este apartado es exclusivo es para aquella persona que le dio sentido a mi vida, en estas líneas viene la parte más significativa de este proyecto, no sólo es una dedicatoria, es también un reconocimiento a la persona que más he amado en esta vida.

Ana Cristina Zermeño Guzmán y yo iniciamos hace más de cuatro años este camino, lo iniciamos con mucha ilusión, con mucha alegría, sabiendo que lo lograríamos juntos. Este camino que hoy termina es la señal para que mañana comience uno nuevo, y aunque la vida nos ha puesto una difícil prueba quiero que sepas que:

¡Amor mío, eres tu quien debe estar parada conmigo recibiendo los aplausos, es a ti quién también deben abrazar, es a ti quien también deben elogiar, es a ti a quién deben felicitar. Tú fuiste la persona que más creyó en mí, tu entrega y amor lo sentí en cada momento; admiro tu esfuerzo, tus enseñanzas, tus lecciones. Tu ayuda y confianza fue el componente principal para que pudiera graduarme, reconozco tu valentía y gallardía en aquellos momentos que estuviste conmigo y admiro tu tenacidad en los momentos más turbulentos. Este proyecto no fue fácil, es parte de nuestros sueños, y estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían. Agradezco que me hayas hecho mejor compañero, y mejor aún, que me hayas hecho de mí un mejor estudiante, y hacer de mí persona un mejor ser humano. Tú esencia, tu presencia y nuestras ilusiones fueron el motor principal para que esto se llevará a cabo, este triunfo también es tuyo, también mereces ser reconocida, porque gracias ti, hoy tenemos una carrera que sirve para formar nuestro futuro. Gracias por haberme dado los mejores años de mi vida, gracias por haberme acompañado todo este tiempo, gracias por haberme amado tanto!

Mi amor por ti es mucho más que amor, es algo que se amasa día a día, es proyectar tu sombra junto a mí, hacer con ellas una sola vida.

(Roque Dalton)

Índice general

ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	15
2.1 Los antimicrobianos, antibióticos y sus mecanismos de acción.....	15
2.1.1 Generación de resistencia.	15
2.2.0 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.2.1 Generalidades	16
2.2.2 Estructura genómica y diversidad genética	19
2.2.3 Patogénesis.....	21
2.2.4 Factores de virulencia.....	22
2.3 Sistema de percepción de quórum	23
2.3.1 Mecanismos del sistema de percepción de quórum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.3.2 Reguladores de la expresión génica del sistema de percepción de quórum y la susceptibilidad a los antibióticos.	28
2.3.3 Inhibidores sintéticos del sistema de percepción de quórum.....	28
2.3.4 Productos naturales como inhibidores del sistema de percepción de quórum.	30
2.4 Las plantas del género <i>Larrea</i>	35
2.4.1 <i>Larrea tridentata</i> , características y distribución.....	32
2.4.2 Composición química	34
2.4.3 Usos y aplicaciones	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	38
3.1 Hipótesis	38
4. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo general.....	38
4.2 Objetivos particulares	38
5.0 MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1 Material vegetal.....	39
5.2 Obtención del extracto de acetato de etilo	39

5.3 Cromatografía en columna abierta.....	39
5.4 Recolección de muestras obtenidas por la cromatografía en columna abierta ..	399
5.5 Identificación de los metabolitos secundarios	40
5.6 Cepas utilizadas.....	40
5.7 Medio y placas Luria-Bertani (LB).....	40
5.8 Medición de curva de crecimiento y condiciones de tratamiento para los ensayos <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
5.9 Determinación de factores de virulencia.....	41
5.10 Genes regulados por el sistema de percepción de quórum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
5.11 Extracción y cuantificación de RNA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
5.12 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).....	44
5.13 Electroforesis en geles de agarosa.....	46
5.14 Análisis de geles de agarosa por densitometría.	47
5.15 Análisis estadístico	47
6.0 RESULTADOS.....	47
6.1 Rendimiento del extracto de acetato de etilo y purificación de fracciones de <i>L. tridentata</i>	49
6.2 Estructura e identificación de los compuestos químicos purificados de <i>L. tridentata</i>	49
6.2.1 Compuesto 1: 5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol.....	50
6.2.2 Compuesto 2: 4 4'-(2,3-dimetilbutano-1,4-diil)dibenzeno-1,2-diol.....	54
6.2.3 Compuesto 3: (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol.....	56
6.2.4 Compuesto 4: 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona. 58	
6.2.5 Compuesto 5: 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona. 60	
6.2.6 Compuesto 6: 3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta 1,4-dien-1-il)furan-2,5-dion	62
6.3 Efecto del EAcOEt y de los metabolitos secundarios obtenidos de <i>L. tridentata</i> sobre <i>P. aeruginosa</i>	64
6.3.1 Efecto sobre el crecimiento de las cepas PA14 y PA64	64

6.3.2. Efecto de los metabolitos secundarios purificados y del extracto bioactivo de EAcOEt <i>L. tridentata</i> sobre la producción de factores de virulencia (elastasa, proteasa alcalina y piocianina) en la cepas PA14 y PA64 de <i>P. aeruginosa</i>	65
6.3.3 Efecto de los metabolitos secundarios y el EAcOEt de <i>L. tridentata</i> sobre la expresión de genes regulados por sistema de percepción de quórum de <i>P.aeruginosa</i>	71
7.0 DISCUSIÓN	81
8.0 CONCLUSIONES.....	889
9.0 REFERENCIAS.....	90
10. ANEXOS	98
10.1 Cálculo de concentraciones	98
10.2 Crecimiento bacteriano de las cepas PA14 y PA64.....	101
10.3 Cuantificación de elastasa	104
10.4 Cuantificación de proteasa alcalina	105
10.5 Cuantificación de piocianina	105
10.6 Gráficas de prueba Dunnet.....	107
10.7 Densitometría de imagen	107
10.8 Efecto de los metabolitos secundarios y el EAcOEt sobre la expresión de los genes analizados en comparación a las cepas PA14 y PA64 sin tratamiento de <i>P. aeruginosa</i>	107

Índice de figuras

Figura 1. Genoma circular de <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 2. Regulación en la expresión de genes del sistema de percepción de quórum en bacterias gram negativas	24
Figura 3. Sistema de percepción de quórum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figura 4. Esquema jerárquico de las cuatro redes de señalización controlados por el sistema de percepción de quórum en <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 5. Distribución geográfica de <i>Larrea tridentata</i> y <i>Larrea divaricata</i> en Norteamérica y Sudamérica.....	33
Figura 6. Arbusto de <i>Larrea tridentata</i>	34
Figura 7. <i>Larrea tridentata</i>	34
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz en CDCl ₃) para la molécula (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5, 6, 7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1)	51
Figura 9. Ampliación de la región aromática para el compuesto (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5, 6, 7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1).....	52
Figura 10. Ampliación de la región a campo alto para el compuesto (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5, 6, 7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1)	53
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz en CDCl ₃) para la molécula 4 4'-(2,3-dimetilbutano-1,4-diil) dibenzo-1,2-diol (compuesto 2).....	55
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz en CDCl ₃) para la molécula (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5, 6, 7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 3)	57
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz en DMSO- <i>d</i> ₆) para la molécula 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 4)	59
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz en DMSO- <i>d</i> ₆) de la molécula 5, 7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 5).....	61
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz en DMSO- <i>d</i> ₆) de la molécula 3-hidroxi-4-((1E, 4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il) furan-2,5-diona (Compuesto 6)	63
Figura 16. Efecto de C-30 sobre el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
Figura 16.1 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto de AcOEt de <i>L. tridentata</i>	65

Figura 17. Producción de elastasa por <i>P. aeruginosa</i> en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto bioactivo de <i>L. tridentata</i>	66
Figura 18. Producción de proteasa por <i>P. aeruginosa</i> en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto bioactivo de <i>L. tridentata</i>	67
Figura 19. Producción de piocianina por <i>P. aeruginosa</i> en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto bioactivo de <i>L. tridentata</i>	69
Figura 20. Integridad de los RNAs extraídos de las cepas PA14 y PA64 de <i>P. aeruginosa</i> tratadas con metabolitos y un extracto bioactivo de <i>L. tridentata</i>	71
Figura 21. Expresión del gen <i>16s rRNA</i>	72
Figura 22. Expresión del gen <i>lasI</i>	73
Figura 23. Expresión del gen <i>lasR</i>	74
Figura 24. Expresión del gen <i>rhlI</i>	75
Figura 25. Expresión del gen <i>rhlR</i>	76
Figura 26. Expresión del gen <i>lasB</i>	77
Figura 27. Expresión del gen <i>phz</i>	78
Figura 28. Expresión del gen <i>toxA</i>	79
Figura 29. Efecto de los tratamientos y el EAcOEt de <i>L. tridentata</i> sobre la expresión génica de las cepas PA14 y PA64 de <i>P. aeruginosa</i>	80

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> regulados por el sistema de percepción de quórum y sus efectos en el humano	23
Tabla 2. Principales metabolitos y compuestos orgánicos de <i>Larrea tridentata</i>	35
Tabla 3. Genes regulados por el sistema de percepción de quórum en <i>P. aeruginosa</i>	42
Tabla 4. Cuantificación de RNA	44
Tabla 5. Condiciones de amplificación para PCR.....	46
Tabla 6. Cromatografía del extracto de Acetato de etilo de <i>Larrea tridentata</i>	48
Tabla 7. Cromatografía del extracto de Acetato de etilo de <i>Larrea tridentata</i>	49
Tabla 8. Efecto de los compuestos purificados y el EAcOEt obtenidos de <i>L. tridentata</i> sobre el crecimiento y la producción de factores de virulencia en las cepas PA14 y PA64 de <i>P. aeruginosa</i>	70
Tabla 8.1 Crecimiento bacteriano bajo C-30.....	102
Tabla 8.2 Crecimiento bacteriano	102
Tabla 8.3 Cuantificación de elastasa	104
Tabla 8.4 Cuantificación de proteasa	105
Tabla 8.5 Cuantificación de piocianina.	106
Tabla 9. Valores de densitometría de imagen para cada gen (<i>lasI, lasR, rhII, rhIR, lasB, phz</i> y <i>toxA</i>) en ambas cepas (PA14 y PA64) de <i>P. aeruginosa</i> bajo tratamiento de metabolitos secundarios y un EAcOEt de <i>Larrea tridentata</i>	109
Tabla 10. Actividad de los compuestos y el EAcOEt sobre la expresión de cada gen controlado por el sistema de percepción de quórum de <i>P. aeruginosa</i>	113
Tabla 11. Metabolitos secundarios y el EAcOEt que tuvieron mayor efecto (mayor disminución) sobre la expresión de genes controlados por el sistema de percepción de quórum de <i>P. aeruginosa</i>	114

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Abs	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
HCl	Ácido clorhídrico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
NDGA	Ácido Nordihidroguayarético
RNA	Ácido Ribonucleico
DART	Análisis Directo en Tiempo Real
≈	Aproximadamente
BRRB	Azul brillante de remazol
C°	Celsius
cm	Centímetro
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Cp	Citado por
CDCl₃	Cloroformo deuterado
MgCl₂	Cloruro de magnesio
CCa	Columna cromatográfica abierta.
CCFa	Cromatografía en capa fina analítica.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
D.O	Densidad Óptica
DEPC	Dietil pirocarbonato
MOPS	Disolución tampón formada por ácido propanesulfónico
TAE	Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA
cDNA	DNA complementario
EAcOEt	Extracto de acetato de etilo
C-30	Furanona (Z)-4-Bromo-5-(bromometileno)-2(5H)
g	Gramo
g	Gravedad
Hex	Hexano
h	Horas
IQS	<i>Inhibition quorum sensing</i>
kg	Kilogramo
LB	Medio Luria Bertani
mhz	Megahertz
MeOH	Metanol
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
ng	Nanógramos

nm	Nanómetros
O.N	<i>Over Night</i>
pb	Pares de bases
ppm	Partes por millón
PM	Peso molecular
¹H	Protón
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
m/z	Relación masa carga
RNM	Resonancia Nuclear Magnética
rpm	Revolución por minuto
s	Segundo
V	Voltios

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria con gran resistencia farmacológica, la cual produce infecciones crónicas en el humano debido a la producción de moléculas extracelulares tales como toxinas, sideróforos, biopelícula y factores de virulencia. La expresión de estas moléculas está regulada por el sistema de percepción de quórum mediado por la densidad poblacional que coordinan la expresión de genes que codifican para moléculas asociadas a su patogenicidad como lo son factores de virulencia tales como la elastasa, proteasa alcalina y piocianina. En *P. aeruginosa* el sistema de percepción de quórum está interconectado por cuatro sistemas, LasR-LasI, RhlR-RhlI, PqsR- PqsABCDH e IqsR-AmbBCDE que son sistemas reguladores que al interactuar con su enzima sintasa y/u operón correspondiente producen la activación de sus señales afines, conocidas como autoinductores. Con base en esto, se planteó la reducción de los niveles de expresión génica del sistema de percepción de quórum mediante la interrupción de los sistemas de comunicación celular como una alternativa para contrarrestar las infecciones bacterianas sin generar resistencia como lo hacen los antibióticos. Para ello, en el presente trabajo se utilizó un extracto de acetato de etilo y metabolitos secundarios purificados obtenidos de la planta *Larrea tridentata* (la gobernadora) mediante ensayos *in vitro* y validado por ensayos de PCR, para lo cual se desarrolló un modelo basado en medios de cultivo líquido donde se inocularon las cepas de bacterias de aislados clínicos de *P. aeruginosa* (PA14 y PA64) bajo tratamiento por los metabolitos secundario y el extracto a diferentes concentraciones 1, 10, 100 μM y 100 mg/mL, respectivamente. Los resultados indicaron que los compuestos puros presentan una base fenólica tales como lignanos, moléculas antioxidantes y algunas flavonas las cuales fueron validadas por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los ensayos *in vitro* señalan que el extracto de acetato de etilo y los compuestos purificados no tuvieron actividad bactericida, y disminuyeron estadísticamente significativa la producción de piocianina. Mientras que los resultados de PCR indican que existe una afinidad hacia la disminución en la expresión de genes reguladores del sistema de percepción de quórum, así como de factores de virulencia, siendo los genes *phz*, *rhlR* y *toxA* los que mayor reducción significativa presentan en los niveles de expresión génica. En este estudio también se presentaron datos que muestran que el compuesto 3 y el EAcOEt son las sustancias que más redujeron la expresión de los genes regulados por el sistema de percepción de quórum (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *lasB*, *phz*, *toxA*) en relación a la cepa sin tratamiento de las cepas PA14 y PA64. Nuestro estudio también hace referencia a los comportamientos de que algunas cepas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* utilizan otros reguladores transcripcionales adicionales a *lasR* que logra transmitir la cascada de señalización del sistema de percepción de quórum.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Los antimicrobianos, antibióticos y sus mecanismos de acción.

Los antimicrobianos son aquellos productos o sustancias de origen sintético que tienen la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos. Estos se clasifican de acuerdo a su función, por lo que pueden ser esterilizantes, desinfectantes, antisépticos o quimioterápicos (1). Además, algunos antimicrobianos tienen efecto sobre algún organismo en específico, entre los que se puede distinguir a los antibióticos, antifúngicos, antiparasitario y antivirales.

Con base a lo anterior, los antibióticos se definen como moléculas producidas por un organismo vivo o derivado sintético que tienen la capacidad de destruir a los microorganismos o de inhibir su crecimiento mediante la provocación de daño físico, la inhibición del metabolismo o la alteración de sus estructuras macromoleculares. Varios antibióticos coinciden en su modo de acción contra diversos microbios, sin embargo, su efectividad dependerá del organismo blanco, es decir, si es una bacteria gram positiva o gram negativa, ya que el mecanismo de acción está condicionado por la fisiología de la bacteria y de sus componentes químicos. Para ejercer su acción, los antibióticos deben tener la capacidad de llegar a la pared celular bacteriana o a la membrana plasmática y/o atravesarlas para llegar a sus estructuras blanco. Todos los antibióticos poseen un mecanismo de acción primario, sin embargo, algunos actúan de manera secundaria dirigiéndose a otros componentes o estructuras de la fisiología del microorganismo (2).

Los principales mecanismos de acción de los antibióticos son:

1. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.
2. Alteración de la membrana celular.
3. Inhibición de la síntesis proteica de las subunidades 30s y 50s.
4. Alteración de la síntesis de ácidos nucleicos.
5. Alteración en el metabolismo del ácido fólico.

2.1.1 Generación de resistencia.

El uso inadecuado de los antibióticos, es decir, exhaustivo y en casos donde no se requieren, tienen como consecuencia la formación de cepas bacterianas resistentes a estos fármacos, lo cual, se convierte en una amenaza para la salud pública mundial ya que aumenta la probabilidad de muerte por infecciones bacterianas (3). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas para el tratamiento de dichas infecciones.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), también conocida como World Health Organization (WHO) por sus siglas en inglés, publicó en febrero de 2017 el primer listado de patógenos con alta prioridad que son resistentes a antibióticos.

Se destacaron 12 familias de bacterias cuyo impacto se observa en la salud humana. La elaboración de dicho listado tiene como objetivos promover la investigación y desarrollar nuevas técnicas o en su defecto, nuevos antibióticos para hacer frente al problema mundial de la resistencia a los antibióticos, especialmente para aquellos patógenos que tienen la capacidad evolutiva de generar nuevos mecanismos de resistencia que permite transferir su material genético a células adyacentes para hacerlas también farmacorresistentes (4, 5).

La OMS clasifica a los patógenos en tres grupos con base en la urgencia para desarrollar nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta y media. En el grupo de “prioridad crítica” se encuentran las bacterias farmacorresistentes con alta patogenicidad que se encuentran en hospitales, asilos de ancianos y en pacientes cuyo tratamiento incluyen dispositivos clínicos que pueden ser un foco de infección. Entre dichas bacterias se encuentran *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*, las cuales se asocian con infecciones letales que provocan un cuadro clínico más severo que con lleva a la muerte (6).

Gobernado y Acuña (7) reportaron que algunas bacterias han adquirido una alta resistencia a ciertos antibióticos de origen carbapenémicos y a las cefalosporinas de tercera generación, lo que ha generado una gran preocupación debido a que estos son los antibióticos más eficaces y utilizados actualmente para tratar las enfermedades ocasionadas por bacterias multirresistentes.

Con base en los últimos informes epidemiológicos del 2015 y 2017(8), gran parte del continente americano y en particular la región Latinoamericana desarrolla una alta tasa de incidencia y reincidencia de brotes nosocomiales ocasionadas por bacterias que han desarrollado una alta resistencia a los antibióticos (9). Por tanto, el estudio de los mecanismos de resistencia cruzada para antisépticos y antibióticos es de suma importancia para tener un conocimiento más amplio y actualizado que permita el desarrollo de tratamientos alternativos que ayuden a disminuir dichos brotes nosocomiales.

2.2.0 *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 Generalidades

P. aeruginosa es una bacteria patógena oportunista que causa infecciones principalmente en pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos (10). Varias cepas de *P. aeruginosa* que son altamente resistentes a diversos antibióticos usados para su tratamiento, son reconocidas como cepas MDR, cuando presentan resistencia a 3 o más clases de antibiótico y como cepas XDR, cuando presentan resistencia extensa a casi todos los antibióticos (con una o dos excepciones).

Sin embargo, para la Organización Mundial de la Salud (OMS) el motivo de preocupación más importante es la posible generación de panresistencia o PDR que es la resistencia a todos los antibióticos disponibles (11). Estas características comprometen enormemente el diseño y la selección de tratamientos efectivos, y por tanto se asocia con una elevada tasa de morbimortalidad. El éxito de la prevalencia de las cepas MDR/XDR es resultado de la conjunción de la extraordinaria capacidad que tiene *P. aeruginosa* para desarrollar mecanismos de resistencia frente a casi todos los antibióticos disponibles mediante la presión selectiva que ejercen estos, la selección de mutaciones cromosómicas y la capacidad que tiene para integrar elementos móviles transferibles como plásmidos, transposones, integrones, fagos, etc. (12).

P. aeruginosa es una bacteria resistente a los carbapenémicos, antibióticos betalactámicos de amplio espectro con actividad hidrolítica de carbapenemasas y lactamasas de espectro extendido (BLEE) cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de pared. Las altas concentraciones del antibiótico en el periplasma se puede deber al déficit en la expresión de porinas tales como OprD, las cuales se encuentran en la membrana externa y actúan como un mecanismo primario de resistencia a carbapenémicos o la sobreexpresión de los sistemas de eflujo de tipo MexAB- OprM y MexXY- OprM que habitualmente se encuentran expresados en los aislados clínicos de pacientes infectados con *P. aeruginosa*, mientras que los tipo MexCD- OprJ y MexEF-OprN generalmente se encuentran reprimidos (12). La resistencia adquirida de *P. aeruginosa* a este tipo de antibióticos es resultado de la presencia y coexistencia de distintos mecanismos entre los que se incluyen la sobreexpresión de genes que regulan la síntesis de bombas de eflujo que es una habilidad que tienen las bacterias para eliminar varios tipos o familias de antibióticos, la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares, la inactivación enzimática por medio de hidrólisis y la disminución de la concentración del antimicrobiano en el sitio blanco (11). Asimismo la inactivación enzimática está regulada por la sobreexpresión de enzimas del tipo AmpC o por la sobre producción de carbapenemasas, las cuales pueden ser de dos tipos: serinoenzimas o metalobetalamasas (MBL).

La resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* se debe a la capacidad que tiene este patógeno de expulsar dichas moléculas a través de las bombas de eflujo de multidrogas mencionadas en el párrafo anterior. En el genoma de *P. aeruginosa* se han encontrado al menos 10 operones distintos del sistema de bombas de eflujo mencionado, las cuales se pueden expresar constitutivamente a bajos niveles o pueden sobreexpresarse cuando se presentan mutaciones en los genes represores que controlan a estos operones (13). Aunado a lo anterior, la presión selectiva que ejercen los antibióticos con la sobreexpresión de las bombas de eflujo, puede representar un serio problema, particularmente con las fluoroquinolonas que son sustratos de las 4 bombas de eflujo mencionadas anteriormente.

Investigaciones previas, han demostrado que *P. aeruginosa* contiene una beta lactamasa AmpC (o clase C) integrada en su cromosoma y que la expresión de esta enzima se puede inducir por la exposición a beta lactámicos (14, 15). La inducción de la beta lactamasa AmpC puede provocar resistencia tanto al agente inductor como a otros beta lactámicos, sin embargo, no todos los beta lactámicos tienen la capacidad de ser buenos inductores de la beta lactamasa AmpC, como es el caso de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación que actúan como inductores débiles (14). Estos mecanismos de resistencia son los que persisten en las cepas epidémicas MDR/XDR ampliamente diseminadas a nivel internacional y denominadas como clonas de alto riesgo (*high-risk clones*) (16).

P. aeruginosa se encuentra ampliamente distribuido en condiciones ambientales muy diversas. Se han encontrado cepas de *P. aeruginosa* en hábitats muy poco adecuados para su supervivencia, como suelos contaminados por metales pesados, aguas residuales, y hasta en plantas y animales. Estos estudios sugieren que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* son potencialmente nocivas debido a su patogenicidad y a su alta capacidad de infectar organismos diversos como la planta *Arabidopsis thaliana* (17) y el invertebrado *Caenorhabditis elegans* (18).

Así mismo *P. aeruginosa* es también un patógeno que ocasiona daños severos en la industria alimentaria y por consiguiente, representa un problema grave para la vida cotidiana del hombre. Este patógeno tiene mecanismos que le permiten filtrarse a través de las superficies y descomponer los alimentos en refrigeración como consecuencia de su metabolismo basal y de la producción de enzimas hidrolíticas. Aunado a lo anterior, se ha reportado algunas cepas resistentes a detergentes y artículos de limpieza (19, 20).

Estas bacterias también suelen presentarse en ambientes acuosos formando agregados en forma de biopelícula (*biofilm*) los cuales, al mezclarse con otros materiales extracelulares, se convierten en un peligro cuando se emplean materiales quirúrgicos como catéteres, filtros o dispositivos intrauterinos utilizados en clínicas u hospitales, creando un foco de infección por este patógeno (21, 22). A partir de esto *P. aeruginosa* es un modelo de investigación muy interesante debido a que cuenta con múltiples sistemas moleculares que le permiten regular la transcripción de genes involucrados en su respuesta a cambios ambientales. Los circuitos regulatorios LuxR – LuxI están involucrados en el sistema de percepción de quórum y forman parte de los mecanismos de comunicación bacterias en gram negativas.

Existen genes en el genoma de esta bacteria cuyos transcritos actúan como una cascada de señalización que integran al sistema de percepción de quórum, entre los que se destacan los sistemas lasR y lasI, rhIR y rhII, indispensables en la comunicación de *P. aeruginosa* (23, 24) y cuyos genes no responden directamente a las condiciones ambientales sino a la densidad celular, la cual promueve cambios en la expresión génica de una población bacteriana.

2.2.2 Estructura genómica y diversidad genética

En el año 2000 se concluyó la secuencia completa del genoma de la cepa *PAO1* de *P. aeruginosa* aislada de un paciente que presentaba un cuadro clínico de otitis media (25). En dicho estudio se describió el cromosoma circular de la bacteria cuyo tamaño es de 6.3 millones de pares de bases con un contenido de G+C que representa el 65-67% del genoma, y además se reportó la ausencia de plásmidos. No obstante, estudios posteriores mostraron que *Pseudomonas aeruginosa* presenta un número variable de plásmidos y una gran variedad de elementos móviles (26). Más del 50% de los genes de *PAO1* presentan una homología cercana en su secuencia con genes de bacterias presentes en el medio ambiente. Un gran porcentaje de genes homólogos codifica para enzimas con actividades diferentes mientras que otros más codifican para proteínas involucradas en la exocitosis celular (26, Figura 1).

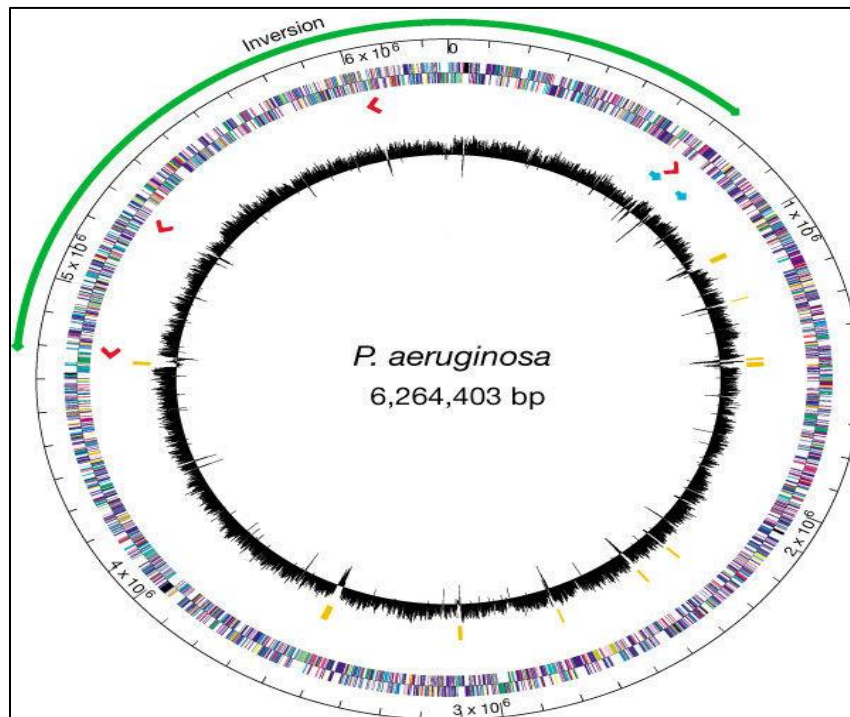


Figura 1. Genoma circular de *P. aeruginosa*. La distribución de los genes se representa mediante cuadros de colores de acuerdo con la categoría funcional y la dirección de la transcripción (la banda externa es la cadena positiva, la banda interna es la cadena negativa). Las flechas rojas indican las ubicaciones y la dirección de la transcripción de los genes ribosomales. La flecha verde indica la región invertida que resultó de un evento de recombinación homóloga entre *rrnA* y *rrnB*. Las flechas azules indican la ubicación de dos regiones que probablemente contienen bacteriófagos. El gráfico negro en el centro muestra el contenido en porcentaje de G + C representado como el promedio para ventanas de 1 kb que no se solapan y que abarca una cadena para todo el genoma. Las barras amarillas indican regiones de 3.0 kb mayores con contenido de G + C.

Fuente: Stover et. al. (2000) (28).

Posteriormente se secuenció el genoma de una cepa de *P. aeruginosa* exoU-positiva aislada de un paciente infectado, la cual se denominó PA14 con código de identificación NC_008463, (29). De manera característica, la cepa PA14 presenta un mayor grado de virulencia en comparación con la cepa PAO1. Dicho estudio sugirió la presencia de 54 regiones PAO1 con al menos un marco de lectura abierto (ORF) que no forma parte del genoma de PA14, así como la presencia de 58 regiones de PA14 ausentes en PAO1 incluyendo a las islas de patogenicidad PA14, PAPI-1 y PAPI-2 (30).

El análisis del genoma de *P. aeruginosa* indica la existencia de más de 500 genes reguladores (28) además de una gran cantidad de genes que están involucradas en procesos catabólicos, sin embargo, la mayoría de los genes de esta bacteria codifican para 159 proteínas transportadoras que pudieran estar relacionadas con su alta capacidad de resistencia a compuestos tóxicos, incluyendo a los fármacos con actividad antibiótica lo que conlleva a que la estructura y conformación de su genoma le confiere una alta versatilidad de adaptación a diversos ambientes.

En las diversas cepas de *P. aeruginosa* que se han anotado, se ha observado que el tamaño del genoma varía entre 5.5 y 7 Mbp (28, 30). Las variaciones en el tamaño del genoma podrían deberse a un genoma accesorio, es decir, a elementos extracromosómicos móviles tales como plásmidos, islas de patogenicidad, transposones o bloques de DNA que se han insertado en el cromosoma en varios loci, los cuales se pueden presentar dentro de subgrupos de una población o bien en una única cepa. La composición individual del genoma accesorio es precisamente lo que confiere la diversidad del tamaño del genoma en poblaciones intra e interclonales de *P. aeruginosa* cuyos elementos del genoma accesorio se han adquirido mediante mutaciones, recombinaciones o transferencia horizontal de genes; (HTG, del inglés Horizontal Transfer of Genes) entre la misma especie o género o bien entre diferentes especies (31).

Una de las características más importantes de *P. aeruginosa* es la ausencia de clonas correlacionadas con el desarrollo de una enfermedad. La frecuencia de distintas clonas no varía entre las cepas obtenidas del ambientes y en aislados clínicos (32, 33). No obstante, existe una variabilidad genética entre los aislados de esta bacteria aunque pertenezcan a la misma región. Esta variabilidad es muy significativa en el tamaño del genoma ya que comprende un mosaico de genes específicos que va en función a la cantidad de material del genoma accesorio que contenga cada cepa. La comparación de las secuencias de los genes que comparten refleja un alto índice de conservación entre los distintos aislados con excepción del gen *pil A* que codifica para la fimbria de tipo IV el cual deriva en un gran polimorfismo (34). La variabilidad genética que existe entre diferentes cepas de *P. aeruginosa* es alta en comparación a otras bacterias como *E. coli*, lo que sugiere que la tasa de recombinación entre poblaciones es elevada (35).

Sin embargo, las cepas de *P. aeruginosa* mantiene gran parte de su genoma conservado a pesar de las recombinaciones que existen, indicando que esta bacteria mantiene en su genoma los genes que le ayudan a colonizar nichos diferentes y a sobrevivir en diferentes ambientes.

2.2.3 Patogénesis

P. aeruginosa es una bacteria que produce una amplia variedad de factores de virulencia, lo que conlleva a que este microorganismo presente una patogénesis multifactorial. Esta bacteria no representa una amenaza para personas saludables, ya que la probabilidad de que colonice tejidos humanos sanos es muy baja, de menos del 3%(36). No obstante, la mayor tasa de infecciones por *P. aeruginosa* en humanos ocurre en ambientes hospitalarios, en donde se ha demostrado que la susceptibilidad que tienen los adultos con bronquiectasias y por consiguiente una mayor producción de esputo, esta correlacionada con el deterioro de la función pulmonar.

En pacientes que presentan la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), caracterizada por una intensa inflamación de las vías aéreas, se ha observado que *P. aeruginosa* ocasiona patrones de infección y de evolución similares a los registrados en pacientes que padecen fibrosis quística (FQ), que es una enfermedad hereditaria que lleva al cuerpo a producir secreciones mucosas que se acumulan en las vías respiratorias de los pulmones y el tubo digestivo (37). Los sujetos hospitalizados que presentan neumonía ocasionada por esta bacteria y que además son ventilados mecánicamente, registran una alta tasa de mortalidad que oscila entre un 50 y 70%, atribuida al perfil de los pacientes, así como a los factores de virulencia de la bacteria que presenta una tasa de colonización del tejido de hasta 54 % (38, 39).

En pacientes adultos hospitalizados que presentan fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa* se adhiere a las células epiteliales y puede presentar infecciones en más del 90% de los tejidos, elevando la tasa de mortalidad y deterioro pulmonar (40). No obstante, este patógeno puede sobrevivir y persistir por varios años en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ con una frecuencia de incidencia muy alta y con una tendencia a ser hipermutable, dejando entrever una posible relación entre este fenotipo y la evolución de resistencia a los antibióticos. Con base a lo anterior, se han descrito infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes con quemaduras, en los cuales el tejido lesionado propicia un ambiente húmedo e ideal para la colonización por dicha bacteria (41).

Así mismo, las infecciones del tracto urinario por *P. aeruginosa* presentan un alto índice de mortalidad, debido al proceso de cateterización mecánica que propicia un vehículo de infección para la colonización bacteriana de la orina dentro del lumen del catéter y por consiguiente del espacio que hay entre la uretra y la superficie del catéter (42).

Las infecciones oculares producidas por *P. aeruginosa* tales como la queratitis severa, puede provocar perforación y derretimiento corneal por el uso de lentes de contacto mientras que la escleritis, y la endoftalmitis pueden provocar la ceguera total en casos muy severos. En pacientes con diabetes mellitus, la otitis maligna crónica es una infección severa ocasionada principalmente por *P. aeruginosa* (43). En pacientes con cáncer cuyo sistema inmune se encuentra comprometido, este microorganismo coloniza e infecta los tejidos fácilmente, provocando una alta tasa de mortalidad que varía entre el 17 y 50 % (44).

2.2.4 Factores de virulencia

P. aeruginosa es una bacteria oportunista, por lo cual, tiende a presentar una alta tasa de éxito como enfermedad infecciosa. Esta capacidad se encuentra asociada a la amplia variedad de factores de virulencia que produce, como son algunas proteínas y sustancias que le permiten entrar al hospedero para invadir el tejidos y provocar la enfermedad; así como de algunos exoproductos y exoenzimas que son letales para el hospedero, tales como la exotoxina A, fosfolipasas, sideróforos, biopelículas y gran cantidad de proteasas de tipo alcalinas o tipo IV cuyos sustratos son la elastina, el colágeno, y las inmunoglobinas que forman parte de los tejidos humanos (45). *P. aeruginosa* tiene, además, estructuras propias como los flagelos, los pillis y los lipopolisacáridos (Lps) que le permiten anclarse en la superficie de los tejidos infectados y colonizarlos. De manera particular, el alginato, polímero de tipo polisacárido producido por un sub grupo de cepas, facilita la adhesión de este patógeno a la superficie epitelial de los pulmones en donde se convierte en una barrera para los fagocitos y antibióticos que además puede inhibir a los anticuerpos, lo cual retarda la respuesta de defensas del hospedero. El sistema de secreción tipo III de la bacteria es el encargado de secretar a las toxinas *exoA*, *exoS*, *exoT*, *exoU* y *exoY*, las cuales tienen una alta actividad virulenta (46). La toxina *exoA*, particularmente, se encarga de dañar el epitelio alveolar y destruye las células endoteliales pulmonares, bloquea o inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta inmunológica del hospedero a la infección.

La expresión de los genes de virulencia se encuentra regulada en función a la densidad celular, debida probablemente a la necesidad de una gran cantidad de material celular capaz de sintetizar a una gran cantidad de factores de virulencia para poder ejecutar una actividad virulenta sobre los tejidos infectados del hospedero que contrarreste o suprima la respuesta inmune del mismo.

Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* tienen diversos efectos sobre los humanos (Tabla 1), entre los que se encuentran la degradación de proteínas estructurales, parálisis de cilios, estrés oxidativo y la muerte celular.

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> regulados por el sistema de percepción de quórum y sus efectos en el humano.				
Gen	Proteína o factor de virulencia	Efecto en el humano durante la infección.	Beneficios para <i>P. aeruginosa</i>	fuelle
<i>lasB</i>	Elastasa	Degradación de elastina, colágeno y otras proteínas estructurales.	Adquisición de hierro extracelular derivados de las proteínas.	(47, 48)
<i>lasA</i>	Proteasa	Ruptura de barreras epiteliales	Evasión del sistema inmune para facilitar la colonización.	(49)
<i>toxA</i>	Exotoxina A	Muerte celular	Establece la infección.	(50)
<i>aprA</i>	Proteasa alcalina	Degradación de proteínas complementarias y citosinas.	Evasión del sistema inmune y persistencia en la colonización.	(51)
<i>rhlAB</i>	Ramnolípidos	Necrosis del huésped, destrucción de macrófagos y linfocitos polimorfonucleares.	Evasión del sistema inmune y desarrollo de biopelícula.	(52, 53)
<i>lecA</i>	Lectina (lectina galactofílica)	Parálisis de los cilios de las vías respiratorias.	Evasión del sistema inmune, establecimiento de colonización e infección.	(54)
<i>Phz ABCDEFG, phzM</i>	Piociantina	Causa estrés oxidativo; Parálisis de los cilios de las vías respiratorias; Destrucción de neutrófilos	Evasión del sistema inmune, establecimiento de colonización e infección.	(55, 56)

2.3 Sistema de percepción de quórum

La comunicación celular entre bacterias gram positivas ocurre por medio de péptidos o enlaces peptídicos mientras que en las bacterias gram negativas esta comunicación esta mediada por el sistema de percepción de quórum, que está formado principalmente por genes reguladores transcripcionales, genes que codifican enzimas sintasa y/u operón correspondiente a cada gen regulador que produce moléculas aciladas llamadas autoinductores. Estas moléculas interactúan a nivel molecular con sus respectivos receptores o genes reguladores transcripcionales, en donde los autoinductores fungen como un sistema que monitorea el ambiente externo para determinar la densidad celular, razón por la cual se le conoce como sistema de percepción de quórum (57).

El concepto de percepción de quórum en bacterias gram negativas, y particularmente en *P. aeruginosa*, hace alusión a los circuitos luxI- luxR caracterizados por primera vez en *Vibrio fischeri*. En el estudio se determinó que luxI codifica para una N-butanoil homoserina lactona (BHL), mientras que luxR codifica para N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) (57, 58).

El proceso de percepción de quórum inicia cuando la bacteria produce y libera un autoinductor difusible en respuesta a un aumento de la densidad celular en el ambiente. La cantidad de autoinductores producidos por la actividad de los complejos que los sintetizan (enzimas sintasa y/u operón) son proporcionales al aumento de la densidad celular. Los autoinductores actúan mediante su interacción con factores de transcripción del complejo regulador a través de la cual promueven la expresión de genes que regulan una gran variedad de respuestas fisiológicas tales como la producción de factores de virulencia, pigmentos, biopelículas, sideróforos, isoformas, etc. (59, Figura 2).

Los autoinductores de tipo acil-homoserina lactona (especialmente, el N-butanoil homoserina lactona) es el más estudiado, ya que describe un mecanismo completo que inicia con la generación de una señal basal inicial, seguido de una acumulación y transmisión de la misma teniendo como objetivo la activación de genes blanco, estas moléculas utilizan como sustrato las cadenas acilo producto de la síntesis de ácidos grasos por la transferencia de grupos metilo de la enzima S-adenosilmetionina (SAM) (59).

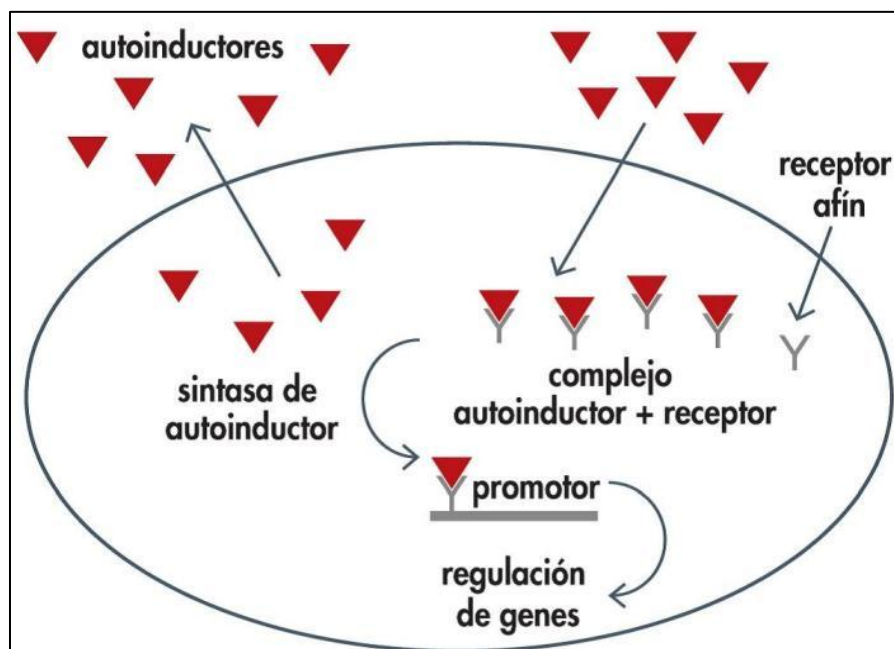


Figura 2. Regulación en la expresión de genes del sistema de percepción de quórum en bacterias gram negativas. La regulación del sistema de percepción de quórum inicia con la secreción de moléculas autoinducidas como N-Acil-homoserina-lactona (AHL) que son reconocidas por un complejo autoinductor y receptor que se une al promotor para transcribir y regular la expresión génica.

Fuente: Delacon. 2016

2.3.1 Mecanismos del sistema de percepción de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es una bacteria con gran resistencia farmacológica, la cual produce infecciones crónicas en el humano debido a su alta patogenicidad en el hospedero. La expresión de los factores de virulencia está regulada por el sistema de percepción de quórum, el cual coordina la expresión de genes a nivel poblacional y regula la expresión de los fenotipos y de otras moléculas como biopelícula y sideróforos, indispensables para la colonización del hospedero (60).

P. aeruginosa es la única bacteria gram negativa que contiene más de un sistema de percepción de quórum. En esta bacteria se han descrito cuatro sistemas de percepción de quórum que están relacionados entre sí. Los sistemas están conformados por su complejo regulador y su sintasa y/u operón, tales como LasR–LasI y RhIR–RhII que actúan como complejos de regulación transcripcional positivos que activan la expresión de genes cuando interactúan con moléculas señalizadoras afines, tales como 3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) para el sistemas Las y N-butanoil homoserina lactona (C4-HSL) para el sistema Rhl. El sistema pqsR, es controlado por el autoinductor 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) cuyo operón *pqsABCDH* se encarga de sintetizar estas moléculas, mientras el sistema IqsR tiene como operón a *ambBCDE* el cual sintetiza autoinductores IQS (2- (2 -hidroxifenil)-tiazol - 4 - carbaldehído) que funciona bajo condiciones limitantes de fosfato (Figura 3,(61)).

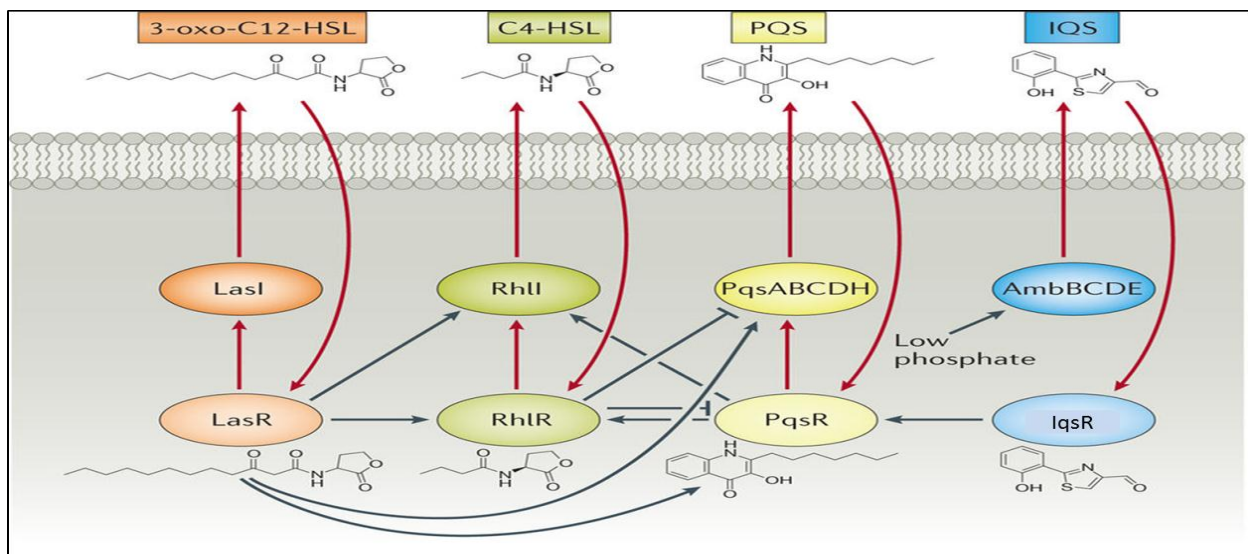


Figura 3. Sistema de percepción de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*. Las sintetas y/u operones *lasI*, *RhII*, *PqsABCDH* y *AmbBCDE*, producen a los autoinductores, 3-oxo-C12-homoserina lactona (OdDHL), C4-HSL (BHL), 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y 2- (2-hidroxifenil) -tiazol-4-carbaldehído (IQS), respectivamente. El 3-oxo-C12-HSL, C4-HSL y PQS, son reconocidos por factores de transcripción en el citoplasma. La producción de la señal IQS se induce por baja disponibilidad de fosfato en el medio. Los sistemas individuales están altamente conectados y se autoinducen (flechas rojas) y al estar interconectados entre sí, se pueden activar y retroalimentar transcripcionalmente (flechas negras).

Las diferentes redes de señalización que integran este sistema de percepción de quórum en *P. aeruginosa* mantienen una constante retroalimentación, siendo el complejo lasR-lasI el principal, ya que actúa como activador transcripcional general del DNA después de unirse con la molécula autoinductora en el citoplasma. El complejo LasR activa además la expresión de los genes *rhIR* y *rhII* que codifican para una segunda vía de detección de quórum; mientras que el complejo *PqsR – pqsABCDE* codifican para genes que participan en la síntesis de moléculas de tipo PQS y la síntesis de factores de virulencia (62). A partir de los experimentos de Pesci en 1999 (63), se determinó la estructura química de los molécula autoinductora de PQS, que consta de 2- heptil-3- hidroxil-4-quinolona, lo que permitió observar que también es químicamente fina a las señales de Acil homoserina lactona de los sistemas Rhl y Las.

Las moléculas de tipo PQS son reconocidas por el complejo PqsR (anteriormente conocido como *MvfR*) que se unen a una región promotora del operón *pqsABCDE* que controla directamente la expresión del gen *PqsR* que puede activar la transcripción del sistema RhlR- RhlI (64). Sin embargo, se ha mostrado que el sistema de señalización PQS también se retroalimenta del complejo RhlR, LasR e IqsR que activan los mecanismos del proceso de infección bacteriana, la transcripción y traducción de moléculas tales como piocianina, ramnolípidos y lectina PA-IL, y compuestos tóxicos como el ácido cianhídrico (65, 66). La señal de comunicación IQS tiene la capacidad de integrar estímulos estresantes del ambiente a través la red de percepción de quórum. Este tipo de señalización pertenece a una nueva clase de percepción de quórum cuyo autoinductor es el 2-(2-hidroxifenil)- tiazol-4-carbaldehído, producidos por el operón *ambBCDE* que son regulados por el complejo IqsR que determina la expresión de factores de virulencia entre los que se encuentran la piocianina, ramnolípidos y la elastasa (61).

Lee, et al., 2013,(61) también demostraron que la vía de señalización IQS contribuye con la virulencia de *P. aeruginosa* en cuatro modelos diferentes de hospederos; ratón, pez cebra, mosca de la fruta y nematodos, destacando la participación de dicha vía en la patogénesis bacteriana. Bajo condiciones de estrés, como es la poca disponibilidad de fosfato que ocurre en los ambientes naturales habitados por *P. aeruginosa*, la vía IQS puede tomar el control de las funciones centrales del sistema Las y Pqs activando la expresión de factores de virulencia que estos sistemas regulan. Estos resultados resaltan la importancia de los factores ambientales en la modulación de los sistemas de percepción de quórum y la plasticidad de las redes de señalización en el alojamiento y la explotación de los cambios ambientales para el beneficio de los patógenos bacterianos. Mediante la interacción de los diferentes circuitos de señalización que integran el sistemas de percepción de quórum de *P. aeruginosa* sintetiza factores de virulencia citotóxicos que disminuyen el sistema inmune del hospedero e interfieren en la respiración celular (67). Por esta razón, se sugiere la posibilidad de reducir la resistencia y favorecer el desarrollo de cepas menos virulentas si se inhibe el sistema de percepción de quórum.

Los sistemas Las y Rhl son los principales sistemas de percepción de quórum y están involucrados de manera directa en la expresión e interacción de genes relacionados con la virulencia y la patogénesis de esta bacteria tales como elastasa A y B (codificados por *lasB*), proteasa alcalina (codificada por *aprA*), ramnolípidos (codificados por el operón *rhlAB*) exotoxina S (codificada por *toxS*) que conducen a la muerte celular, debido a que son las moléculas más agresivas para el hospedero, mientras que el sistema Pqs induce la expresión del gen *phz* que es una de las vías que tienen *P. aeruginosa* para sintetizar pocianina, la producción de ácido cianhídrico codificado por *hcn* y lectina A, codificada por el gen *lecA* (Figura 4,65).

La activación de LasR-PAI1 induce la transcripción del gen *rhlR* por lo que este sistema sensorial forman una cascada regulatoria determinada por lasR. En cepas ambientales, el sistema Rhl es muy variable en comparación con el sistema Las puesto que solo se expresa en condiciones de escasas de nutrientes como el fósforo, en forma de fosfato, o el nitrógeno, por tanto, en un medio rico y con alta densidad celular es muy difícil que ocurra la regulación de factores del sistema RhlR (69).

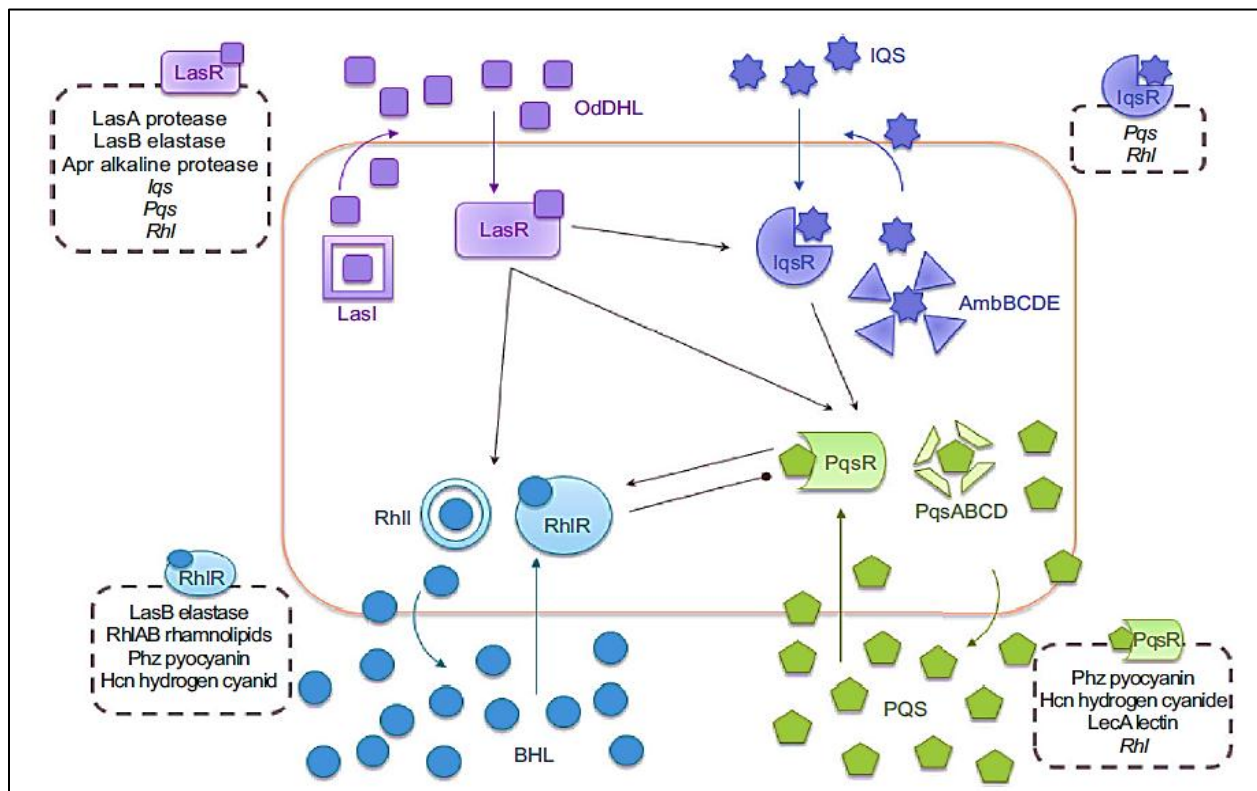


Figura 4. Esquema jerárquico de las cuatro redes de señalización controlados por el sistema de percepción de quórum en *P. aeruginosa*. El aumento en densidad celular induce la secreción de moléculas autoinducidas de tipo OdDHL, las cuales son reconocidas por el complejo LasR que desencadena la expresión de factores de virulencia en regiones promotoras de los genes (RhlR, IqsR y PqsR). La enzima sintasa *rhlI* es la que se encarga de la producción de moléculas autoinducidas BHL. El sistema Pqs puede ser activado por sistemas IqsR y RhlR para producir autoinducidos de tipo Pqs a través del operón *PqsABCD*, mientras que *AmbBCDE* activa la producción de moléculas tipo IQS.

2.3.2 Reguladores de la expresión génica del sistema de percepción de quórum y la susceptibilidad a los antibióticos.

Los genes reguladores son aquellas familias de genes encargados de controlar y dirigir la velocidad de expresión de uno o de varios genes o de rutas biosintéticas involucradas en cualquier organismo. En *P. aeruginosa*, existen varias familias de genes que regulan el sistema de percepción de quórum y que influyen en la susceptibilidad a los antibióticos. Por ejemplo, los genes *GacS/ GacA* controlan la producción de metabolitos secundarios, la formación de biopelículas y la secreción de enzimas extracelulares implicados en la patogenicidad, además de ser un regulador transcripcional positivo de *lasR* y *rhII* (70). El gen regulador *AlgR2* está involucrado en la regulación de la producción de alginato, en la síntesis de polifosfato, así como en la secreción de factores de virulencia tales como la proteasa alcalina, además de ser un regulador transcripcional negativo de *lasR* y *rhIR* (71).

Los genes *mvaT* se identificaron como reguladores globales de la expresión de los factores de virulencia debido a las mutaciones de estos genes que originaban el silenciamiento de la lectina A y una disminución en la producción de pirocianina, además de que pueden modificar la expresión del operón de las bombas de eflujo MexEF-OprN (72). Juhas M, et al., en 2004 (73) determinaron que los genes *rsmA* controlan también los niveles de la señal de densidad celular (quórum), actuando como regulador transcripcional negativo de *lasI* a igual que los genes *rsaI*, que reprimen la transcripción del gen de la sintasa *lasI* y además reduce la producción de moléculas señalizadoras que regulan la expresión de bombas multiflujo MexEF-OprN, promoviendo la susceptibilidad a los antibióticos tales como trimetoprima, cloranfenicol, norfloxacin y al ácido nalidíxico.

En 2011, Seet y Zhang (74) identificaron y caracterizaron un nuevo anti activador transcripcional codificado por *QsIA* en *Pseudomonas aeruginosa*, denotando que un tipo de mutación en *QsIA* eleva la señalización de quórum mejorando la producción de factores de virulencia y de patogenicidad producto de la interacción proteína-proteína con *pqsR* y *lasR*, que impide que *lasR* se una a su promotor objetivo.

2.3.3 Inhibidores sintéticos del sistema de percepción de quórum.

La utilización de compuestos de origen biológico o sintético con actividad inhibitoria del sistema de percepción de quórum se le conoce como *quorum quenching* cuyo mecanismo de acción puede ser igual o diferente al de los antibióticos, sin embargo, existe una relación en que estos inhibidores del sistema de percepción de quórum influyen en las bombas de eflujo que logran sacar a los antibióticos del citoplasma.

Los inhibidores sintéticos descritos presentan diversas estructuras y provienen de diferentes precursores, tales como la azitromicina, un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos, caracterizado por poseer una lactona macrocíclica que se puede unir a uno o dos desoxiazúcares, que además de presentar actividad antibiótica actúan como inhibidores del sistema de percepción de quórum de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, en la cual se ha demostrado que disminuye la producción de factores de virulencia y reduce la formación de biopelícula (75). Estructuras genéricas de furanilhidrazidas, tienilhidracidas, pirazolilhidracidas y pirazolilamidas tienen la capacidad de inhibir la autoinducción de los sistemas Las y Rhl debido a que en su núcleo mantienen la estructura química que tiene una actividad antagonista a los autoinductores 3-oxo-C12-homoserina lactona (OdDHL), y N-butanoil- homoserina lactona (BHL), (76).

Con base a lo anterior, se ha demostrado que el sistema de percepción de quórum se puede inhibir mediante el uso de moléculas análogas o antagónicas a los autoinductores que inhiben la formación de biopelículas y bloquean el sistema de señalización entre bacterias (77). Estos complejos contribuyen a la resistencia y persistencia de muchas bacterias patógenas.

De algunos organismos marinos como las algas (*Delisea pulchra*) se ha aislado una amplia gama de estructuras de furanonas halogenadas, las cuales estructuralmente son muy similares a los autoreceptores de tipo acil- homoserin- lactonas (AHLs) que participan en la percepción de quórum en *P. aeruginosa*. Debido a esta similitud, las furanonas intervienen en el mecanismo de señalización de las bacterias, reprimiendo la producción de factores de virulencia (78). Se han utilizado variantes sintéticas de las furanonas, comprobando su capacidad para bloquear la comunicación celular entre bacterias y evitar la formación de biopelícula en *Salmonella entérica* y *Streptococcus mutans* (79, 80).

El compuesto sintético (Z)-4-Bromo-5-(bromometileno)-2(5H)-furanona (furanona C-30) está registrado como uno de los compuesto con mayor actividad inhibitoria del sistema de percepción de quórum en algunas cepas farmacorresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. La furanona C-30 interviene en la expresión de los factores de virulencia tales como la proteasa, y la elastasa, así como en la producción de ramnolípidos, y la biosíntesis de fenazina, precursores indispensables en la producción de piocianina (81).

2.3.4 Productos naturales como inhibidores del sistema de percepción de quórum.

Los productos naturales han retomado gran importancia en los últimos 50 años, ya que muchos de ellos se han utilizado como base para la obtención de fármacos. Entre sus actividades terapéuticas, se destacan como agentes antimicrobianos, antimicóticos y antivirales ya sea para el área biomédica o para el control fitopatógico (82).

La coexistencia de especies en los ecosistemas naturales ha propiciado que exista una interacción entre las especies, ya sea para competir, cooperar o para beneficiarse. La activación del sistema de percepción de quórum es mecanismo que utilizan algunas bacterias para segregar una gran cantidad de compuestos como parte de su sistema de defensa contra sus competidores o depredadores. Por ejemplo, algunas cepas de *Actinobacterias*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Oceanofacilos* tienen la capacidad de secretar moléculas que impiden la biosíntesis de la producción de autoinductores AHL de otras bacterias competidoras, en las cuales se han encontrado 4 enzimas que tienen la capacidad de inhibir el sistema de percepción de quórum tales como lactonasas y descarboxilasas que hidrolizan el anillo de lactona, mientras que la AHL- acilasa y la desaminasa escinde la cadena lateral de acilo (83).

Diferentes cepas bacterianas tienen la capacidad de secretar metabolitos secundarios tales como *Streptomyces*, que secreta butirolactonas (2 (3H) -furanonas) que actúan como análogos de AHL e intervienen en la transcripción de genes de virulencia (84). Diversos intermediarios de la biosíntesis de (2 (5H)-furanonas) en *Hortonia sp* y *Streptomyces* presentaron una actividad inhibitoria del sistema de percepción de quórum en una cepa de *C. violaceum* mediante la represión de moléculas autoinductoras (85). La secreción de metabolitos secundarios de *Bacillus horikoshii*, *B. pumilus* y *Vibrio n.* tienen actividad eficiente contra la formación de biopelículas en *S. pyogenes* (86).

Algunos animales también desarrollan mecanismos para prevenir o evitar ser contagiados de una enfermedad ocasionada por un patógeno. Los ratones, ratas y el pez cebra secretan enzimas que inactivan o degradan la señales de quórum de los autoinductores C6HSL (N- hexanol- L- Homoserina lactona) y 3OC12HSL (N-3-oxododecanol homoserina lactona), mientras que la enzima acilasa del pez cebra reduce la formación de biopelículas de *A. hydrophila* y *Pseudomonas putida* (87).

Los hongos también presentan una actividad inhibitoria del sistema de percepción de quórum, algunas cepas de *Penicillium spp.* secretan metabolitos secundarios tales como la patulina y el ácido penicíclico que se utilizan para reducir las infecciones y lesiones en ratones causadas por *P. aeruginosa*, y que también inhibe el sistema de percepción de quórum, a través de la represión de los factores de virulencia (88).

Diversos hongos endófitos asociados a la rizosfera en plantas silvestres tienen la capacidad de degradar a los autoinductores C6HSL y 3OC6HSL de *C. violaceum* y *A. tumefaciens* a través de la actividad de compuestos orgánicos como la lactona. Actividad similar a estos hongos endófitos también se han observado en algunos hongos de género *Ascomycota* y *Basidomycota* (89). Los pigmentos naturales producidas por *Auricularia auricular* también presentan una actividad inhibitoria de la percepción de quórum en *C. violaceum* mediante la producción de violaceína que presenta gran actividad reductora hacia las moléculas autoinductoras (90).

Con base a lo anterior, las plantas medicinales con fuerte actividad antimicrobiana han resultado ser buenos inhibidores del sistema de percepción de quórum, debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que se encuentran en ellas, tales como la β -galactosidasa y violaceína que se encuentran en grandes cantidad en el ajo (*Allium sativum*) que disminuyen la producción de biopelículas, alginato y elastasa, en cepas de *A. tumefaciens*, *C. violaceum* y *P. aeruginosa*, respectivamente (91, 92).

El uso de plantas como *Medicago sativa* y *truncatula* produce extractos con actividad antimicrobiana contra *C. violaceum* y *P. aeruginosa* que disminuyen la secreción de los factores de virulencia (93). Las furocumarinas presentes en las uvas se han utilizado contra estos patógenos, disminuyendo la secreción de factores de virulencia y la formación de biopelícula de *C. violaceum* (94). Las plantas del género *Brassica* presentan gran actividad antimicrobiana, debido a los metabolitos secundarios que sintetizan, como la violaceína, que se usa contra *P. aeruginosa* cuya actividad biológica es similar al del antibiótico aztreonam, un antibiótico betalactámico monocíclico sintético que inhibe la síntesis de pared celular (94). *Armoracia rusticana*, comúnmente conocidas como rábano picante o rábano de caballo es otra planta del género *Brassica* que posee grandes propiedades biológicas, de la raíz se extrajo la iberina, un isotiocianato que ha demostrado inducir la expresión de enzimas de desintoxicación de fase II, incluyendo la quinona reductasa y la glutatión S- transferasa, además, inhibe la expresión de las proteínas Cdk2, Cdk4 y Cdk6 en pruebas *in vivo* induciendo la detención del ciclo celular y la apoptosis (95).

No obstante, la iberina presenta gran actividad *quorum quenching*, destacándose por la no interacción directa que tiene con los complejos reguladores transcripcionales LasR y RhIR, sino por su efecto en la expresión de los pequeños RNA reguladores RsmY y RsmZ dependientes de *GacA*, *RsmY* y *RsmZ* que disminuye la producción de los factores de virulencia y la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* (96). Los estudios mencionados anteriormente destacan el potencial de las plantas como agentes antimicrobianos, por lo cual, la búsqueda de nuevos extractos y compuestos puros con posible actividad de *quorum quenching* en bacterias patógenas es una línea de investigación de mucho interés para el área biomédica ya que ofrece una alternativa terapéutica al uso de no antibióticos para combatir las enfermedades ocasionadas principalmente por bacterias farmacorresistente.

2.4 Plantas del género *Larrea*

El género *Larrea* pertenece a la familia de las zygophyllaceae, comprende cinco especies localizadas geográficamente en zonas áridas y semiáridas de Norteamérica y Sudamérica. Se caracterizan por su número de cromosomas. Argentina alberga tres de las cinco especies; *L. cuneifolia* Cav. (n=26), *L. nítida* Cav. (n=13) y *L. umeghinoi* Speg. (n=13). *L. divaricata* Coville (n=13) se encuentra en Argentina y en Perú, Chile y Bolivia.

L. tridentata Cov. se encuentra distribuida en Norteamérica y presenta variaciones en su cariotipo respecto al nivel de ploidía, sin embargo, es similar fenotípicamente a *L. divaricata*; variante diploide ($2n=26$) de *L. tridentata* Cov. y se encuentra en el desierto de Chihuahua, mientras que la variante tetraploide ($2n=52$) se encuentra en zonas desérticas de Sonora y la hexaploide ($2n=78$) se localiza en el desierto de Mojave, al sur de California (97, 98).

2.4.1 *Larrea tridentata*, características y distribución.

Larrea tridentata se describió por primera vez entre los años de 1750 y 1800 por Sessé y Moc. en Coville, EUA. la etimología *Larrea* se le otorgó en honor a Juan Antonio Hernández Pérez de Larrea, clérigo español divulgador de ciencia nacido en 1730, mientras que el término *tridentata* se refiere al epíteto latino que significa “tres dientes” (99). A *Larrea tridentata* se le conoce comúnmente como “la gobernadora” haciendo alusión a su capacidad dominante sobre otras especies, aunque también se le conoce como chaparral o hediondilla (100). Esta especie se encuentra distribuida principalmente en las zonas semidesérticas y desérticas de América del Norte. En EUA. se encuentra desde Texas hasta el sur de California, y en México se encuentra principalmente en el desierto de Sonora (figura 5) y gran parte de la península californiana, aunque también se encuentra en los Estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí e Hidalgo (100, 101).



Figura 5. Distribución geográfica de *Larrea tridentata* y *Larrea divaricata* en Norteamérica y Sudamérica, respectivamente.

L. tridentata es una planta con forma de arbusto ramificado, cuya altura va desde los 0.3 hasta los 6 metros (Figura 6). Sus hojas están formadas por 2 folíolos entrelazados entre sí y son de color verde o verde amarillento, sus flores son solitarias con un diámetro de 2.5 cm y con sépalos elípticos de 6 mm pubescentes y caedizos y pétalos de color amarillo fuerte con una longitud de 1 cm y un ancho de 4 mm (Figura 7). La especie presenta un sistema radicular superficial y extenso. En sus hojas se encuentran grandes cantidades de resinas que actúan como un protector antitranspirante, así como gran cantidad de metabolitos secundarios de los tipos lignanos y flavonoides que constituyen un mecanismo de defensa para repelar el ataque de herbívoros, hongos y otros microorganismos (100).



Figura 6. Arbusto de *Larrea tridentata*.

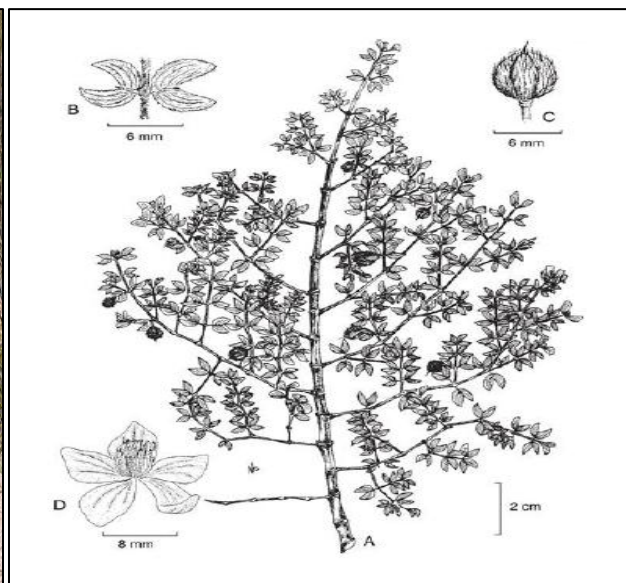


Figura 7. *Larrea tridentata*. A. ramas con frutos. B. Hojas con estípulas. C. fruto. D. Flor.

Fuente: CONABIO, 2013. Rzedowki y Calderón, 1988.

2.4.2 Composición química

En los últimos años, se ha identificado y se ha ampliado el perfil fitoquímico de *Larrea tridentata* (Tabla 2). Entre los compuestos identificados destacan aquellos con actividad biológica contenido en extractos de acetato de etilo, metanólicos y etanólicos. Entre los metabolitos secundarios identificados se encuentran terpenos, taninos, flavonoides y saponinas. Con el uso de técnicas cromatográficas como la HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) se logró identificar al ácido cinámico, al metil galato, a la catequina, al ácido 2- hidroxicinámico, al ácido elágico y al ácido clorogénico en los extractos de dicha planta (102). En el follaje se han identificado gran cantidad de flavonoides; como el 6-8- diglucósido de crisoeriol, el 3-3'- 7-8- eter-tetrametilico de gosipetina, el 3-7 dimetil- herbacetina, el 3-7-8- éter-trimetílico de herbacetina y la vecenína; algunos lignanos tales como el ácidos dihidro-norguaiarético, el 3'- demetoxi-6- demetil- isoguaiacina, la 4-epilearreatricina y su derivado 3'- hidroxilado, así como a los triterpenos 3- beta (3- dihidroxi- cinamoil)-eritrodil; y el esteroil betasitosterol, y en la raíz se han identificado compuestos como el quinoideo larreantina (103, 104). Dentro de las hojas también se encuentran moléculas densas y largas como son las resinas secretadas de tricomas glandurales, las cuales contienen una gran cantidad de compuestos volátiles y aceites esenciales que la planta utiliza como mecanismos de defensa (105).

El principal compuesto identificado en las resinas es el ácido nordihidroguayarético (NDGA) el cual se encuentra presentes en gran cantidad en todas las variedades de *Larrea*.

Tabla 2. Principales metabolitos y compuestos orgánicos de <i>Larrea tridentata</i> .		
% del peso seco de la planta	Tipo	Metabolito secundario
16-21	Lignanos fenólicos	Ácido dihidroguayarético. Hemi-noriguaicina. Ácido nordihidroguayarético. Nordihidroguaiacina.
5-7.5	Flavonoides	Apigenina, Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenina A, ácido larreico.
0.1-0.2	Monoterpenos volátiles	
	Hidrocarburos 35	Alfa peneno, delta-3- careno, limoneno, benzaldehído, benzilacetato.
	Aromáticos	Benzilbutano, metil naftaleno.
	Esteroides	Beta-sitosterol, colesterol, campesterol.
	Taninos	
	Carbohidratos	Glucosa, sucrosa.
70 (en tallos)	Lípidos	Alkil ésteres (C46- C56)
16.6	Aminoácidos	Fenilalanina, isoleucina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina.
15.6 mg/lb 19.8 mg/100 g	Vitaminas	Caroteno, Vitamina C
13.7	Minerales	Na, K, Ca, Mn, Fe, S, P

Fuente: Lira Saldivar, 2003. C.p. Binker, 1993.

2.4.3 Usos y aplicaciones

La gobernadora se ha usado como planta medicinal desde hace siglos. Los pueblos nativos del norte de México y del suroeste de EUA, empleaban a esta planta como remedio medicinal para varias enfermedades de origen renal y urinario tales como cálculos renales, dolor de riñón, o la cistitis (inflamación de la vejiga) (106).

Uno de los principales usos de *Larrea tridentata* consiste para aquellas mujeres que presentan problemas ginecológicos así como infecciones, dolores y malestares de la menstruación y molestias después del parto. El tratamiento consiste en la aplicación de lavados o la ingesta de infusiones a partir de las hojas, ramas y raíces de la planta. También se ha reportado que tiene propiedades curativas contra la mala digestión e inflamación mediante la aplicación de infusiones o compresas calientes sobre el vientre, además sirve para lavar heridas superficiales debido a que tiene propiedades de cicatrización (103).

La obtención de resinas y antioxidantes de la gobernadora es otra aplicación usada en la industria ya sea para teñir el cuero, elaborar plásticos o preparar pinturas, aunque también se ha utilizado para alimentar al ganado debido a que el forraje es rico en fibra y proteínas (107). En el follaje de la planta se encuentra la mayor cantidad del ácido nordihidroguayarético (NDGA) el cual se utiliza para la obtención de grasa para lustrar el calzado, y es la base de pegamentos, lubricantes, barnices y diferentes tipos de hule (108). El NDGA es un metabolito secundario que presenta gran actividad antifúngica de amplio espectro contra una gran variedad de especies de hongos en pruebas *in vitro*, además de tener gran actividad insecticida, bactericida y nematocida, por lo cual se ha utilizado contra algunas enfermedades en plantas como el gorgojo pardo del frijol, principal barrenador de los granos (100).

En 1983, Velásquez et al., (109) elaboraron los primeros reportes sobre el uso de las resinas de la gobernadora como moléculas bactericidas y bacteriostáticas a bajas dosis en ensayos *in vitro* usando extractos etanólicos contra bacterias fitopatógenas como *Erwinia amylovora*, y *Pseudomonas solanacearum*. Además se ha encontrado que los flavonoides de *L. tridentata*, particularmente los 3 – metoxiflavonoides, e incluyendo al 3 – metil – keampferol, 3,3 ‘- dimetil- quercetin y 3,7,3’- trimetil- quercetin tienen efecto antiviral hacia los virus de una sola cadena (que afectan al RNA) tales como el virus de la polio, Coxsackie B2 y rinovirus (110).

Con base a lo anterior, *Larrea tridentata* también presenta propiedades anticancerígenas en ensayos *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares de cáncer de mama, en los cuales se observó que el NDGA tiene la capacidad de inhibir la función de dos receptores tirosina quinasa: el receptor de crecimiento (IGF-1R) estimulado por la insulina y el receptor del complejo c-erbB2/HER2/neu (111). Además, la gobernadora también presenta propiedades antiparasitarias contra *G. lamblia*, *E. histolytica* y *N. fowleri*. que describen que el NDGA y cierta clase de lignanos como la demetoxi isoguaiacina inhiben el crecimiento de los huevecillos inhibiendo la síntesis de proteínas (112).

Recientemente, Chan et al., 2018 (113) determinaron que el NDGA tiene propiedades reguladoras del síndrome de obesidad inducida por estilos de vida (ALIOS) por sus siglas en inglés. En dicho estudio se observó que administración concomitante de NDGA normalizó el peso del tejido adiposo del cuerpo y del epidídimo, además de los niveles de ALT y AST y los triglicéridos del hígado, así mismo, se observó que el tratamiento con NDGA también mejoró la sensibilidad a la insulina pero no la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con la dieta ALIOS. La conclusión de este estudio denota que el uso de NDGA mejora la desregulación metabólica al modular simultáneamente al factor de transcripción PPAR α y los genes clave implicados en la oxidación de ácidos grasos, en la codificación de enzimas antioxidantes clave y lipogénicas en apoptosis y en las vías de señalización del estrés del retículo endoplasmático (113).

Finalmente, estudios recientes sobre *L. tridentata*, han determinado que el NDGA inhibe la actividad de tres enzimas diferentes implicadas en el manejo de la glucosa posprandial: la α -amilasa, la α -glucosidasa y la dipeptidil peptidasa, teniendo como resultado la inhibición considerable de estas enzimas importantes para los valores de IC_{50} (114).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

P. aeruginosa es un problema de salud a nivel nacional y mundial, ya que es la principal causa de infecciones nosocomiales en pacientes con cáncer, fibrosis quística y pacientes con quemaduras. Esta bacteria presenta resistencia natural y adquirida a diversas clases de antibióticos, por lo que es necesario encontrar nuevos métodos de tratamiento que inhiban o disminuyan la comunicación celular o la producción de factores de virulencia, moléculas importantes para la infección y permanencia en el huésped.

3.1 Hipótesis

- El extracto de acetato de etilo y los metabolitos secundarios obtenidos de la planta *L. tridentata* disminuyen la expresión de genes asociados a sistema de percepción de quórum y/o la producción de factores de virulencia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Analizar la regulación del sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa* es respuesta a un extracto bioactivo y metabolitos secundarios purificados de *Larrea tridentata*.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener un extracto bioactivo del follaje de *L. tridentata* mediante solventes orgánicos (acetato de etilo).
- Extraer y purificar metabolitos secundarios presentes en el extracto de *L. tridentata*.
- Caracterizar e identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto bioactivo por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar la producción de los factores de virulencia tales como la elastasa, la proteasa alcalina y la piocianina en cepas silvestres (PA14) y farmacorresistentes (PA64) de *P. aeruginosa* en respuesta a los metabolitos secundarios de *L. tridentata*.

- 1) (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol
- 2) 4 4'-(2,3-dimetilbutano-1,4-diil)dibenceno-1,2-diol
- 3) (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol
- 4) 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona.
- 5) 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona.
- 6) 3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il)furan-2,5-diona

- Evaluar la expresión de los genes (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *lasB*, *toxA*, *phz*) involucrados en el sistemas de percepción de quórum y en la producción de factores de virulencia en cepas silvestres y farmacorresistentes de *P. aeruginosa*.

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Larrea tridentata se consiguió en el mercado de Sonora, en la Ciudad de México. Una muestra de herbario (raíz, tallo y hojas) se envió al Herbario de la Facultad de Ciencias (UNAM) para su correcta clasificación. La parte aérea del material vegetal (2.5 kg) se secó a temperatura ambiente y se trituró por medio de un molino eléctrico.

5.2 Obtención del extracto de acetato de etilo

El material seco y molido se trató de manera consecutiva con disolventes de polaridad ascendente: hexano (Hx), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). La destilación a presión reducida de los disolventes proporcionó los respectivos extractos. Se obtuvieron 18 g de extracto de hexano, 237.8 g de extracto de acetato de etilo y 162.33 g de extracto metanólico.

5.3 Cromatografía en columna abierta

Al extracto de acetato de etilo (EAcOEt) de *Larrea tridentata* (50 g) se le agregó sílica gel para secarlo y refinar el punto de aplicación, posteriormente se sometió a fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta(CC), empacada con sílica gel (500 g) con una relación 1:10 de sílice con el punto de aplicación.

5.4 Recolección de muestras obtenidas por la cromatografía en columna abierta

Las fracciones contenidas en las columnas cromatográficas se eluyeron comenzando con hexano en relación (1:0), es decir, solo hexano, luego se aumentó gradualmente la polaridad con mezclas de hexano-acetato de metilo, en relación 4:1,3:2, 2:3,1:4 hasta llegar al acetato de etilo (1:0), la misma relación se usó para el acetato de etilo – metanol, hasta llegar a metanol (1:0).

Las fracciones eluidas de la columna cromatográfica se recolectaron en matraces de bola, las cuales se aforaron hasta la mitad por actividad de gravedad de la misma columna, posteriormente dichas fracciones se llevaron a un rotavapor, obteniendo un fracción evaporada donde se agregó el disolvente para su disolución completa para obtener la fracción deseada, luego se trasvasó a un vial (recipiente de vidrio) con un volumen de 10 a 30 mL aproximadamente, las fracciones se reunieron con base en la semejanza de sus componentes químicos determinada mediante la cromatografía en capa fina analítica (CCFa). Se obtuvieron 149 fracciones primarias en la primera columna y 178 fracciones primarias en la segunda columna.

5.5 Identificación de los metabolitos secundarios

La identificación de los diferentes compuestos aislados se realizó purificando las fracciones, quitando el exceso de disolvente y recrystalizando las muestras para su análisis a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

5.6 Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron la cepa PA1silvestre (WT) (PA14K) donada al Dr. Rodolfo García Contreras de la facultad de Medicina de la UNAM, por el Dr. You-Hee Cho del Colegio de Farmacia de la Universidad CHA en Corea del Sur (115).

La cepa farmacorresistente fue donada al Dr. Rodolfo García Contreras de la facultad de Medicina de la UNAM, a partir de un aislado clínico del Instituto de Investigaciones en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Ulster en Reino Unido.

5.7 Medio y placas Luria-Bertani (LB)

Este medio fue utilizado para la preparación de los precultivos bacterianos, ya que permite el libre crecimiento de todas las cepas utilizadas debido a que no presenta restricción en la obtención de la fuente de carbono. Para la preparación de un litro de cultivo se pesaron 10g NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona, sin ajustar el pH. Para la preparación de las placas de LB se agregó a la solución 1.2% Agar.

5.8 Medición de curva de crecimiento y condiciones de tratamiento para los ensayos *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para medir el crecimiento bacteriano, se dejó el medio de cultivo por “*Over Night*” (ON) a partir de 5 mL de medio LB y 10 μ L de alícuota de bacterias de cada cepa (PA14 y PA64) bajo un periodo de 12 a 13 horas aproximadamente a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Posteriormente se hizo una dilución 1/10 del cultivo ON (1mL de bacterias del cultivo ON y 9 mL de medio LB) y se cuantificó el crecimiento inicial de cada cepa por densidad óptica (D.O) a 600nm. Luego se agregaron 30 mL de LB en 2 matraces erlenmeyer de 125 mL para determinar cuántos μ L del cultivo ON (V_1) se deben agregar a los 30 mL de medio LB; para ello se aplicó la siguiente formula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad mL \text{ de ON a agregar } V_1 = \frac{C_2(0.10) V_2(30 \text{ mL})}{C_1 \text{D.O. del ON}}$$

A partir de las mediciones obtenidas se agregaron los volúmenes correspondientes a cada concentración y se incubó por un periodo de 2 a 3h a 37°C con agitación de 200 rpm. Después de este periodo se revisó la D.O de los reinóculos bacterianos, si estaban en D.O= 1 se repartieron en matraces de 5 mL por cada cepa (si la D.O no era 1, se regresaban a incubación hasta que los reinóculos bacterianos llegaran a D.O= 1). En el anexo 10.1 se encuentran los cálculos correspondientes a las concentraciones de

cada compuesto. La siguiente tabla se usó como base para preparar las condiciones de cada tratamiento.

Compuesto	PM (g/mol)	Concentración Reportada	100 μ M	100 μ M	1 μ M
Extracto de AcOEt	NA		NA	NA	NA
Compuesto 1	298.16		++	++	++
Compuesto 2	302.36		++	++	++
Compuesto 3	298.16	100 — 500	++	++	++
Compuesto 4	359.11	μ M	++	++	++
Compuesto 5	330.07		++	++	++
Compuesto 6	346.29		++	++	++
C-30	253.87	50 μ M		++	++

* El extracto se utilizó a un volumen de 100 mg/mL.

Se agregaron las cantidades de cada compuesto de diferente concentración, (5 μ L de cada compuesto por cada 1 mL de cultivo) en cada matraz erlenmeyer cubiertos con un tapón de tela y se incubaron por un periodo 24 h a 37°C con agitación de 200 rpm. Luego del periodo de incubación, se tomó una alícuota para medir el crecimiento en una dilución 9:1 con 900 μ L de agua y 100 μ L de cultivo bacteriano y se midió en el espectrofotómetro a 600 nm. Del cultivo bacteriano se colectó 1 mL y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 2 mL, luego se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de microcentrifuga de 2 mL y se guardó a 4°C, mientras que la pastilla o “*pellet*” se guardó a -70 °C.

5.9 Determinación de factores de virulencia.

Para la cuantificación de elastasa se tomó como base la técnica de Perlmann y Lorend (116, 117). Para ello, se diluyeron los sobrenadante 1/10 (100 μ L sobrenadante y 900 μ L agua destilada). Los niveles de elastasa en el medio extracelular (sobrenadante) de los cultivos de *P. aeruginosa* se determinaron mediante el reactivo Elastin Red Congo como se describe a continuación. En un tubo de microcentrifuga se agregaron 0.0050 g del reactivo Elastin Red Congo (Sigma-Aldrich), 900 μ L del buffer de elastasa (100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ con pH de 7.5) y 100 μ L de la dilución 1/10. La mezcla se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) por 2h, y se midió la D.O de las mezclas a 495 nm.

La cuantificación de proteasa alcalina se basó en la técnica de usar el azul brillante de remazol (BRRB) que es un reactivo que mide indirectamente la actividad de proteasas utilizando como sustrato los tejidos o fibras celulósicas como el colágeno, debido al grupo alquilo sulfonato que es el responsable de la unión con las fibras celulósicas bajo condiciones alcalinas teñiendo la mezcla de azul (118). Para ello, se diluyeron los sobrenadantes 1/10 de los cultivos de *P. aeruginosa* (100 μ L sobrenadante y 900 μ L agua destilada).

En un tubo de microcentrifuga se agregaron 0.0050 g del reactivo Hide-Brilliant Remazol Blue (sigma-Aldrich), 875 μ L buffer proteasa (100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ con pH 8) y 125 μ L de la dilución 1/10 sobrenadantes, la mezcla se incubó por 50 minutos a 37°C a 200 rpm y luego se midió la D.O a 595 nm.

La cuantificación de piocianina se realizó siguiendo el protocolo de Kurachi (119) mejorado por Knight en 1978. Con base en esto, se agregaron 400 μ L de cloroformo y 800 μ L de sobrenadante a un tubo de microcentrifuga el cual se agitó vigorosamente (con vórtex) por 2 min y después se centrifugó a 14000 rpm por 1 min. La fase azul se transfirió a otro tubo de microcentrifuga y se le agregaron 800 μ L de HCl 0.2 N y se agitó manualmente por 1 min. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 1 min., luego se tomó 650 μ L de la fase superior con 350 μ L de agua, antes de medir la absorbancia a 520 nm. en una celda de cuarzo.

5.10 Genes regulados por el sistema de percepción de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*.

La tabla 3 describe los diferentes tipos de genes regulados por el sistema de percepción de quórum en *Pseudomonas aeruginosa* los cuales fueron analizados en este trabajo. Las secuencias de los oligonucleótidos y de los genes (*lasI*, *lasR*, *rhIR*, *rhIIIR*, *aprA*, *lasB*, *toxA*) y 16s RNA ribosomal fueron obtenidos a partir de trabajos previos como el de Sabharwal, et al., en 2014 (120) y Toschka, 1998 (121), respectivamente. Así mismo, de aquellos genes que no se tenían oligos reportados (*pqsR*, *phz*) se diseñaron *de novo* en el programa Primer-BLAST de NCBI e Integrated DNA Technologies – PrimerQuest Tool.

Tabla 3. Genes regulados sistema de percepción de quórum en <i>P. aeruginosa</i> .			
Tipo de gen	Nombre del gen	Oligo (forward) 5'→3'	Oligo (Reverse) 5'→3'
Genes que regulan el sistema de "Quorum sensing".	<i>lasI</i>	CGTGCTCAAGTGTTCAAGG	TACAGTCGGAAAAGCCCAG
	<i>lasR</i>	AAGTGGAATTTGGAGTGGAG	GTAGTTGCCGACGACGATGAAG
	<i>rhIR</i>	TGCATTTTATCGATCAGGGC	CACTTCCTTTTCCAGGACG
	<i>rhII</i>	TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC	TTCCAGCGATTCAGAGAGC
	<i>pqsR</i>	AACCTGGAAATCGACCTGTG	GGCGTTCCTCGACGAAATAA
Genes que regulan los factores de virulencia	<i>aprA</i> (proteasa)	GTCGACCAGGCGGCGGAGCAGATA	GCCGAGGCCGCGGTAGAGGATGTC
	<i>lasB</i> (elastasa)	TTCTACCCGAAGGACTGATAC	AACACCCATGATCGCAAC
	<i>phz</i> (piocianina)	AGAGTACCAACGGTTGAAAGG	GGATGTAGTGGTTCTCGCAATA
	<i>toxA</i> (exotoxina)	GGAGCGCAACTATCCCACT	TGGTAGCCGACGAACACATA
Gen constitutivo	<i>16s Ribosomal RNA</i>	AGATGAGCCTAGGTCGGATTA	GCCCTTCCTCCCAACTTAAA

5.11 Extracción y cuantificación de RNA de *Pseudomonas aeruginosa*.

El RNA de las cepas PA14 y PA64 de *Pseudomonas aeruginosa* se extrajo siguiendo el protocolo recomendado para el reactivo Trizol (Invitrogen). Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se colectó la pastilla para hacer la extracción de RNA. Estos RNAs se extrajeron durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo bacteriano, después de la secreción de los factores de virulencia. Las pastillas de bacterias (250 μ L) se resuspendieron en 750 μ L de Trizol, mediante pipeteo suave y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, con el homogeneizador mecánico se maceraron las células dentro del tubo hasta romper la pared celular evitando la formación de grumos.

Luego se adicionaron 0,2 mL de cloroformo frío por cada 1 mL de Trizol y se agitaron vigorosamente por 15 s, posteriormente se incubaron por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa que (corresponde aproximadamente el 40 % del volumen de reactivo Trizol utilizado) a un tubo nuevo de microcentrifuga y se adicionaron 0.5 mL de isopropanol frío al 100% por cada 1 mL de reactivo Trizol. Luego se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 x g por 10 minutos a 4°C.

La limpieza del RNA consistió en descartar el sobrenadante dejando únicamente la pastilla de RNA, se agregó 1 mL de etanol al 75% por cada 1 mL de reactivo Trizol utilizado, se mezcló vigorosamente (en vórtex) y se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Luego se dejó secar la pastilla de RNA dejando el tubo en posición invertida hasta que el etanol se evaporara. Finalmente se resuspendieron en 20 μ L de agua DEPC. Antes de la cuantificación, las muestras se incubaron a 55°C- 60°C por un periodo de 10 a 15 minutos para favorecer la desnaturalización de estructuras secundarias y se almacenaron a -70°C.

La cuantificación de RNA se hizo de muestras que tenían el tratamiento a 100 μ M (tabla 4) mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop One que mide concentraciones con 1 μ L de muestra, con gran exactitud y reproductibilidad.

Tabla 4. Cuantificación de RNA.

Muestra	ng/ μ L	Abs. 260/280	Abs. 260/230
PA 14 (<i>wt</i>)	1060.7	1.95	1.69
C-30	1543.0	1.98	1.74
Compuesto 1	1661.8	1.97	1.81
Compuesto 2	1293.7	1.91	1.65
Compuesto 3	1387.2	1.95	1.84
Compuesto 4	1360.9	1.94	1.60
Compuesto 5	1459.7	1.95	1.84
Compuesto 6	1158.0	1.92	1.83
Extracto de AcOEt	1214.4	1.87	1.71
PA 64 (<i>wt</i>)	1250.9	1.97	1.67
C-30	1590.8	1.98	1.66
Compuesto 1	1774.9	1.93	1.83
Compuesto 2	1434.9	1.94	1.77
Compuesto 3	1632.2	1.97	1.85
Compuesto 4	1174.3	1.94	1.84
Compuesto 5	1603.1	1.95	1.82
Compuesto 6	1579.0	1.96	1.86
Extracto de AcOEt	2045.4	1.96	1.83

5. 12 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

La RT-PCR es un método de análisis para la expresión de genes, para ello es necesario tratar las muestras con Dnasa I para eliminar el DNA contaminante.

1. Para cada muestra de RNA se siguió el siguiente protocolo:

Reactivo	Volumen	condiciones
RNA	5 μ L	
10X Buffer de reacción con MgCl ₂	1 μ L	
DNase 1, Rnase-free (invitrogen)	3 μ L	37 °C por 30 minutos
Agua DEPC	1 μ L	
Volumen total	10 μ L	

2. Después de haber transcurrido este periodo, se agregó a cada muestra 1 μ L de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C por 10 minutos.

El siguiente protocolo fue optimizado para generar la cadena complementaria de DNA (cDNA), necesaria para hacer reacciones de PCR.

3. Para cada tratamiento se agregaron las siguientes soluciones:

Reactivo	Volumen	condiciones
RNA (tratado con Dnasa I)	10 μ L	65°C por 10 minutos.
Oligos randóm Hexaméros	1 μ L	
Agua DEPC	1.5 μ L	

4. Posteriormente, las reacciones se incubaron a 25°C por 10 minutos.

5. A la solución original se le añadieron los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen	condiciones
5X Buffer de reacción	4 μ L	42 °C por 60 minutos
Inhibidora de Rnase RiboLock	0.5 μ L	
dNTP Mix 10 mM	2 μ L	
RevertAid Transcriptase	Reverse 1 μ L	
Volumen total	20 μ L	

6. Las reacciones se incubaron a 70°C por 10 minutos.

7. Las reacciones de reversa transcriptasa (RT) se utilizaron para hacer las reacciones de PCR.

8. Para preparar reacciones en paralelo y minimizar los márgenes de error, se hicieron reacciones de PCR Mix siguiendo el protocolo para la Taq DNA polimerasa (invitrogen):

Reactivo	Cantidad
10X Taq Buffer	5 μ L
DNTP Mix, 2 mM	1 μ L
Forward primer	2 μ L
Reverse primer	2 μ L
25 mM MgCl ₂	4 μ L
Templado de DNA	2 μ L
Taq DNA polimerasa	0.25 U
Agua libre de nucleasas	33.75 μ L
Volumen final para cada reacción.	50 μ L

La tabla 5, resume las condiciones de amplificación para cada gen involucrado en el sistema de percepción de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*. Para los genes *lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*, *lasB* y *toxA* se utilizaron las condiciones de amplificación reportadas por Sabharwal *et al.* en 2014 (120). Mientras que para los genes *phz* y *16s rRNA* ribosomal se optimizaron las condiciones de amplificación *de novo*.

Tabla 5. Condiciones de amplificación para PCR.

Gen	Desnatura- lización	No. Ciclos	Desnatura- lización	Apareamiento de secuencias	Extensión	Extensión final	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
<i>lasI</i>	95°C- 2 min.	30	95°C- 40 s	50°/60°- 1min	72°C- 2 min	72°C- 10min	295	(120)
<i>lasR</i>				60°C – 1min			130	
<i>rhII</i>				60°C – 1min			155	
<i>rhIR</i>				60°C – 1min			133	
<i>lasB</i>	95 °C- 2min	35	95°C- 30 s	55°C-30 S.	72°C- 1 min	72°C- 10 min	153	
<i>tox A</i>	95°C- 2 min	30	95°C- 40 s	50°C- 40 S.	72°C- 2 min	72°C- 10 min	150	
<i>phz</i>	95°C-2 min	35	95°C- 30 s	55°C- 1 min	72°C- 1 min	72°C-10 min	362	Optimi- zados
<i>16s rRNA</i>	95°C- 2min	30	95°C- 40s	56°C – 1 min	72°C- 1 min	72°C-10 min	231	Optimi- zados.

5.13 Electroforesis en geles de agarosa

1. Para visualizar la integridad del RNA se preparó el gel de agarosa desnaturante con los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Agua DEPC	25.6 mL
Agarosa 1%	0.30 g
Buffer MOPS 10X	3 mL
Formaldehído	1.4 mL
SYBR Green I	3 µL

2. En cada pocillo se agregaron 3 µL de RNA más 6 µL de buffer de carga.

3. Las muestras se corrieron a 100 V. durante 30 minutos.

4. El gel se visualizó en un fotodocumentador.

1. Para visualizar los amplicones de PCR se prepararon geles de agarosa con los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Agarosa 1.5 %	0.60 g.
Buffer TAE 1X	40 mL

2. La mezcla se agitó y se calentó hasta que se disolviera completamente.
3. Posteriormente se agregaron 4 μ L de colorante SYBR Green I y se dejó gelificar.
4. En cada pocillo se agregaron 10 μ L de producto de PCR más 2 μ L de buffer de carga.
5. Las muestras se corrieron a 90 V. por 40 minutos.
6. El gel se visualizó en un fotodocumentador.

5.14 Análisis de geles de agarosa por densitometría.

Los niveles de expresión (acumulación de transcrito) de los genes descritos anteriormente se analizaron mediante densitometría con ayuda del software Image J. Para esto, se analizó la intensidad de las bandas para cada gen en geles de agarosa. La intensidad de las bandas se normalizó en relación a la intensidad de las bandas del gen constitutivo.

Para tener una mejor presentación de resultados, los niveles de expresión génica de cada gen se calculó el efecto en porcentajes en relación a la cepa sin tratamiento.

5.15 Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos *in vitro* se expresaron como media estándar de error (\pm). Además, los resultados se agruparon y se analizaron estadísticamente con el software NCSS – Basic (versión 2007) y se sometieron a un análisis de comparaciones múltiples por (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnet con $\alpha=0.05$ con intervalo de confianza de 95%. Los valores con $p < 0.05$ se consideraron como indicadores estadísticos significativos. Las figuras se realizaron a través del software GraphPad Prism (versión 5.01) y Microsoft Excel 2017.

6.0 RESULTADOS

6.1 Rendimiento del extracto de acetato de etilo y purificación de fracciones de *Larrea tridentata*

El rendimiento del extracto del acetato de etilo (EAcOEt) se calculó a partir del total del extracto obtenido en relación al total de la muestra, el rendimiento se considera alto si los valores oscilan entre el 5 y 20% en función de gramo por disolvente.

Rendimiento del extracto de Acetato de etilo

$$x = \frac{\text{total de extracto obtenido (237.8g)}}{\text{total de muestra (2500 g)}} (100\%) = 9.512 \%$$

Se aprovechó el alto rendimiento del extracto para obtener el mayor número de compuestos puros, para ello fue necesario eluir dos columnas cromatográfica. Las tabla 6 y 7 muestran las fracciones colectadas de la primera y segunda columna cromatográfica reunidas por similitud (fracciones con el mismo eluyente y la misma proporción de polaridad).

Tabla 6. Cromatografía del extracto de Acetato de etilo de *Larrea tridentata*.

Fracciones	Eluyente	Proporción	Fracciones Reunidas por similitud	clave del compuesto
1-10	Hexano	100%	11-20	
11-23	Hx/AcOEt	9:1	21-25	
24-48	Hx/AcOEt	8:2	26-30, 37-40	Compuesto 1
49-71	Hx/AcOEt	7:3	56-62	Compuesto 2
72-88	Hx/AcOEt	6:4	77-88	Compuesto 4
89-99	Hx/AcOEt	1:1	85-95	
100-113	AcOEt	100 %	100-111	
114-120	AcOEt/MeOH	9:1	114-118	
121-126	AcOEt/MeOH	8:2	121-126	
127-132	AcOEt/MeOH	7:3	127-132	
133-139	AcOEt/MeOH	6:4	133-139	
140-145	AcOEt/MeOH	1:1	140-145	
146-149	MeOH	100%	146-149	

*las letras en negritas significa que en esas fracciones se encontraron compuestos puros

Tabla 7. Cromatografía del extracto de Acetato de etilo de *Larrea tridentata*.

Fracciones	Eluyente	Proporción	Fracciones Reunidas por similitud	Clave del compuesto
1-20	Hexano	100%	15-20	
21-30	Hx/AcOEt	9:1	21-30	
31-64	Hx/AcOEt	8:2	45-48, 59-64	
65-89	Hx/AcOEt	7:3	68-69, 71-88	Compuesto 3
90-111	Hx/AcOEt	6:4	92-97, 105-111	Compuesto 5
112-122	Hx/AcOEt	1:1	115-118, 119-122	
123-132	AcOEt	100 %	125	Compuesto 6
133-140	AcOEt/MeOH	9:1	133-138	
141-147	AcOEt/MeOH	8:2	141-145	
148-158	AcOEt/MeOH	7:3	149-155	
159-165	AcOEt/MeOH	6:4	160-164	
166-174	AcOEt/MeOH	1:1	166-174	
175-178	MeOH	100%	175-178	

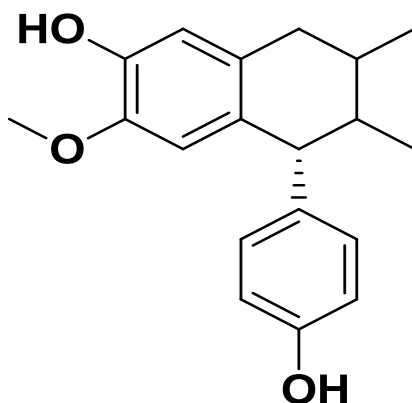
*Las letras en negritas significa que en esas fracciones se encontraron compuestos puros

6.2 Estructura e identificación de los compuestos químicos purificados de *L. tridentata*

La adquisición de los espectros de resonancia magnética nuclear (RNM ^1H) se realizó en un equipo Bruker Fourier de 300 MHz. A partir de estos espectros se determinó la estructura que se presentan a continuación.

Los disolventes deuterados utilizados en la realización de los experimentos, fueron cloroformo deuterado (CDCl_3) de Cambridge Laboratories $^{\text{MR}}$, al 99.5% silver fold y dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) de Cambridge Laboratories $^{\text{MR}}$, al 99.6 %.

6.2.1 Compuesto 1: 5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol



Nombre IUPAC:

(5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol

Fórmula molecular: C₁₉H₂₂O₃

Masa molecular: 298.16 g/mol.

m/z: 298.16 (100.0%), 299.16 (20.9%), 300.16 (2.6%).

Análisis elemental: C, 76.48; H, 7.43; O, 16.09

Punto de fusión: 138°C.

Disolvente: Acetona.

Fase de elución: 9:1 (Hexano: Acetato de etilo).

Características físicas: Sólido fino color blanco.

La siguiente estructura química que se compone de dos anillos aromáticos y un anillo de ciclohexano saturado, describe un patrón característico en el espectro de hidrógeno a 300 MHz. En la figura 8, se puede observar el espectro de protón para la estructura (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (estructura del compuesto 1).

A campo bajo se aprecia 4 grupos de señales que corresponden a los protones de los dos anillos aromáticos, seguido de una señal simple que integra para dos protones, correspondiente al grupo metoxilo de la posición 8. Y en campo alto, se puede observar 3 grupos de señales correspondientes a los protones del anillo de ciclohexano. Finalmente se observa sobrepuestas las dos señales correspondientes a los dos grupos metilo de las posiciones 13 y 14 en la molécula.

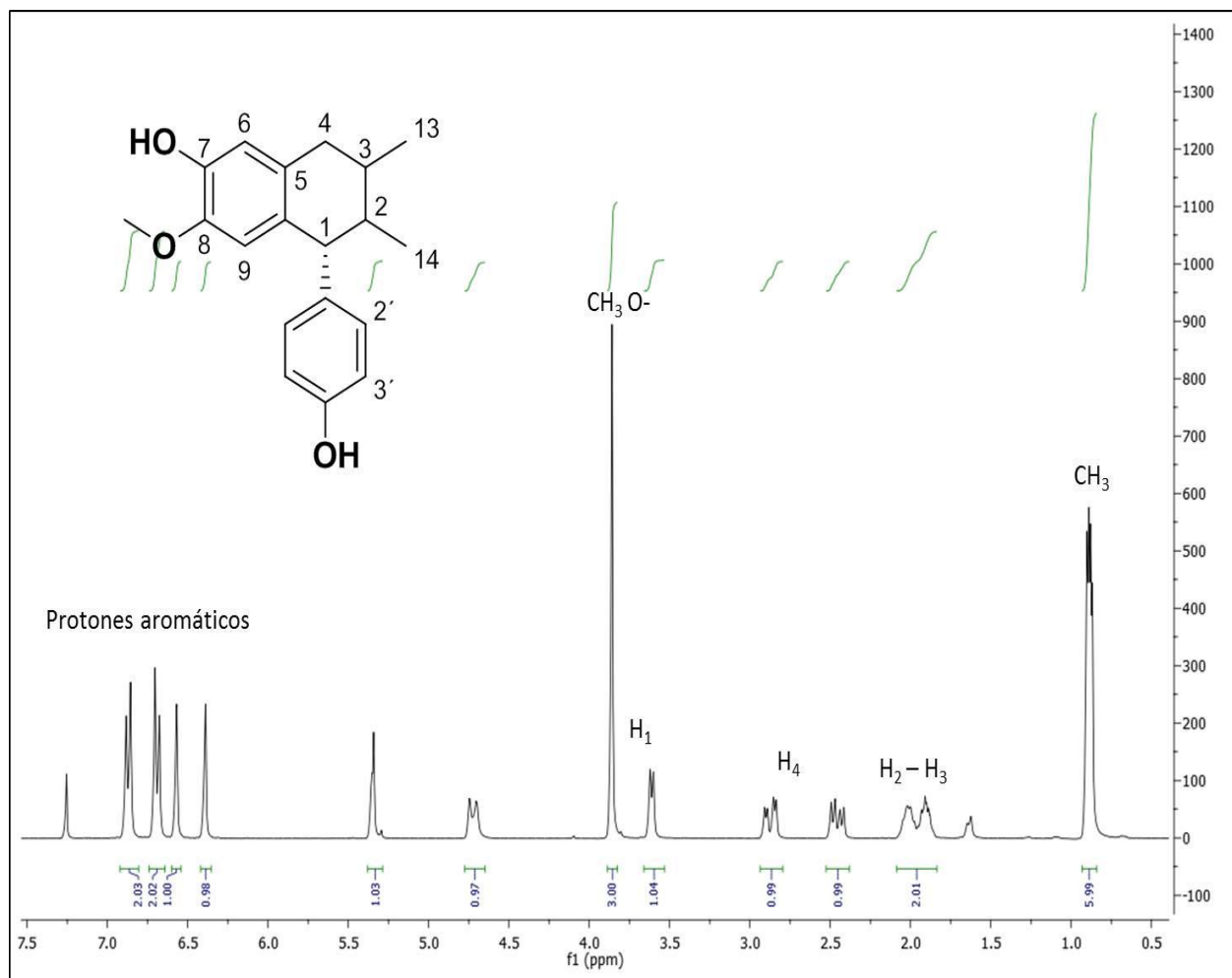


Figura 8. Espectro de RMN ^1H (300 MHz en CDCl_3) para la molécula (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.57 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.62 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 2.88 (dd, $J = 16.4, 5.1$ Hz, 1H), 2.46 (dd, $J = 16.4, 7.3$ Hz, 1H), 2.09 – 1.84 (m, 2H), 0.89 (m, 6H).

Para analizar más a detalle las señales a campo bajo del espectro anterior, se realizó una ampliación del espectro, para observar la multiplicidad característica de los sistemas que presenta la molécula (Figura 9). En 6.88 y en 6.70 ppm se encuentran dos señales dobles que integran para dos protones cada una y que corresponden a los del sistema AA'-BB' del anillo aromático di sustituido en posiciones 1,4. En la misma región aromática se encuentran otras dos señales; un singulete en 6.57 ppm correspondiente al protón de lo posición 9 y otro singulete en 6.40 ppm correspondiente al protón de la posición 6.

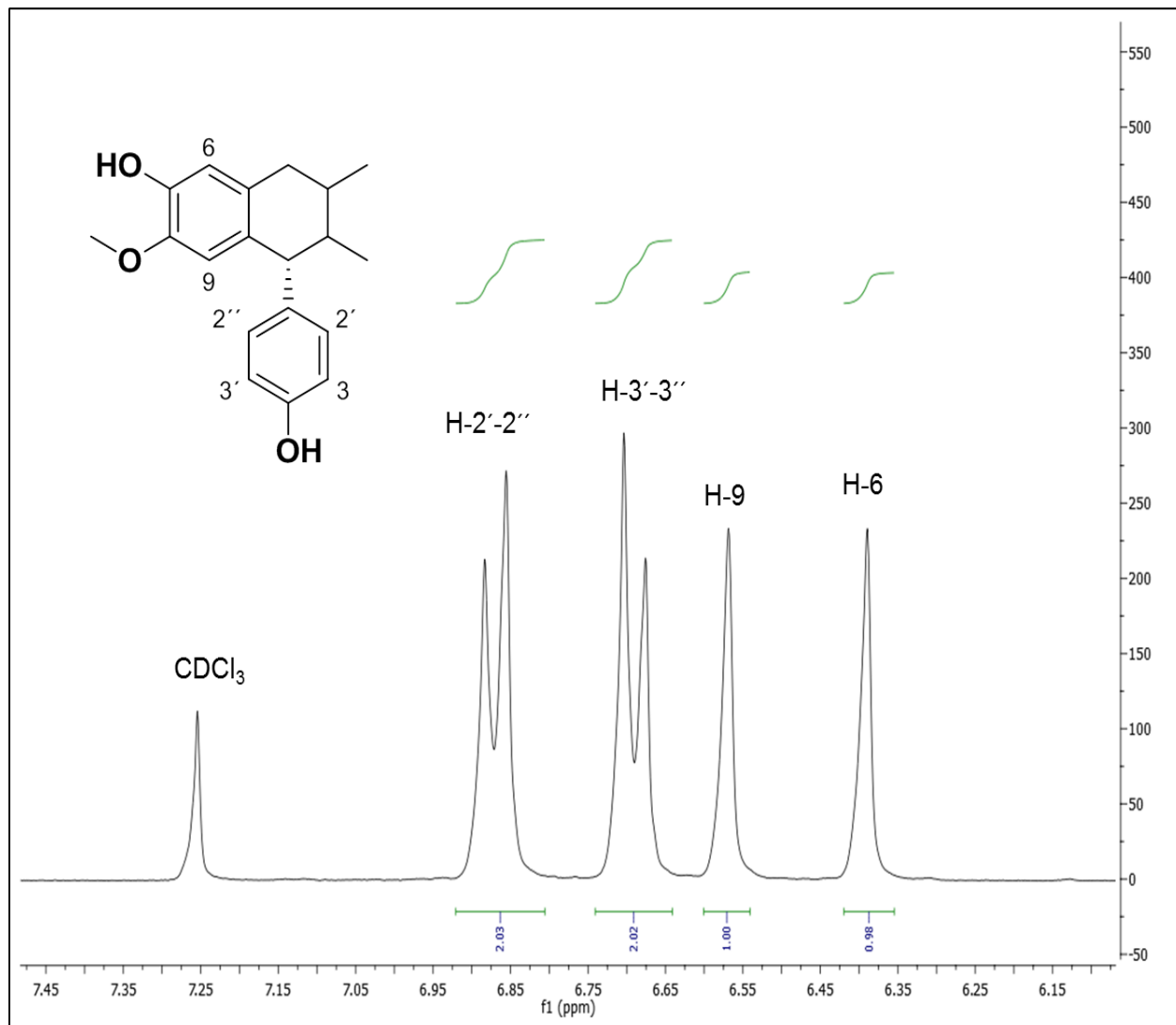


Figura 9. Ampliación de la región aromática para el compuesto (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1).

En la siguiente ampliación del espectro, se puede apreciar con más detalle en 3.86 ppm una señal simple que integra para tres protones correspondientes al grupo metoxilo del anillo aromático. Después de esta señal se observa una señal doble en 3.62 ppm y con una constante de acoplamiento de 6 Hz que integra para el CH de la posición 1 del anillo de ciclohexano; en 2.88 ppm se observa dos señales dobles de dobles para el CH₂ de la posición 4; de 2.09 a 1.84 ppm se observa una señal compleja para los protones ubicados en las posiciones 2 y 3 del ciclohexano y finalmente a campo más alto en 0.89 ppm se observa de manera sobrepuesta dos señales simples que integran para 6 protones de los dos CH₃ ubicados en las posiciones 2 y 3.

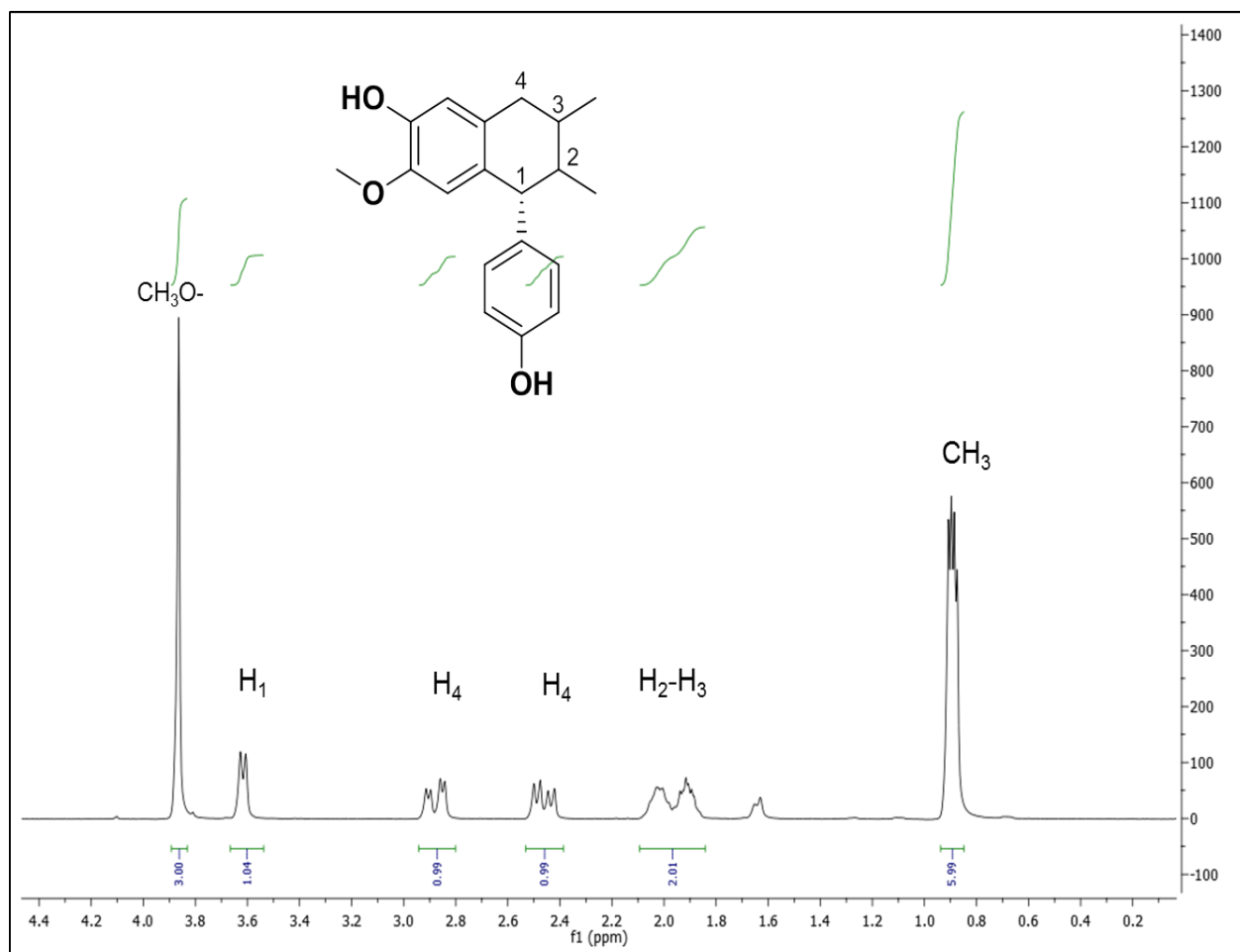
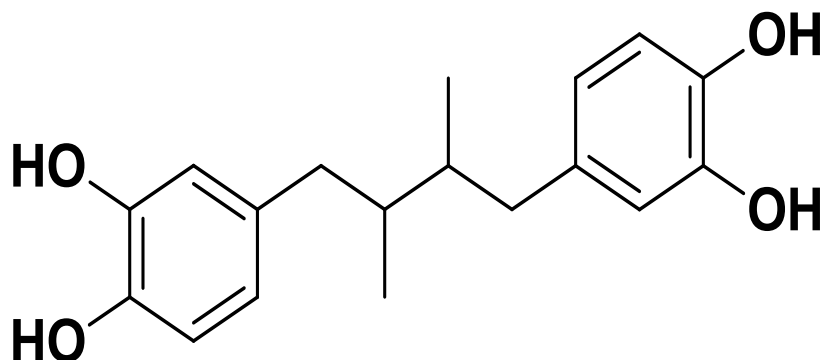


Figura 10. Ampliación de la región a campo alto para el compuesto (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1).

Con el análisis de las señales anteriores, se puede confirmar la estructura propuesta para la molécula mencionada.

6.2.2 Compuesto 2: 4 4'-(2,3-dimetillbutano-1,4-diil)dibenzeno-1,2-diol



Nombre IUPAC: 4 4'-(2,3-dimetillbutano-1,4-diil)dibenzeno-1,2-diol

Nombre genérico: Ácido Nordihidroguayarético (NDGA).

Fórmula molecular: $C_{18}H_{22}O_4$

Masa molecular: 302.36 g/mol.

m/z: 302.15 (100.0%), 303.16 (19.9%), 304.16 (2.7%).

Análisis elemental: C, 71.50; H, 7.33; O, 21.17

Punto de fusión: 184°C.

Disolvente: Acetona.

Fase de elución: 6:4 (hexano: acetato de etilo).

Características físicas: Sólido refinado de color amarillo pálido.

En la figura 11 se puede observar el espectro de protón para la molécula 4 4'-(2,3-dimetillbutano-1,4-diil) dibenzeno-1,2-diol correspondiente al compuesto 2, en donde se aprecia a campo bajo en 8.63 ppm un singulete ancho que integra para 4 protones, los cuales corresponden a las señales de los 4 grupos hidroxilo en las posiciones 7, 8, 21 y 22. En la región aromática se observan los tres grupos de señales: dos señales simples en 6.63 y 6.60 ppm que corresponden a los protones aromáticos de las posiciones 6 y 16; en 6.52 y 6.38 ppm dos señales dobles de dobles correspondientes a los protones aromáticos 3, 4, 19 y 20. En campo alto se puede observar dos señales dobles de dobles que integran para 2 protones respectivamente y que identifican a los dos grupos CH_2 9 y 12; y un cuarteto en 1.6 ppm que integra para 2 protones de los grupos CH en las posiciones 10 y 11. Finalmente se encuentran dos singuletes en 0.75 y 0.73 ppm que integran para 3 protones cada una, respectivas a los dos CH_3 de las posiciones 13 y 14.

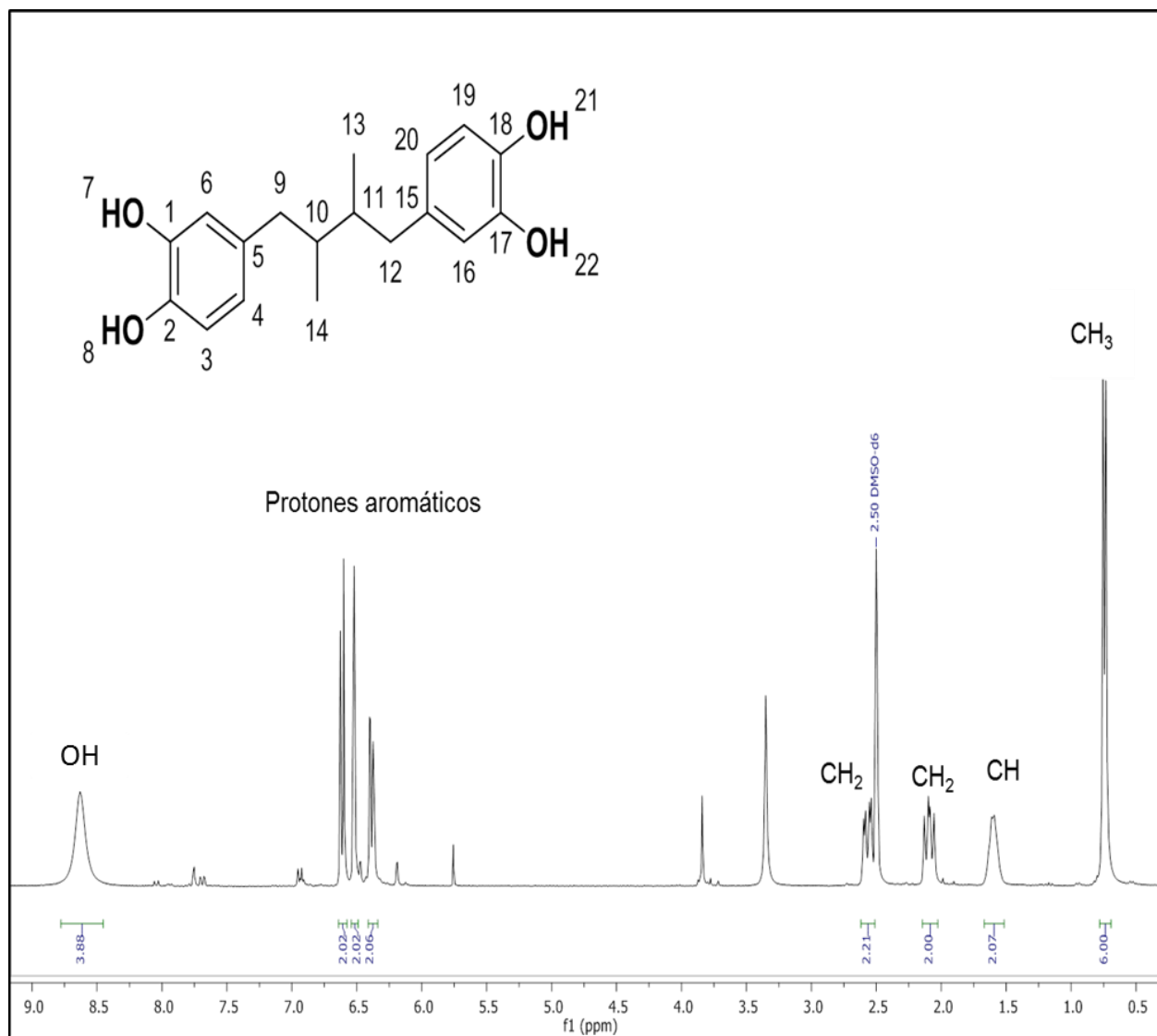
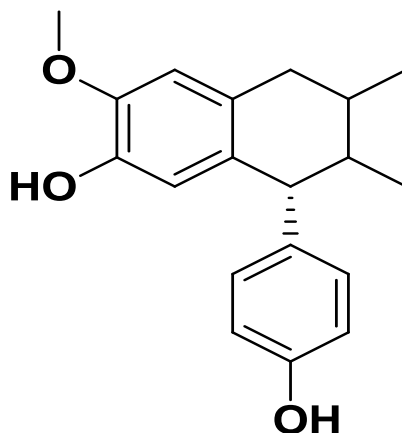


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz en CDCl_3) para la molécula 4,4'-(2,3-dimetilbutano-1,4-diil)dibenzene-1,2-diol (compuesto 2).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.84 (s, 3H), 4.60 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 16.2, 5.0$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 16.2, 7.1$ Hz, 1H), 3.54 – 3.46 (m, 2H), 1.94 (m, 6H).

6.2.3 Compuesto 3: (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol



Nombre IUPAC:

(8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol

Fórmula molecular: $C_{19}H_{22}O_3$

Masa molecular: 298.16 g/mol.

m/z: 298.16 (100.0%), 299.16 (20.9%), 300.16 (2.6%).

Análisis elemental: C, 76.48; H, 7.43; O, 16.09

Punto de fusión: 144°C.

Disolvente: Diclorometano.

Fase de elución: 7:3 (hexano: acetato de etilo).

Características físicas: Sólido fino color blanco.

En la figura 12 se muestra el espectro de protón para el compuesto (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 3) que corresponde al isómero de la estructura de la figura 8, en donde solo cambia el grupo metoxilo de la posición 8 a la posición 7. Como se muestra, se observa un mismo patrón en las señales para dicho compuesto. A campo bajo se observa el sistema AA'-BB' característico del anillo aromático 1,4-disustituido, así mismo dos señales simples, una en 7.72 ppm y otra en 7.26 ppm que corresponden a los protones aromáticos de las posiciones 6 y 9. También se observa el singulete característico en 4.84 ppm base de oxígeno que corresponde al grupo metoxilo de la posición 7. Después se aprecia el conjunto de señales al igual que en el espectro anterior que caracterizan a los protones del anillo de ciclohexano en las posiciones 1 como una señal doble en 4.6 ppm, un doble de dobles para el CH₂ ubicado en la posición 4, y dos grupos de señales complejas entre 3.54 y 3.46 ppm que corresponden a los protones de las posiciones 2 y 3. Finalmente a campo más alto en 1.94 ppm se observa un conjunto de señales que integran para los 6 protones correspondientes a los dos CH₃ ubicados en las posiciones 13 y 14.

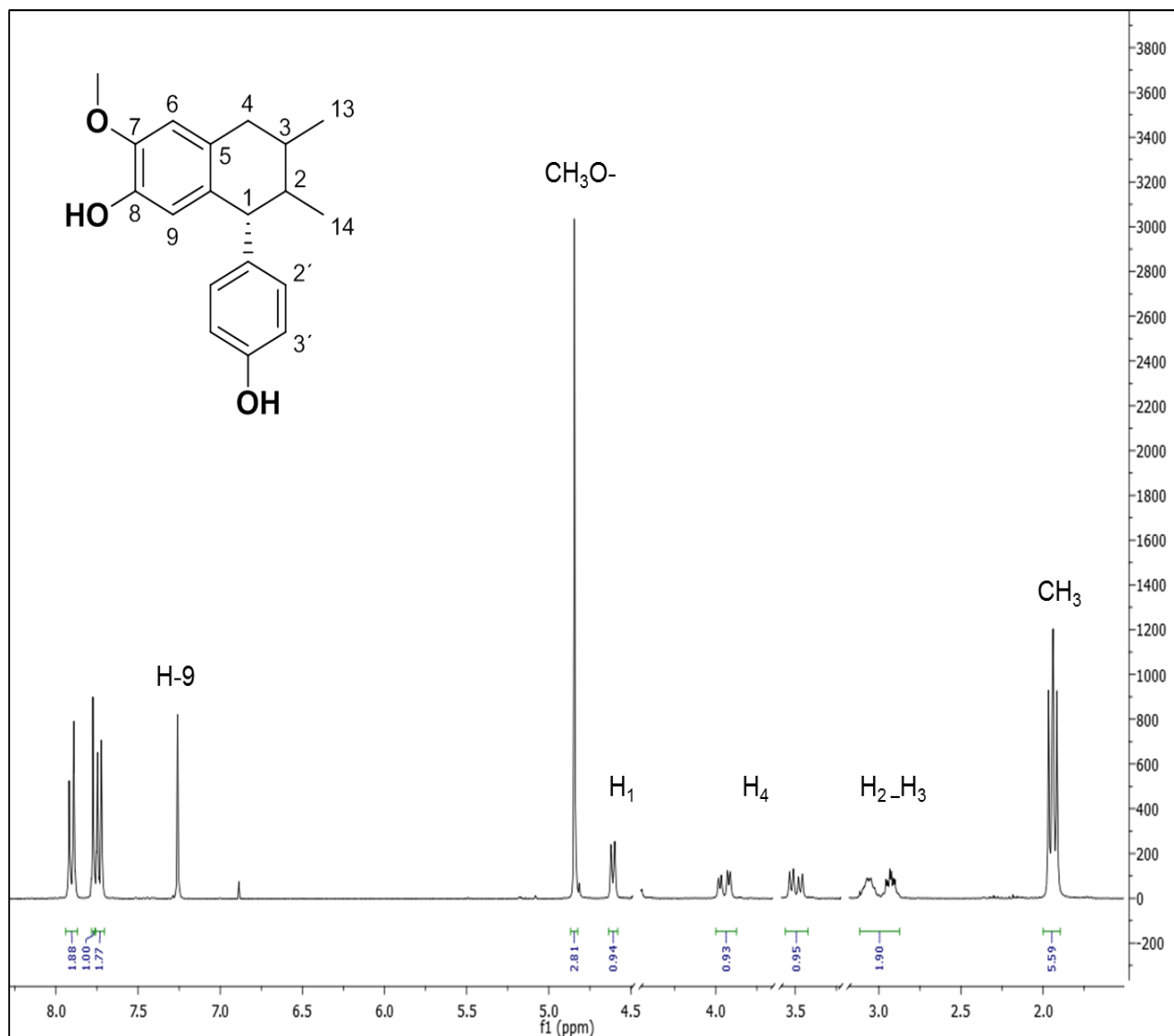
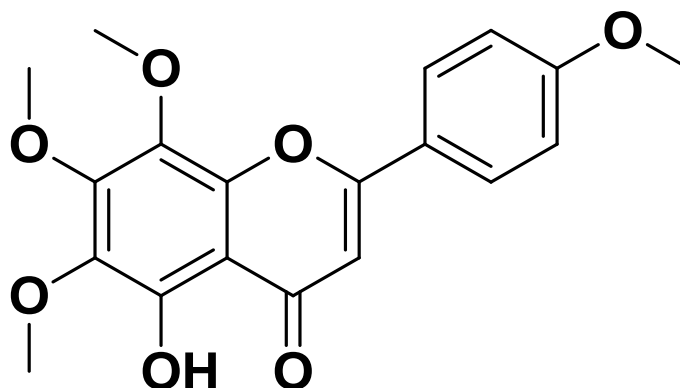


Figura 12. Espectro de RMN ^1H (300 MHz en CDCl_3) para la molécula (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.84 (s, 3H), 4.60 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 16.2, 5.0$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 16.2, 7.1$ Hz, 1H), 3.54 – 3.46 (m, 2H), 1.94 (m, 6H).

6.2.4 Compuesto 4: 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona



Nombre IUPAC: 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona

Fórmula molecular: $C_{19}H_{18}O_7$

Masa molecular: 358.11 g/mol.

m/z: 358.11 (100.0%), 359.11 (21.0%), 360.11 (3.5%).

Análisis elemental: C, 63.68; H, 5.06; O, 31.25

Punto de fusión: 194°C.

Disolvente: acetona.

Fase de elución: 6:4 (hexano: acetato de etilo).

Características físicas: sólido fino color amarillo cadmio.

En el siguiente espectro, se muestran las señales para el compuesto 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 4), característico de una flavona tetrasustituida en el anillo aromático (anillo A) y con un sistema parasustituido en el anillo aromático C.

A campo bajo en la región de los protones aromáticos se observa el sistema característico AA'-BB' para el anillo C disustituido en posición 1,4. En 8.02 ppm se observa una señal doble que integra para los dos protones H_2 y H_2' , así mismo se aprecia la otra señal doble del sistema aromático en 6.97 ppm que integra para los otros dos protones H_3 y H_3' ; en 6.55 ppm se encuentra un singulete que integra para el protón vinílico H_1 del anillo B de la flavona. Finalmente, en campo alto se encuentran cuatro señales simples que se superponen entre sí de 3.92 a 3.75 ppm, que integran para 12 protones correspondientes a los 4 grupos metoxilo que sustituyen a la flavona.

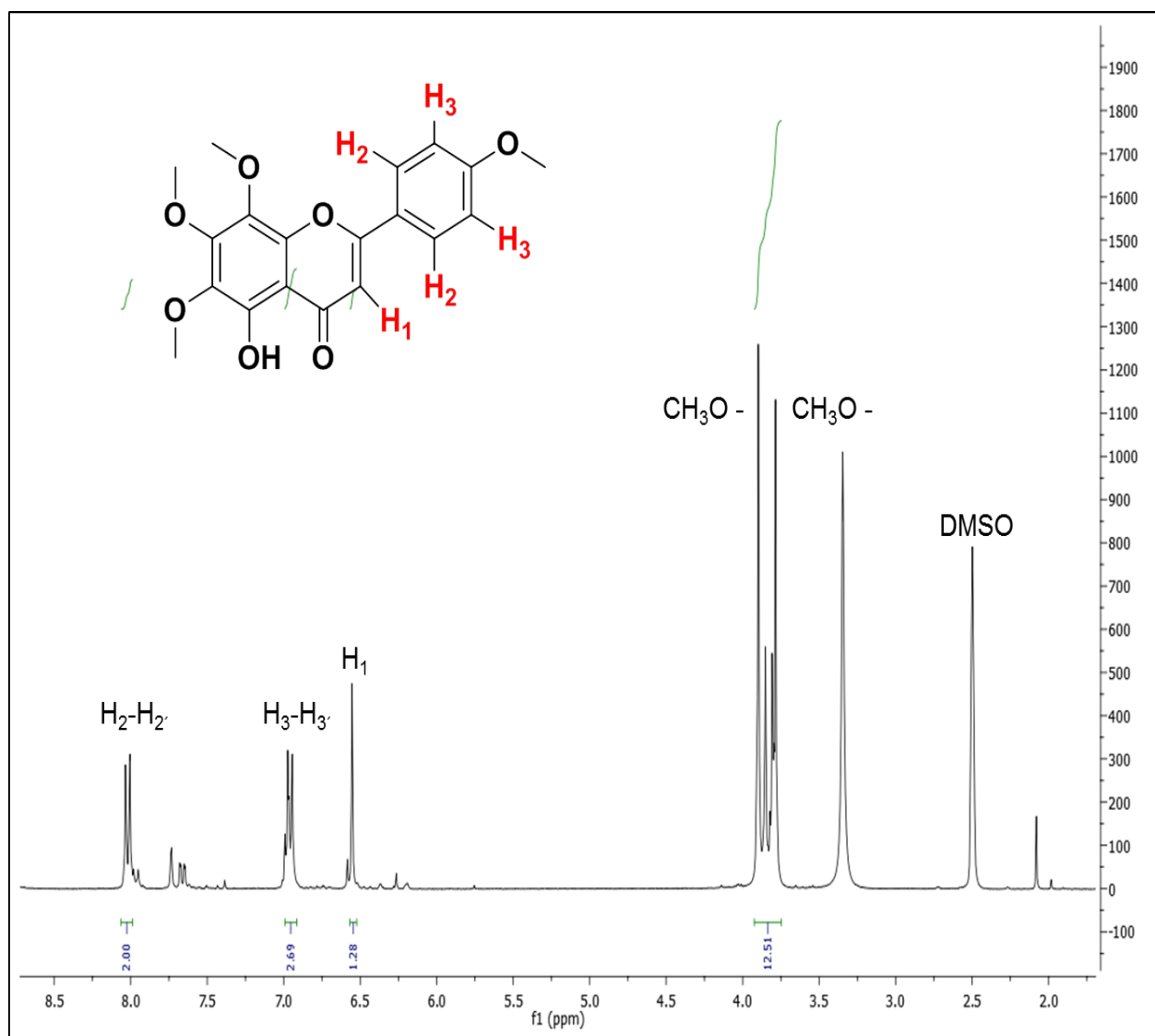
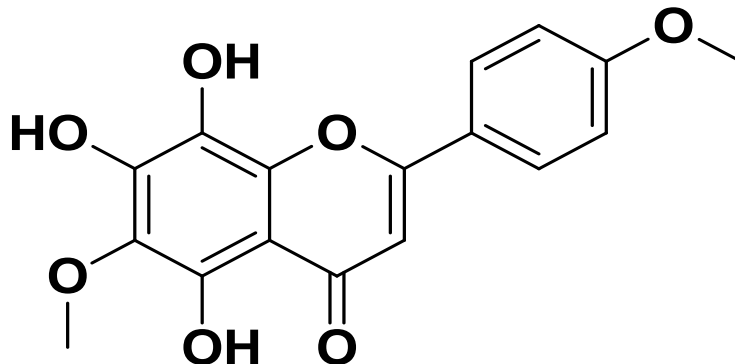


Figura 13. Espectro de RMN ¹H (300 MHz en DMSO-*d*₆) para la molécula 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 4).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 6.55 (s, 2H), 3.92 – 3.75 (m, 12H).

6.2.5 Compuesto 5: 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona



Nombre IUPAC: 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona

Fórmula molecular: $C_{17}H_{14}O_7$

Masa molecular: 330.07 g/mol.

m/z: 330.07 (100.0%), 331.08 (18.8%), 332.08 (3.1%).

Análisis elemental: C, 61.82; H, 4.27; O, 33.91

Punto de fusión: 262°C.

Disolvente: Acetona.

Fase de elución: 6:4 (hexano: acetato de etilo).

Características físicas: Sólido fino color amarillo naranja.

Al igual que la estructura anterior, el espectro de la figura 14, muestra las señales características para una flavona trihidroxilada en el anillo A y con un patrón de sustitución 1,4 en el anillo C. En 8.02 ppm se encuentra una señal doble que integra para los dos protones aromáticos H_2 y H_2' del anillo C; en 6.96 ppm se observa la otra señal doble que integra para los dos protones aromáticos H_3 y H_3' del sistema AA'-BB'; en 6.64 ppm se observa un singulete que corresponde al protón vinílico H_1 del anillo B; finalmente a campo alto en 3.9 y 3.78 ppm se encuentran dos señales simples que integran para 3 protones cada una, correspondientes a los dos metoxilos del anillo A y C de la flavona.

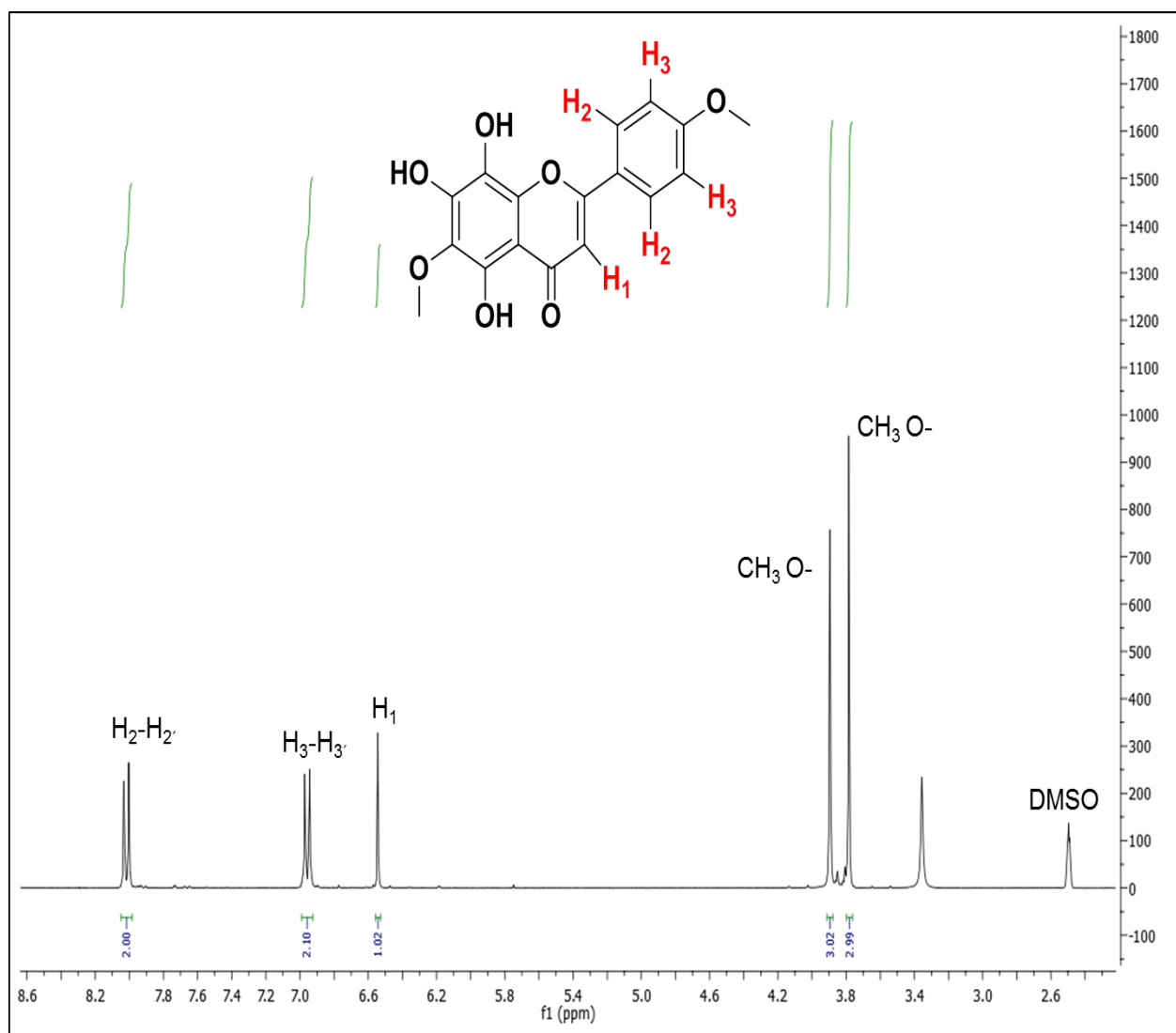
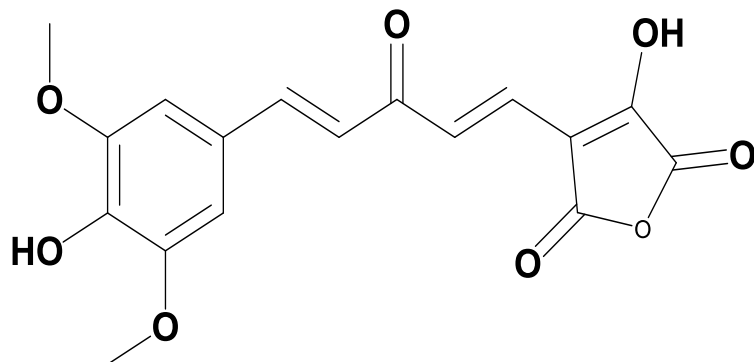


Figura 14. Espectro de RMN ¹H (300 MHz en DMSO-*d*₆) de la molécula 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 5).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.78 (s, 3H).

6.2.6 Compuesto 6: 3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il) furan-2,5-diona.



Nombre IUPAC:

3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il)furan-2,5-diona.

Fórmula química: $C_{17}H_{14}O_8$

Masa molecular: 346.29 g/mol.

m/z: 346.07 (100.0%), 347.07 (18.7%), 348.08 (1.7%), 348.07 (1.6%)

Análisis elemental: C, 58.96; H, 4.08; O, 36.96

Punto de fusión: 225°C.

Disolvente: Acetona.

Fase de elución: 6:4 (hexano: acetato de etilo).

Características físicas: Sólido fino color blancuzco.

En la figura 15 se puede observar el espectro de protón para la molécula 3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il)furan-2,5-diona correspondiente al compuesto 6, en él se observa un singulete en 3.78 ppm que integra para 6 y que corresponde a la señales de los metoxilos 1 y 3 del anillo aromático, además se muestra un singulete en 6.82ppm correspondientes a los protones de la posición 6 y 4 de la molécula en curso.

También se logran apreciar dos señales dobles (dobletes) características de dobles enlaces α , β -insaturados a 5.04 y 4.71ppm que hacen referencia a las señales de las posiciones 12 y 13, respectivamente. Del mismo modo se observan otras dos señales de dobles de vinilo α , β -insaturado en 5.88 y 5.92ppm propias de las posiciones 16 y 17. Finalmente se observa la señal desplazada a campo bajo del singulete a 11.94ppm característica de un grupo enol en la posición 22.

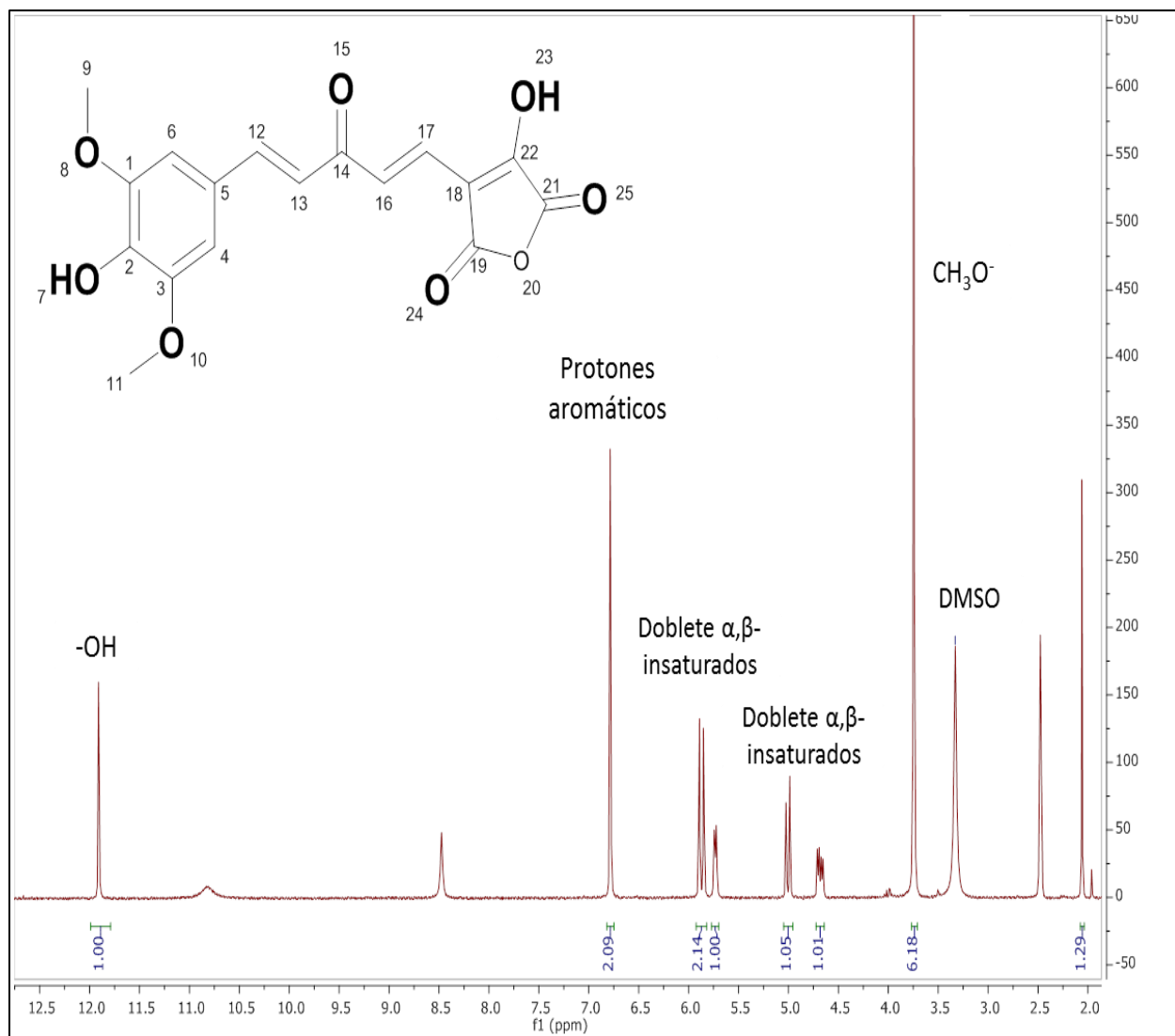


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz en $\text{DMSO-}d_6$) de la molécula 3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il)furan-2,5-diona (compuesto 6).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.94 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 5.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 5.88 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.04 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 3.78 (s, 6H) .

6.3 Efecto del EAcOEt y de los metabolitos secundarios obtenidos de *L. tridentata* sobre *P. aeruginosa*.

6.3.1 Efecto sobre el crecimiento de las cepas PA14 y PA64

Se evaluó el efecto que tiene el extracto de acetato de etilo (EAcOEt) y los compuestos purificados obtenidos de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento de PA14 (cepa silvestre) y PA64 (cepa farmacorresistente) de *P. aeruginosa*.

Para el caso de los tratamientos de crecimiento bajo C-30, se hicieron mediciones a 50 μM , 10 μM y 1 μM , respectivamente, debido a que a concentraciones de 100 y 75 μM , C-30 tiene efecto bactericida y citotóxica, por lo que para este control se cuantificó a 1, 10 y 50 μM (en lugar de 100 μM) para todos los tratamientos (Figura 16).

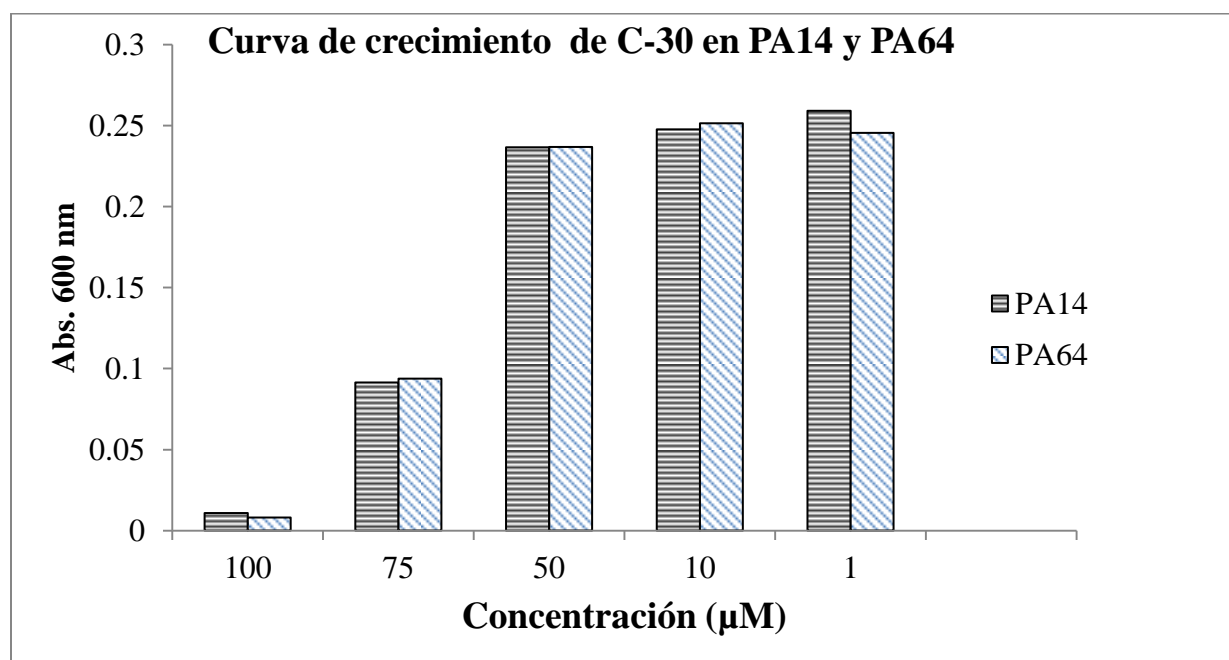


Figura 16. Efecto de C-30 sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. La imagen muestra el efecto de C-30 sobre el crecimiento para las cepas PA14 y PA64d de *P. aeruginosa* después de 24h de incubación a 37°C a concentraciones de 100, 75, 50, 10 y 1 μM . En las concentraciones de 100 y 75 μM , C-30 tiene efecto bactericida. A 50, 10 y 1 μM , C-30 no tiene ningún efecto sobre el crecimiento.

En figura 16.1 se puede observar que los controles de DMSO (disolvente para los metabolitos y el extracto), y C-30 (control positivo), así como los tratamientos de (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1), el 4,4'-(2,3-Dimetilbutano-1,4-diil)dibenceno-1,2-diol (NDGA) que corresponde al compuesto 2, el (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 3), el 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona que corresponde al compuesto 4, el 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 5), el 3-hidroxi-4-((1E,4E)-5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-oxopenta-1,4-dien-1-il)furan-2,5-diona (compuesto 6) y extracto de AcOEt, no tienen efecto significativo sobre el crecimiento de las cepas control (sin tratamiento) PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*.

En el anexo 10.2 se encuentra la tabla 8.2 en donde se observó que estos compuestos no tiene efecto significativo sobre el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa*, además se puede observar la media aritmética, la desviación estándar de todos estos valores.

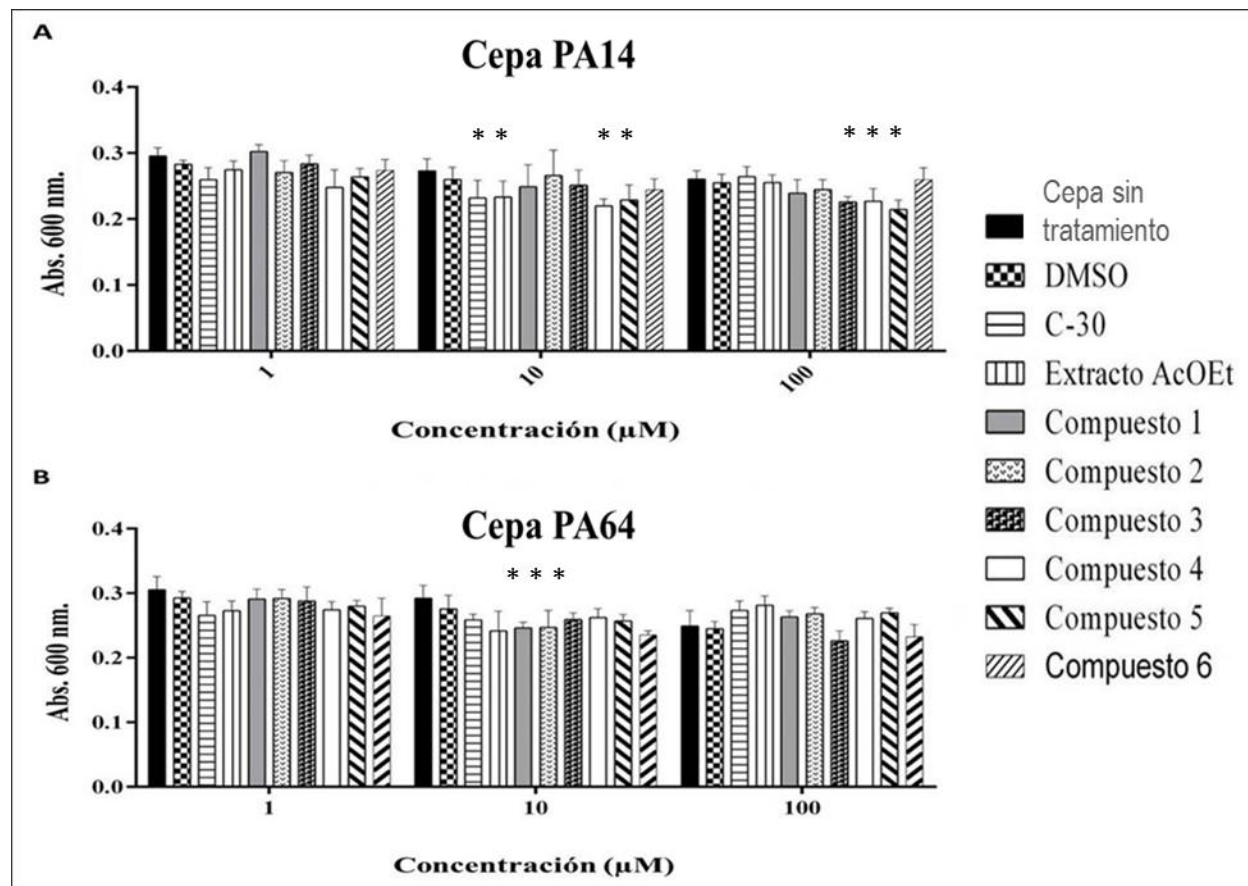


Figura 16.1 Crecimiento de *P. aeruginosa* en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto de AcOEt de *L. tridentata*. La imagen muestra el crecimiento después de 24h de incubación a 37°C de las cepas PA 14 (A) y PA64 (B) bajo cada tratamiento a diferentes concentraciones 1,10 y 100 μ M, para C-30 1,10 y 50 μ M, respectivamente y el extracto bioactivo de AcOEt a 100 mg/mL. Los valores del crecimiento se determinaron a una longitud de onda de 600nm.* Disminuyen ligeramente el crecimiento

6.3.2. Efecto de los metabolitos secundarios purificados y del extracto bioactivo de EAcOEt *L. tridentata* sobre la producción de factores de virulencia (elastasa, proteasa alcalina y pocianina) en la cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*.

Se evaluó el efecto que tienen los metabolitos secundarios purificados y el extracto de acetato de etilo obtenidos de *Larrea tridentata* sobre la producción de factores de virulencia tales como la elastasa, proteasa alcalina y pocianina de las cepas PA14 y PA64 como posibles inhibidores del sistema de percepción de quórum en *P. aeruginosa*.

De los tratamientos realizados en la cepa PA14, solo los tratamientos con EAcOEt y el compuesto 4 disminuyeron significativamente (aproximadamente 12 y 14 % menos, respectivamente) la producción de elastasa en relación a la cepa sin tratamiento en concentraciones de 10 μ M. Para las concentraciones de 100 μ M, solo los compuestos 2 y 3 disminuyeron significativamente (\approx 17 y 21%, respectivamente) la producción de elastasa en relación a la cepa sin tratamiento. Mientras que para la cepa PA64, solo en concentraciones de 100 μ M el EAcOEt y el compuesto 6 disminuyeron significativamente la producción de elastasa (\approx 28 y 29% menos, respectivamente) en relación a la producción de elastasa de la cepa sin tratamiento.

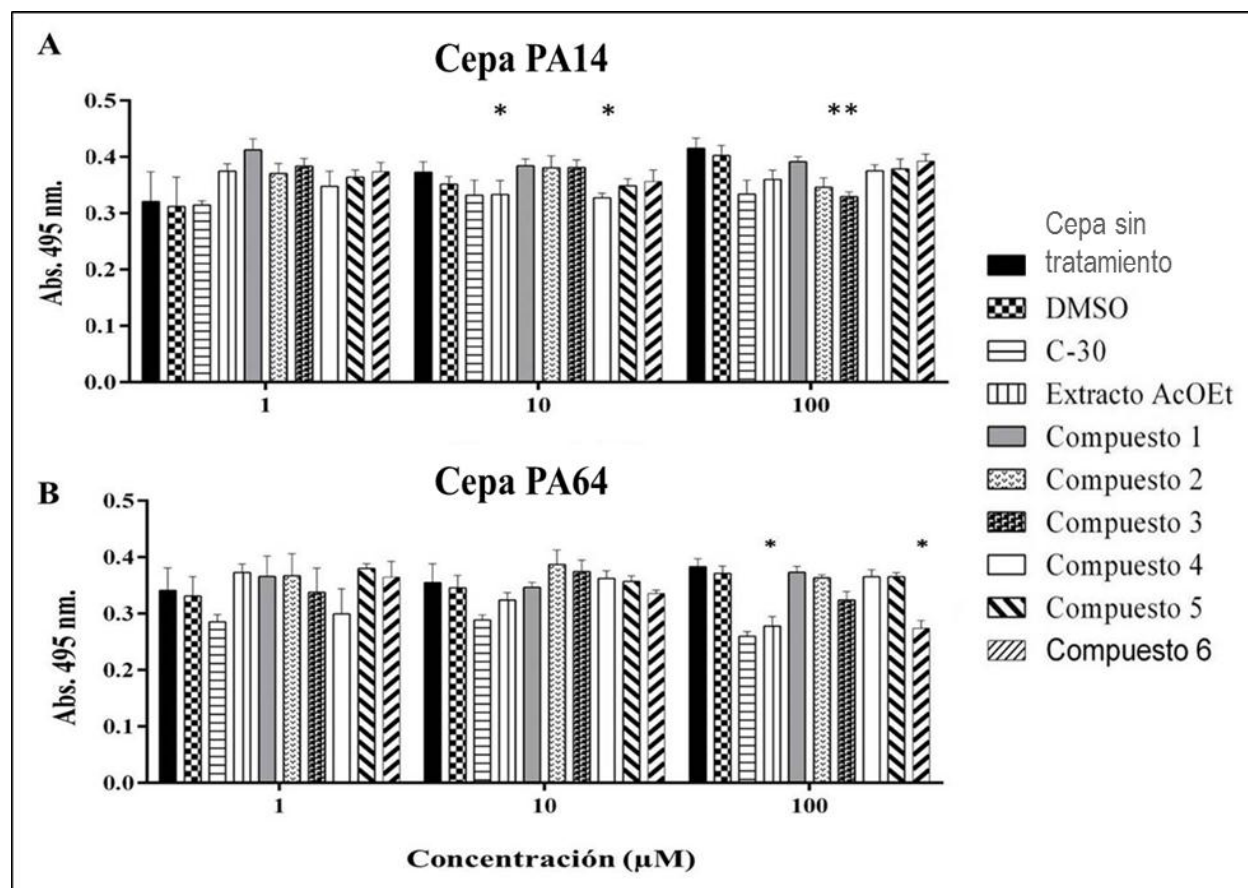


Figura 17. Producción de elastasa por *P. aeruginosa* en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. La imagen muestra la cuantificación de los niveles de elastasa producidas por las cepas PA 14 (A) y PA64 (B) en respuesta a diferentes concentraciones (1,10, 100 μ M y 100 mg/mL) de metabolitos secundarios purificados y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. Los niveles de elastasa se determinaron a una D.O de 495nm.

* Valores estadísticamente significativos. ANOVA más prueba de Dunnet $\alpha=0.05$.

En el anexo 10.3 (tabla 8.3) se muestran los valores de la producción de elastasa con sus respectivas media aritmética y desviación estándar. Mientras que en el anexo 10.6, figura 16.2 (C-D) se muestran las gráficas correspondientes al análisis de la prueba Dunnet $\alpha=0.05$ que resume estadísticamente la producción relativa de elastasa respecto a la control positivo de las cepas de referencia (C-30).

La figura 18 se muestra el efecto que tienen los metabolitos secundarios purificados y el EAcOEt obtenidos de *L. tridentata* sobre la producción de proteasa alcalina en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*.

De los tratamientos realizados en la cepa PA14, se puede observar que el tratamiento con el compuesto 3 a 100 μM disminuye significativamente (aproximadamente 25% menos) la producción de proteasa alcalina en relación a la cepa sin tratamiento.

En la cepa PA64, el compuesto 3 a 100 μM , fue el único tratamiento que tuvo efecto sobre la producción de proteasa alcalina, disminuyendo significativamente la producción de proteasa ($\approx 19\%$ menos) en relación a la producción de proteasa alcalina a la cepa sin tratamiento. Estos resultados también indican que los compuestos purificados restantes no tienen ningún efecto reductor sobre la producción de proteasa, sino lo contrario, aumentan la producción de proteasa alcalina en relación a la cepa sin tratamiento en las tres concentraciones (1, 10 y 100 μM).

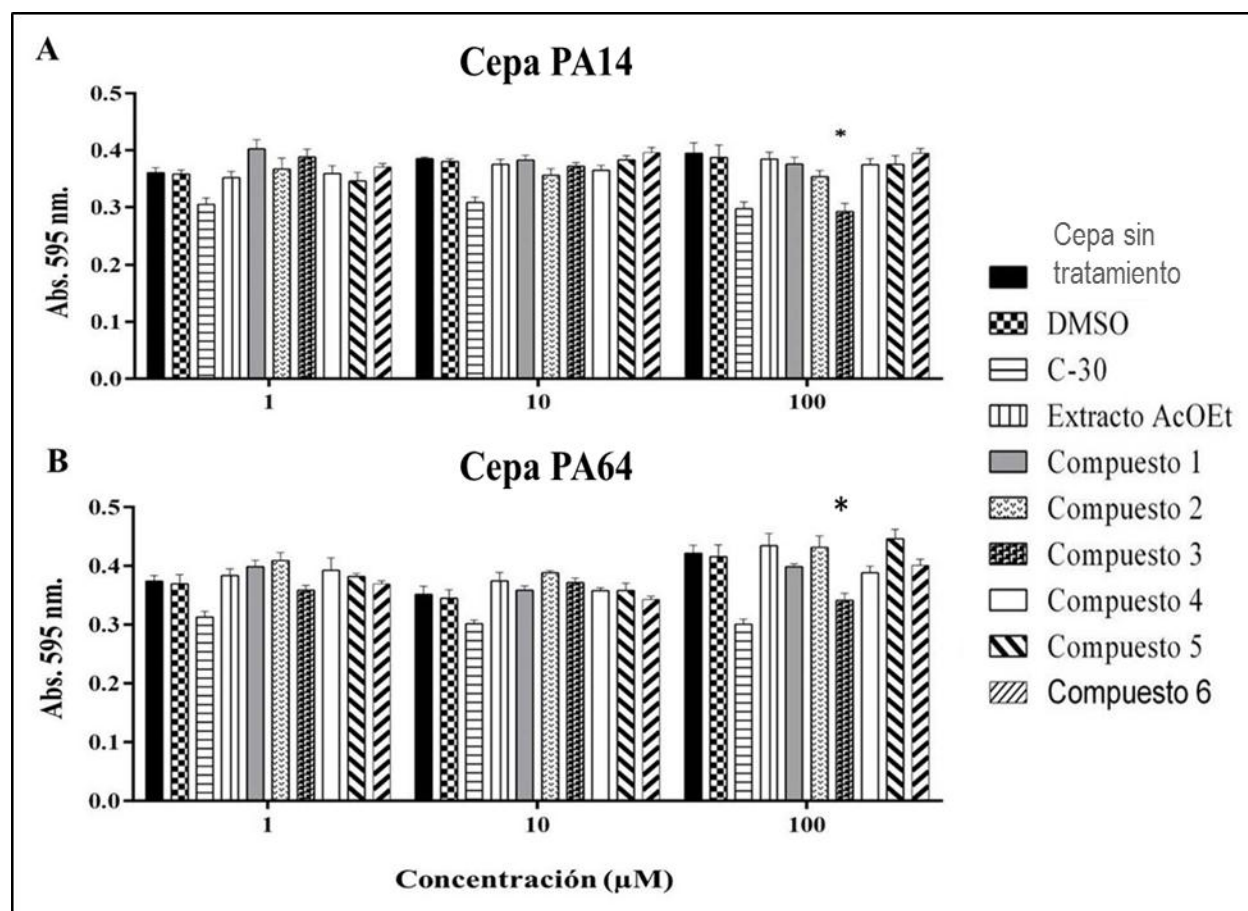


Figura 18. Producción de proteasa por *P. aeruginosa* en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. La imagen muestra la cuantificación de los niveles de proteasa alcalina producidas por las cepas PA 14 (A) y PA64 (B) en respuesta a diferentes concentraciones (1, 10, 100 μM y 100 mg/mL) de metabolitos secundarios purificados y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. Los niveles de proteasa alcalina se determinaron a una D.O de 595nm. * Valores estadísticamente significativos. ANOVA más prueba de Dunnet $\alpha = 0.05$

En el anexo 10.4 (tabla 8.4) se muestran los valores de la producción de proteasa alcalina con sus respectiva media aritmética y desviación estándar. Mientras que en el anexo 10.6 figura 16.2 (A-B) se muestran las gráficas correspondientes al análisis de la prueba Dunnet $\alpha=0.05$ que resume estadísticamente la producción relativa de proteasa alcalina respecto a la control positivo de las cepas de referencia (C-30).

La figura 19 muestra el efecto que tienen los metabolitos secundarios purificados y el EAcOEt obtenidos de *L. tridentata* sobre la producción de piocianina en las cepas PA14 y PA64 de *Pseudomonas aeruginosa*. Y a partir de los tratamientos realizados en la cepa PA14, se observa que los compuestos purificados tuvieron afinidad hacia la reducción en la producción de piocianina. Ya que los tratamientos de los compuestos 1,2 y 4 y el EAcOEt a 10 μM mostraron reducción significativa en la producción de piocianina (aproximadamente 34, 37, 41 y 35% menos, respectivamente) en función a la producción de piocianina de la cepa sin tratamiento. Del mismo modo, los tratamientos de los compuestos 1, 2, 3, 4, 6 y el EAcOEt en concentraciones de 100 μM indicaron reducción significativa en la producción de piocianina (\approx 34, 37, 39, 41, 35 y 57% menos, respectivamente) en comparación a la producción de piocianina de la cepa sin tratamiento.

Para la cepa PA64, los tratamientos de los compuestos 1 y 6 a 1 μM se observa que redujeron significativamente la producción de piocianina (25 % menos) para las dos cepas (PA14 y PA64) en relación a la producción de piocianina de la cepa sin tratamiento. En tratamientos a 10 μM , los compuestos 5 y 6 mostraron también reducción significativa en la producción de piocianina (\approx 12 y 20% menos, respectivamente) en comparación a la producción de piocianina de la cepa sin tratamiento. Finalmente, en los tratamientos a 100 μM , el EAcOEt y todos los compuestos purificados (1, 2, 3, 4, 5 y 6) mostraron una tendencia reductiva en la producción de piocianina (\approx 36, 34, 38, 39, 41, 38 y 57% menos, respectivamente) en relación a la producción de piocianina de la cepa sin tratamiento.

En el anexo 10.5 (tabla 8.5) se muestran los valores de la producción de piocianina con sus respectivas media aritmética y desviación estándar. Mientras que en el anexo 10.6, figura 16.2 (E-F) se muestran las gráficas correspondientes al análisis de la prueba Dunnet $\alpha=0.05$ que resume estadísticamente la producción relativa de piocianina respecto a la control positivo de las cepas de referencia (C-30).

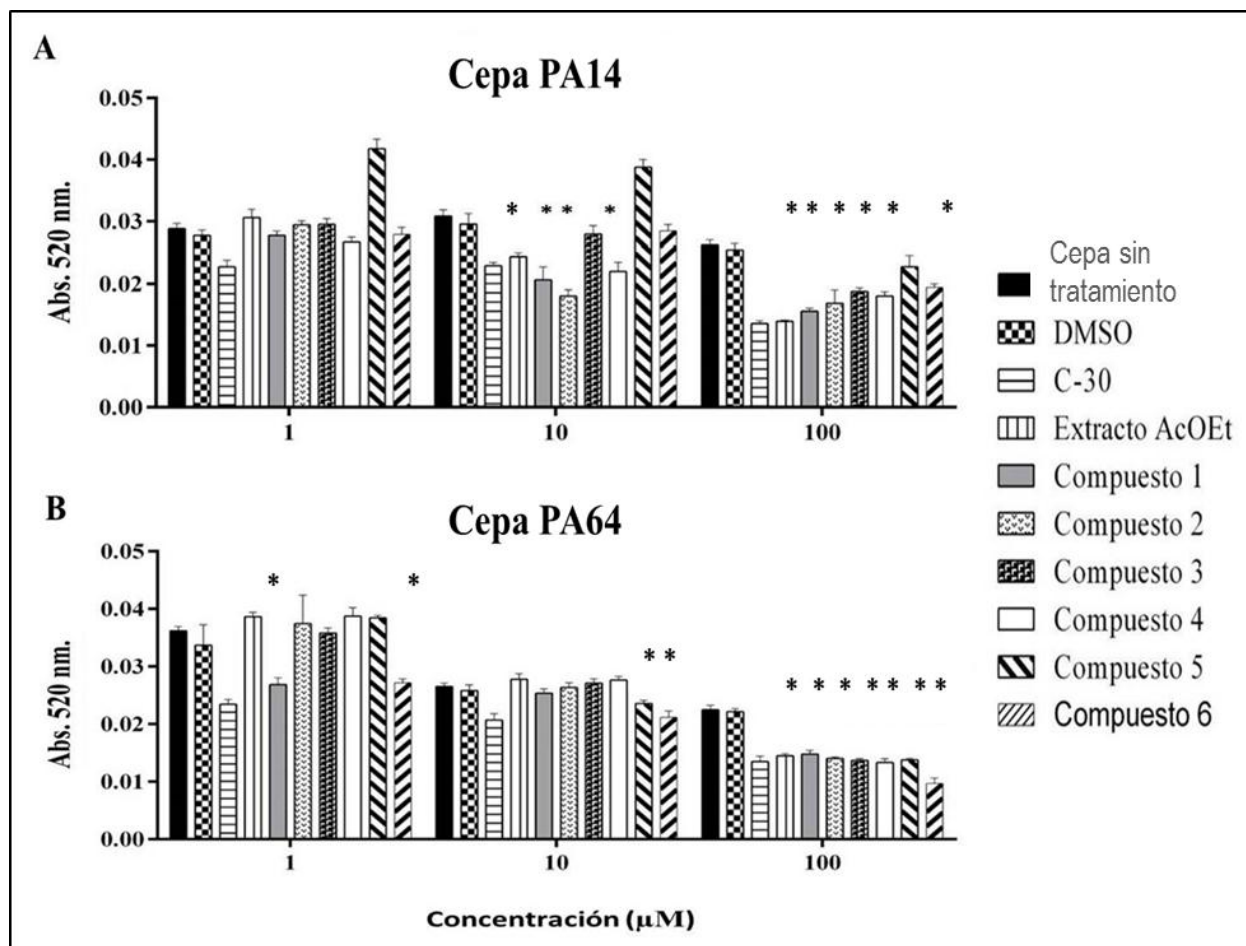


Figura 19. Producción de piocianina por *P. aeruginosa* en respuesta a metabolitos secundarios y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. La imagen muestra la cuantificación de los niveles de piocianina producidas por las cepas PA 14 (A) y PA64 (B) en respuesta a diferentes concentraciones (1,10, 100 μM y 100 mg/mL) de metabolitos secundarios purificados y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. Los niveles de piocianina se determinaron a una D.O de 520nm. * Valores estadísticamente significativos. ANOVA más prueba de Dunnet $\alpha = 0.05$

La tabla 8 resume el efecto que tuvieron los compuestos purificados y el EAcOEt obtenidos de *L. tridentata* en diferentes concentraciones (100, 10, 1μM, y 100 mg/mL) sobre el crecimiento y la producción de factores de virulencia (elastasa, proteasa alcalina y piocianina) en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*. La insignia * representa aquellos valores que tuvieron efecto moderado en la disminución del crecimiento y la producción de factores de virulencia. La insignia *** representa aquellos valores que tuvieron un efecto significativo en la disminución del crecimiento y la producción de factores de virulencia.

Tabla 8. Efecto de los compuestos purificados y el EAcOEt obtenidos de *L. tridentata* sobre el crecimiento y la producción de factores de virulencia en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*.

No. Compuesto	Cepa	Crecimiento			Elastasa			Proteasa			Piocianina		
		1µM	10 µM	100 µM	1 µM	10 µM	100 µM	1 µM	10 µM	100µM	1 µM	10 µM	100µM
Compuesto 1	PA14											***	***
	PA 64		*								***	*	***
Compuesto 2	PA14						*					***	***
	PA64		*										***
Compuesto 3	PA14			*			***	*		***			***
	PA64						*			***			***
Compuesto 4	PA14		*	*		*						*	***
	PA64					*							***
Compuesto 5	PA14			*									
	PA64											*	***
Compuesto 6	PA14										**		***
	PA64						***					*	***
Extracto AcoEt	PA14		*			*						*	***
	PA64		*			*	***						***
C-30 (1,10 y 50 µM)	PA14		*			*	***		*	***	*	*	***
	PA64				*	*	***	*	*	***	***	*	***
DMSO	PA14												
	PA64												

SN/ No significativa

* Efecto significativa

*** Efecto altamente significativa

6.3.3 Efecto de los metabolitos secundarios y el EAcOEt de *L. tridentata* sobre la expresión de genes regulados por sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa*.

La figura 20 muestra la integridad de los RNAs extraídos de las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*, indicando que los RNAs no se degradaron y se mantuvieron en buena calidad para las pruebas de PCR.

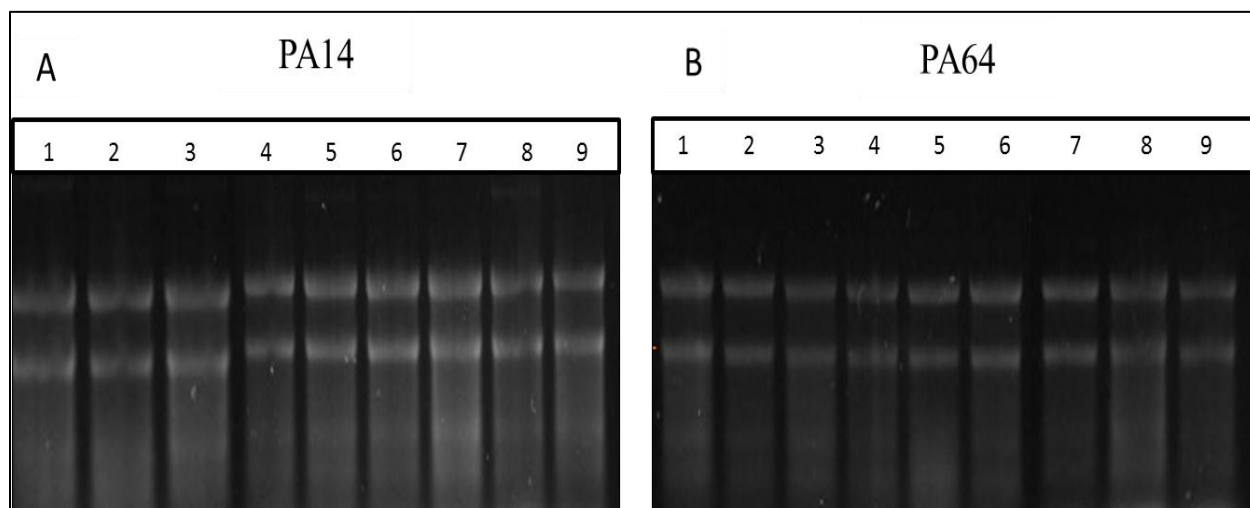


Figura 20. Integridad de los RNAs extraídos de la cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas con metabolitos y un extracto bioactivo de *L. tridentata*. En la figura se observa la integridad de los RNAs correspondientes a las cepas PA14 (A) y PA64 (B) corridas en geles de agarosa mediante electroforesis. Las bandas que se observan corresponden a las subunidades mayor y menor del RNA ribosomal. Los números 1,2,3,4,5 y 6 corresponden a los tratamientos por cada metabolito secundario de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6), el número 7, 8 y 9 corresponde al tratamiento por el EAcOEt, la furanona C-30 y la cepas sin ningún tratamiento, respectivamente.

La expresión de los genes del sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa* fueron analizados en las cepas PA14 y PA64 tratadas con metabolitos secundarios y un extracto de *L. tridentata*. Se eligieron los tratamientos en respuesta a una concentración de 100 μ M de dichos compuestos debido a que en esa concentración se observó una mayor disminución en la producción de factores de virulencia (figura 17,18 y 19). El dimetilsulfóxido (DMSO) se utilizó como disolvente de los metabolitos secundarios y no alteró el crecimiento ni la producción de factores de virulencia en ninguno de los tratamientos.

De manera general, los resultados mostraron una regulación diferencial en la expresión de los genes de los factores de virulencia y del sistema de percepción de quórum en ambas cepas de *P. aeruginosa*. Se usó la secuencia del gen RNA ribosomal (16s rRNA) como marcadores de expresión constitutivo en reacciones de PCR, debido a que estas regiones están perfectamente conservadas y su tasa de evolución es muy baja (122), productos de sus regiones hipervariables (123), además de que son secuencias que no están reguladas por la percepción de quórum.

En la figura 21 se muestra la amplificación del gen *16s rRNA* utilizado en este proyecto como control de expresión constitutiva para ambas cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*.

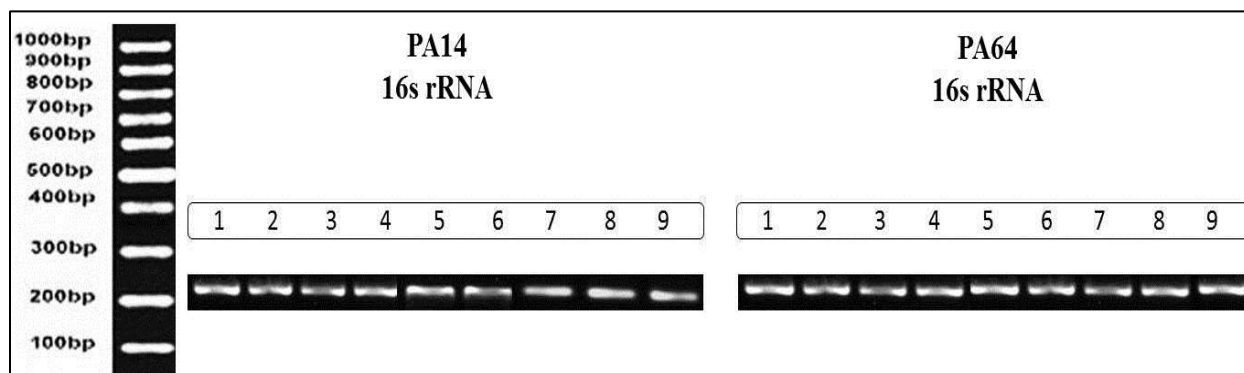


Figura 21. Expresión del gen *16s rRNA*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *16s rRNA* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los números 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *16s rRNA* 231 pb).

La figura 21 demuestra que los niveles de expresión del gen *16s rRNA* para ambas cepas de *P. aeruginosa* bajo todos los tratamientos son constantes y corresponden a amplicones de 231 pb aproximadamente. Los genes constitutivos se caracterizan por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo independientemente de que éstas estén bajo un tratamiento como lo es en este estudio.

En la figura 22 se muestran las bandas que amplificaron fragmentos de 295 pb aproximadamente, correspondientes al gen *lasI*. En ella se observa las gráficas que representan dicha actividad. En la cepa PA14, los compuestos 6, el EAcOEt y C-30 no alteraron de manera significativa la expresión del gen *lasI* puesto sus niveles se mantienen similares al de la cepa sin tratamiento, sin embargo, los demás compuestos (1,2,3,4 y 5) mostraron niveles de sobreexpresión de dicho gen en comparación a la cepa sin tratamiento. Mientras que en la cepa PA64 se observa que en general todos los tratamientos disminuyeron significativamente la expresión (o acumulación de transcrito) del gen *lasI* en comparación con la cepa sin tratamiento, excepto el compuesto 6 que mostró poca disminución significativa en los niveles de expresión de dicho gen.

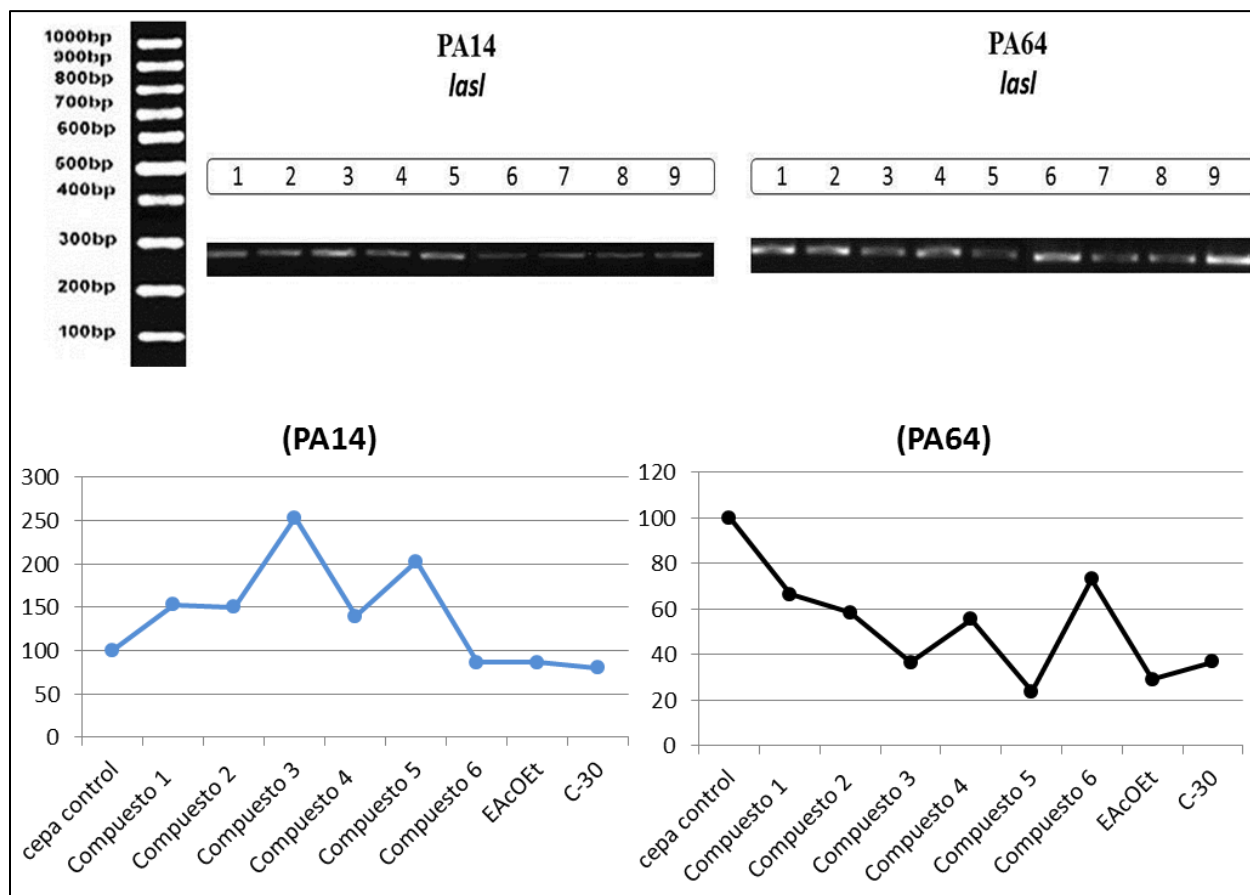


Figura 22. Expresión del gen *lasI*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *lasI* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los número 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *lasI* 295 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *lasI* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

En la figura 23 se observa la expresión diferencial de los transcritos que corresponden al gen *lasR* cuyos fragmentos son de 130 pb aproximadamente, en la figura, las gráficas complementa la representación del efecto de los compuestos sobre la expresión génica en las cepas de *P. aeruginosa*. Para la cepa PA14, los compuestos 1, 2 y 3 no disminuyen la expresión de este gen en comparación a la cepa sin tratamiento, sino que hubo una ligera sobreexpresión, sin embargo, los compuestos 4,5, 6, C-30 y el EAcOEt disminuyeron significativamente la expresión de *lasR* en relación a la cepa sin tratamiento.

Mientras que para la cepa PA64, el compuesto 5 no mostró efecto sobre la expresión de *lasR*, sin embargo, los compuestos 1 y 2 sobreexpresan a *lasR* en comparación a la cepa sin tratamiento. Por otra parte, los compuestos 4, 3, 6, C-30 y el EAcOEt lograron disminuir de manera significativa la expresión de *lasR* en comparación con la cepa sin tratamiento.

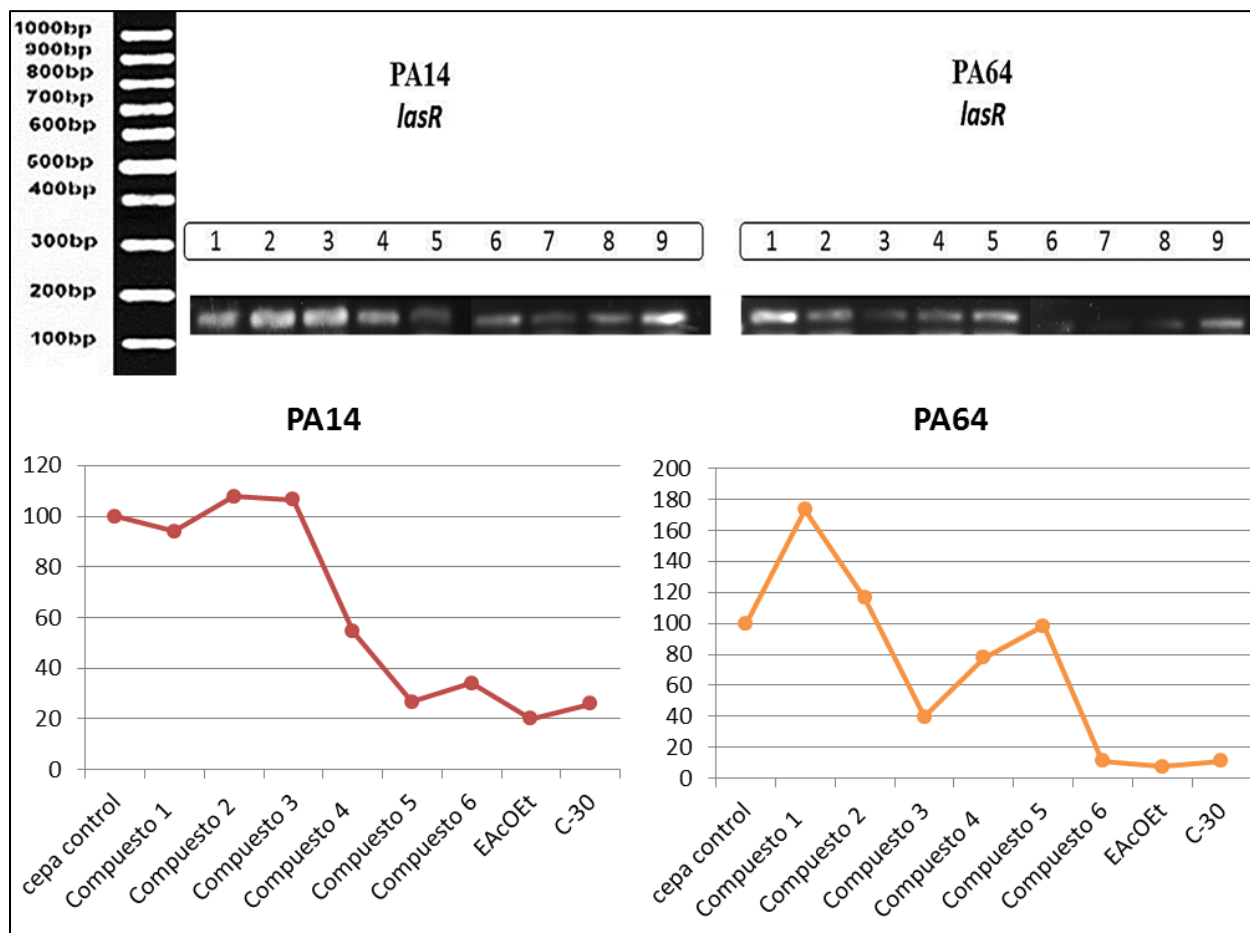


Figura 23. Expresión del gen *lasR*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *lasR* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los número 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *lasR* 130 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *lasR* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

La figura 24 muestra la expresión diferencial de los transcritos correspondientes al gen *rhlI* cuyos fragmentos son de 155 pb aproximadamente. En dicha figura se observan las gráficas que representa el efecto de los compuestos sobre la expresión génica en las cepas de *P. aeruginosa*. Para la cepa PA14, todos los compuestos (1-6), C-30 y el EAcOEt disminuyeron la expresión del gen *rhlI* respecto a la cepa sin tratamiento.

Mientras que para la cepa PA64, la tendencia fue similar, ya que todos los compuestos (1-6), C-30 y el EAcOEt disminuyeron la expresión del gen *rhlI*, siendo los compuestos 2 y 3 los que mostraron valores más significativos en comparación a la cepa sin tratamiento.

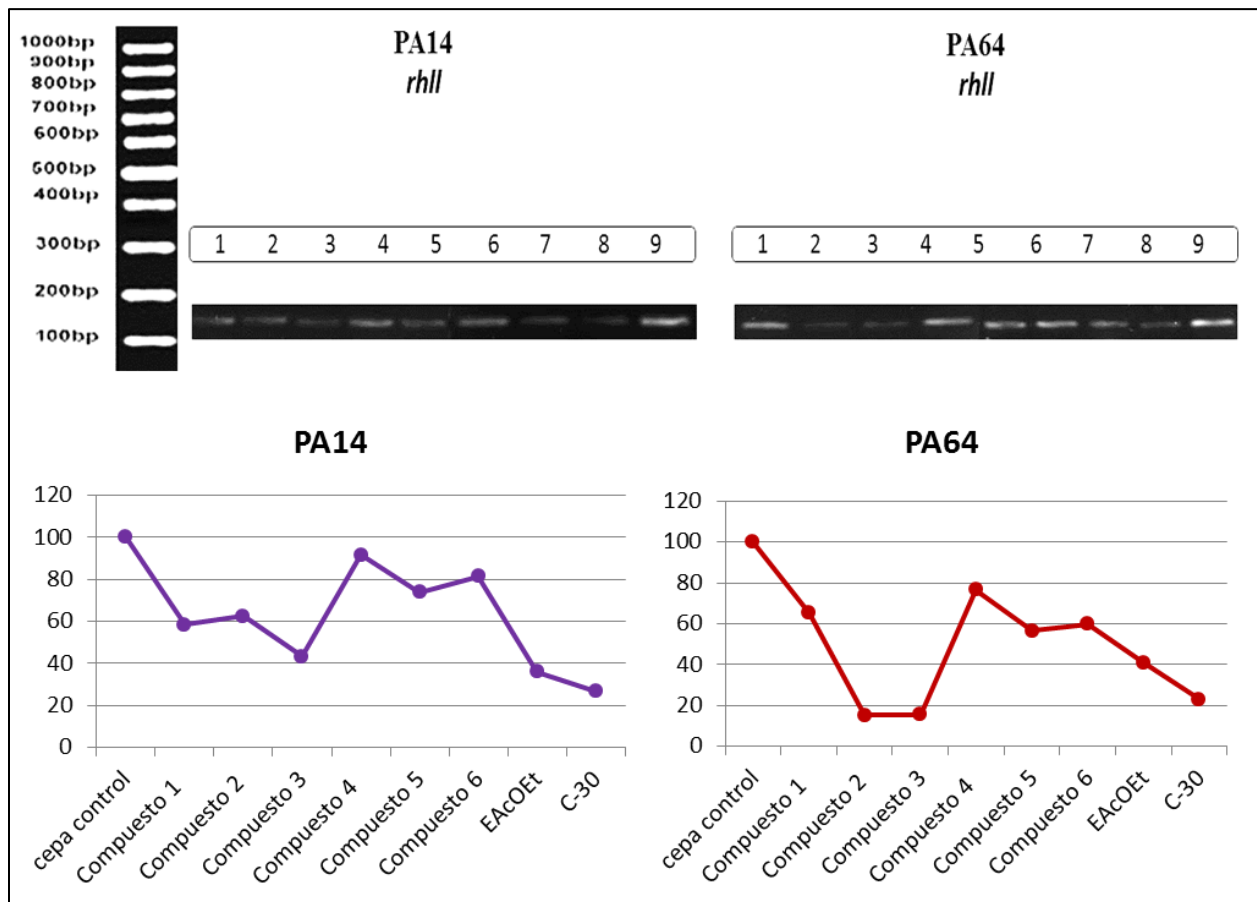


Figura 24. Expresión del gen *rhII*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *rhII* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los números 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *rhII* 155 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *rhII* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

La figura 25 muestra la expresión diferencial de los transcritos correspondientes al gen *rhIR* cuyos fragmentos son de 133 pb aproximadamente. En dicha figura se observan las gráficas que representa el efecto de los compuestos en la expresión génica en las cepas de *P. aeruginosa*. Para la cepa PA14, los compuestos 2,4 y 5 no tuvieron efecto alguno sobre la expresión del gen *rhIR* en relación a la cepa sin tratamiento, no así los compuestos 1,3 6, C-30 y EAcOEt que disminuyeron la expresión de este gen respecto a la cepa sin tratamiento

En la cepa PA64, el compuesto 6 fue el único que no mostró alteración en la expresión génica de *rhIR* en comparación a la cepa sin tratamiento. Mientras que los compuestos restantes (1, 2, 3, 4, 5), C-30 y el EAcOEt disminuyeron la expresión génica de *rhIR* de manera muy significativa en relación a la cepa sin tratamiento.

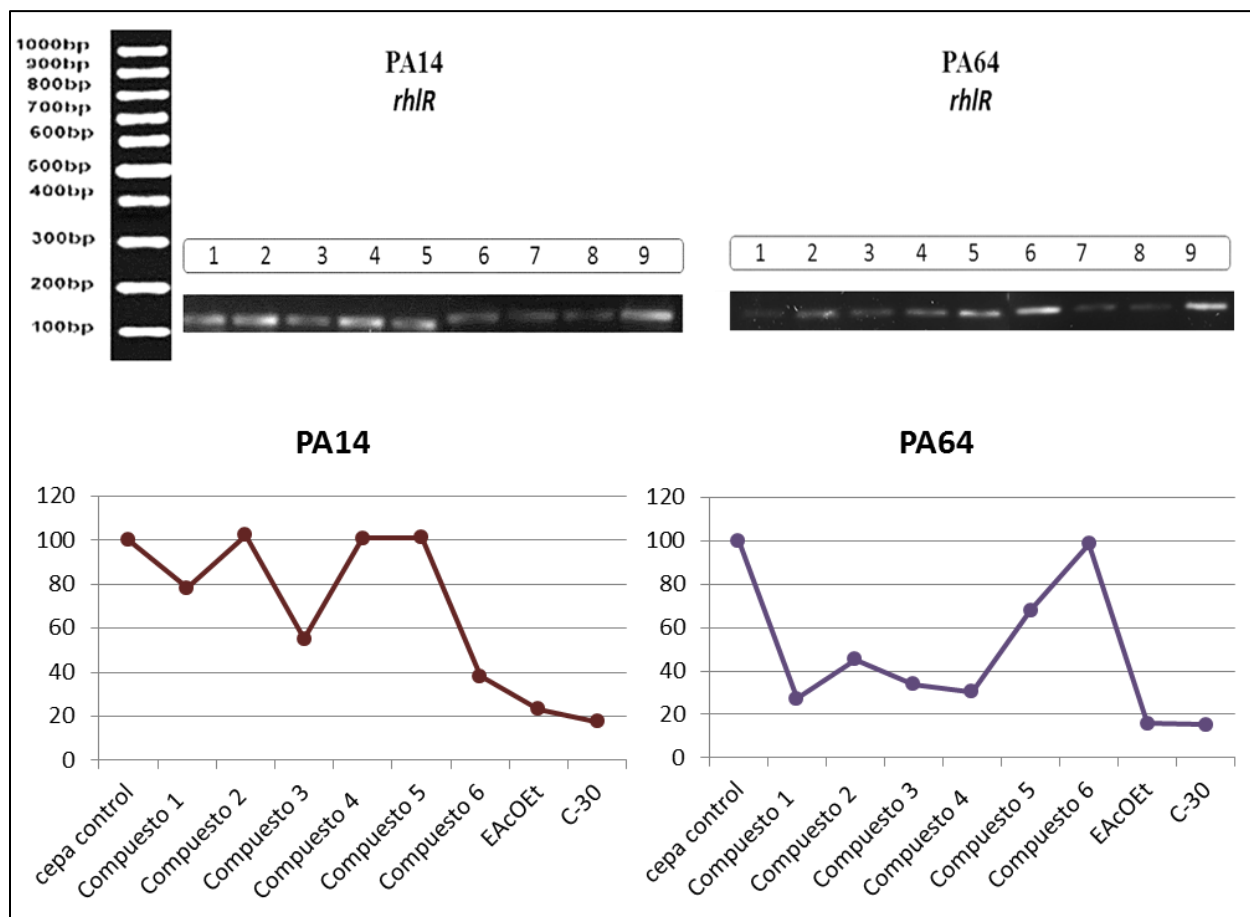


Figura 25. Expresión del gen *rhlR*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *rhlR* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los número 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *rhlR* 133 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *rhlR* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

La figura 26 muestra la expresión diferencial de los transcritos correspondientes al gen *lasB* que codifica para elastasa cuyos fragmentos son de 153 pb aproximadamente. En dicha figura se observan las gráficas que representan el efecto de los compuestos sobre la expresión génica en las cepas de *P. aeruginosa*.

Para la cepa PA14, todos los compuestos (1-6), C-30 y el EAcOEt disminuyeron la expresión del gen *lasB* en relación a la cepa sin tratamiento, destacando el efecto mayor de los compuestos 2 y 3.

Para la cepa PA64, el compuesto 5 fue el único que mostró una alteración, sobreexpresando la actividad del gen *lasB* en comparación a la cepa sin tratamiento. Mientras que los compuestos restantes (1, 2, 3, 4, 6), C-30 y el EAcOEt disminuyeron la expresión génica de *lasB* en relación a la cepa sin tratamiento, siendo los compuestos 4,6 y el EAcOEt los que tuvieron mayor efecto significativo.

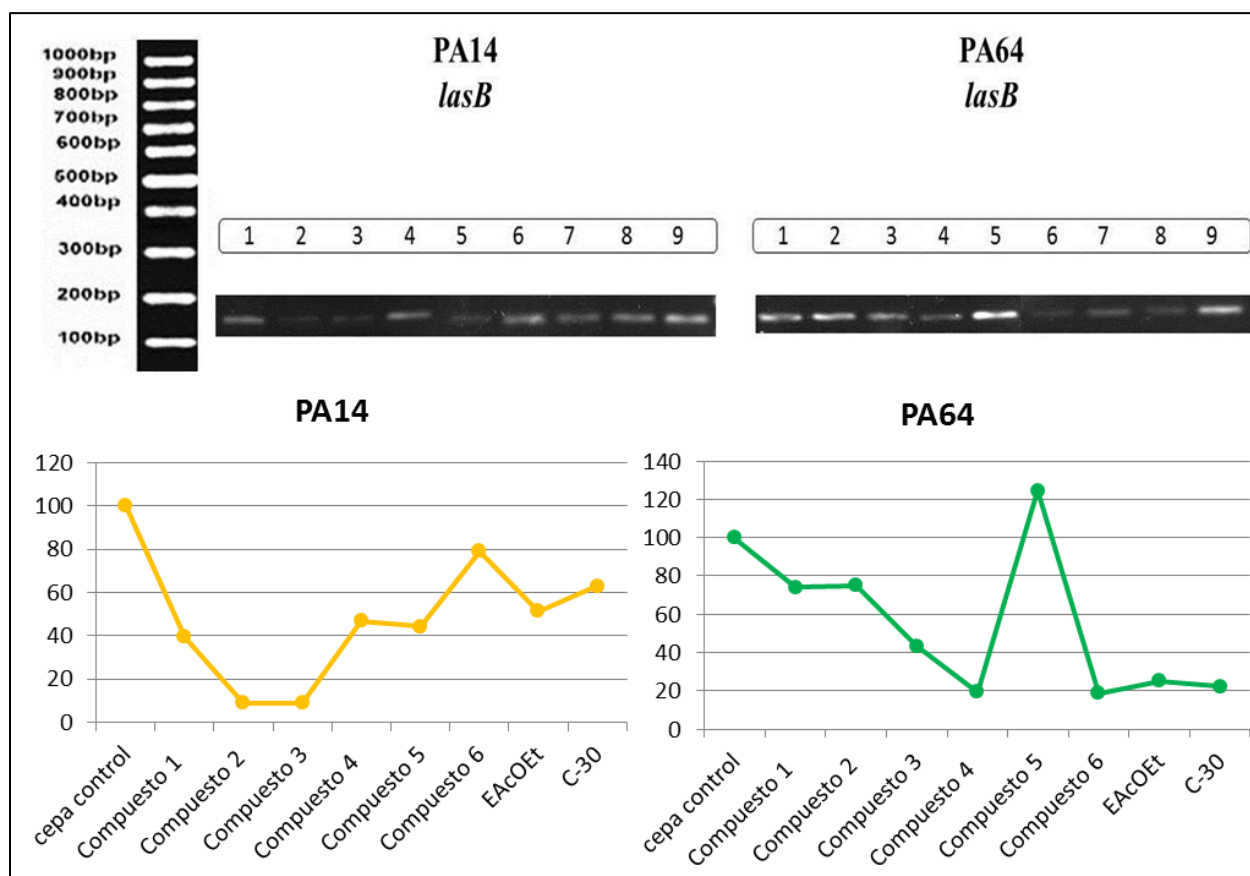


Figura 26. Expresión del gen *lasB*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *lasB* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los número 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *lasB* 153 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *lasB* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

Para que la piocianina sea sintetizada por *P. aeruginosa*, deben existir 2 vías. Por una parte, *pqsR* es un gen regulador transcripcional que activa los genes de *phnAB* que son los que sintetizan la molécula quinolona que regula los operones *phzABCDEFG* que son clave para síntesis de fenazina para producir la piocianina (124). El gen *phz* es uno de los genes del operón que puede codificar factores de transcripción que se unan al promotor, regulando así la propia expresión del operón y por tanto la biosíntesis de piocianina.

Con base en esto, en la figura 27 se muestra la expresión diferencial de los transcritos correspondientes al gen *phz* que codifica para piocianina cuyos fragmentos son de 362 pb aproximadamente. En dicha figura se observan las gráficas que representan el efecto de los compuestos sobre la expresión génica en las cepas de *P. aeruginosa*. Para la cepa PA14, todos los compuestos (1-6), C-30 y el EAcOEt disminuyeron de manera significativa la expresión del gen *phz* en relación a la cepa sin tratamiento.

El mismo patrón se observó para la cepa PA64, ya que el compuesto 1 mostró poco efecto en la expresión de este gen, no así los compuestos (2-6), C-30 y el EAcOEt que disminuyeron de manera significativa la expresión del gen *phz* en comparación a la cepa sin tratamiento.

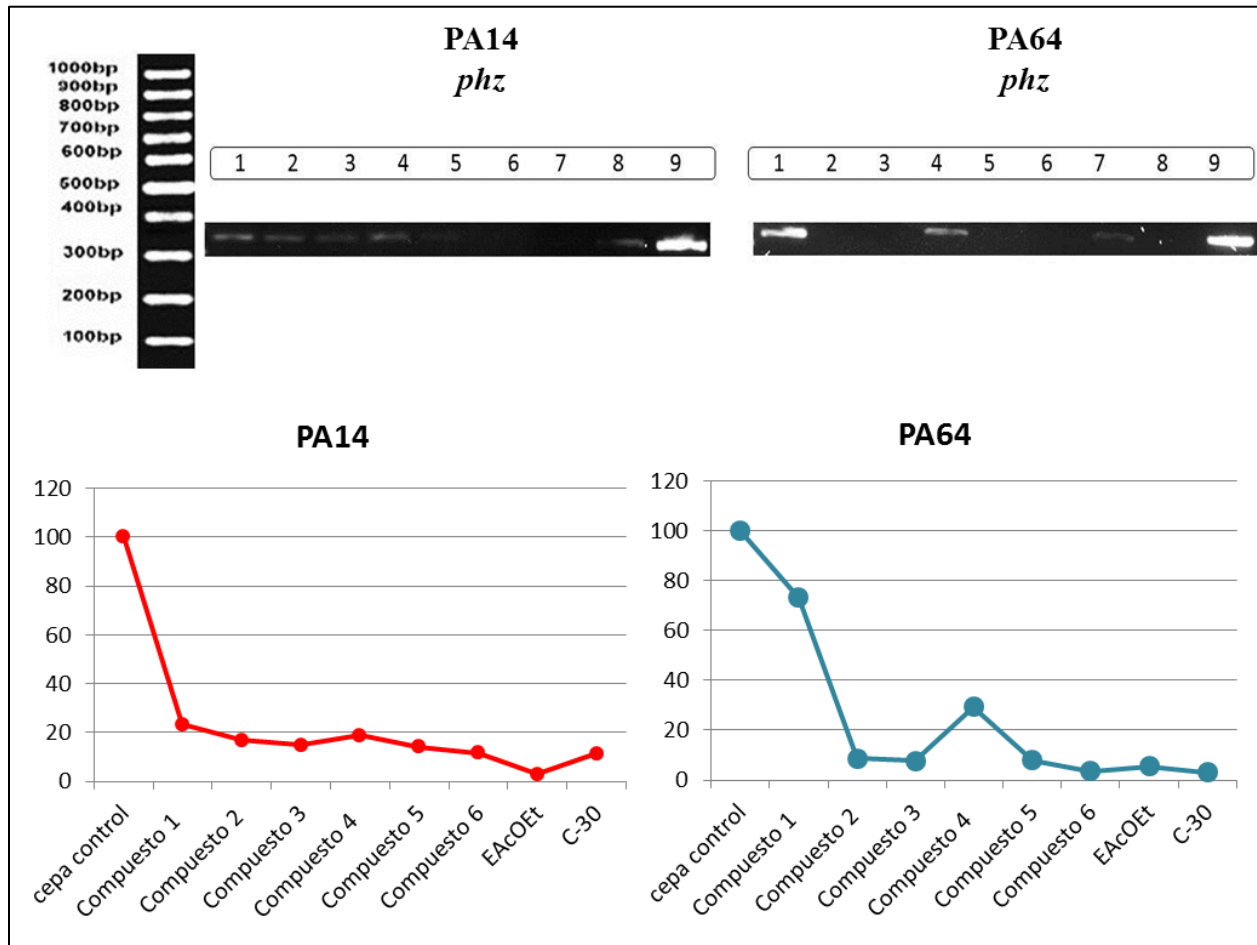


Figura 27. Expresión del gen *phz*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *phz* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los números 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *phz* 362 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *phz* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

La figura 28 muestra la expresión diferencial de los transcritos correspondientes al gen *toxA* que codifica para una toxina cuyos fragmentos son de 150 pb aproximadamente. En dicha figura se observan las gráficas que representan el efecto de los compuestos sobre la expresión génica en las cepas de *P. aeruginosa*.

Para la cepa PA14, todos los compuestos (1-6), C-30 y el EAcOEt mostraron disminución en la expresión del gen *toxA* en relación a la cepa sin tratamiento, destacando el mayor efecto que tuvieron los compuestos 2 y 3.

Mientras que para la cepa PA64, el comportamiento fue similar ya que todos los compuestos (1-6), C-30 y el EAcOEt disminuyeron la expresión génica de *toxA* en comparación a la cepa sin tratamiento, destacando la actividad de los compuestos 3,5, 6 y el EAcOEt los cuales tuvieron mayor efecto significativo.

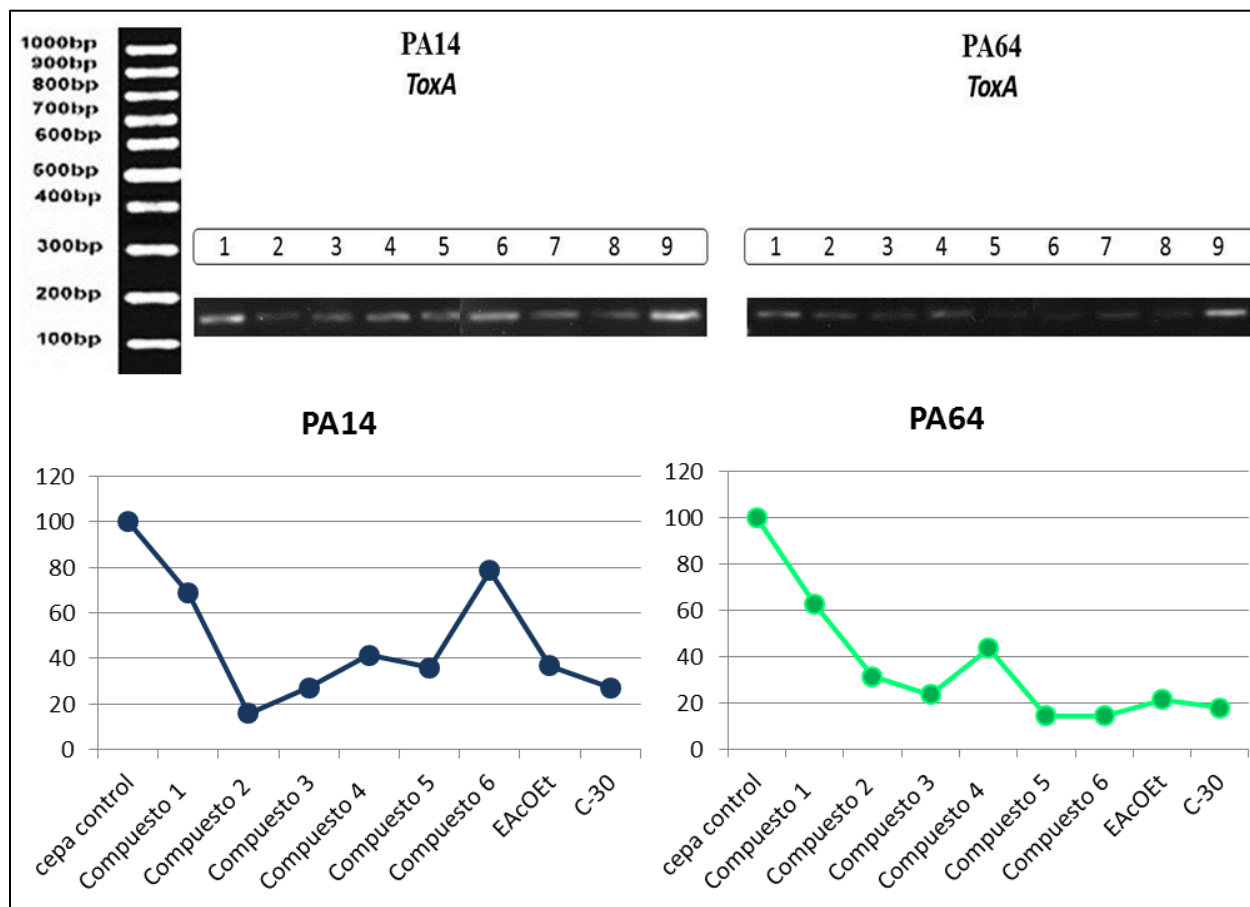


Figura 28. Expresión del gen *toxA*. Los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la expresión del gen *toxA* en las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa* tratadas por metabolitos secundarios de *L. tridentata* (compuesto 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Los número 7, 8 y 9 corresponden a la expresión del mismo gen tratadas por el EAcOEt, C-30 y las cepas sin ningún tratamiento, respectivamente. (Producto del gen *toxA* 150 pb). Las gráficas representan la expresión diferencial del gen *toxA* en cada tratamiento de cada cepa en comparación a las cepas sin tratamiento, respectivamente.

La figura 29 (A) resume el efecto que tuvieron los compuestos y el EAcOEt de *L. tridentata* sobre la disminución del al menos 50% de la expresión de cada gen analizado en las cepas PA14 y PA64 en relación de las cepas sin tratamiento de *P. aeruginosa*, respectivamente. Además, la gráfica indica que los compuestos y el EAcOEt tuvieron mayor efecto reductor sobre la expresión génica de *phz* respecto a las cepas PA14 y PA64 sin tratamiento de *P. aeruginosa*. Mientras la figura (B) resume el efecto que tuvo cada compuesto sobre la reducción de al menos 50% de la expresión de los genes analizados en las cepas PA14 y PA64 en relación de las cepas sin tratamiento de *P. aeruginosa*, respectivamente. Siendo el compuesto 3 y el EAcOEt los que tuvieron mayor efecto reductor sobre la expresión de los genes analizados en función a las cepas PA14 y PA64 sin tratamiento de *P. aeruginosa*.

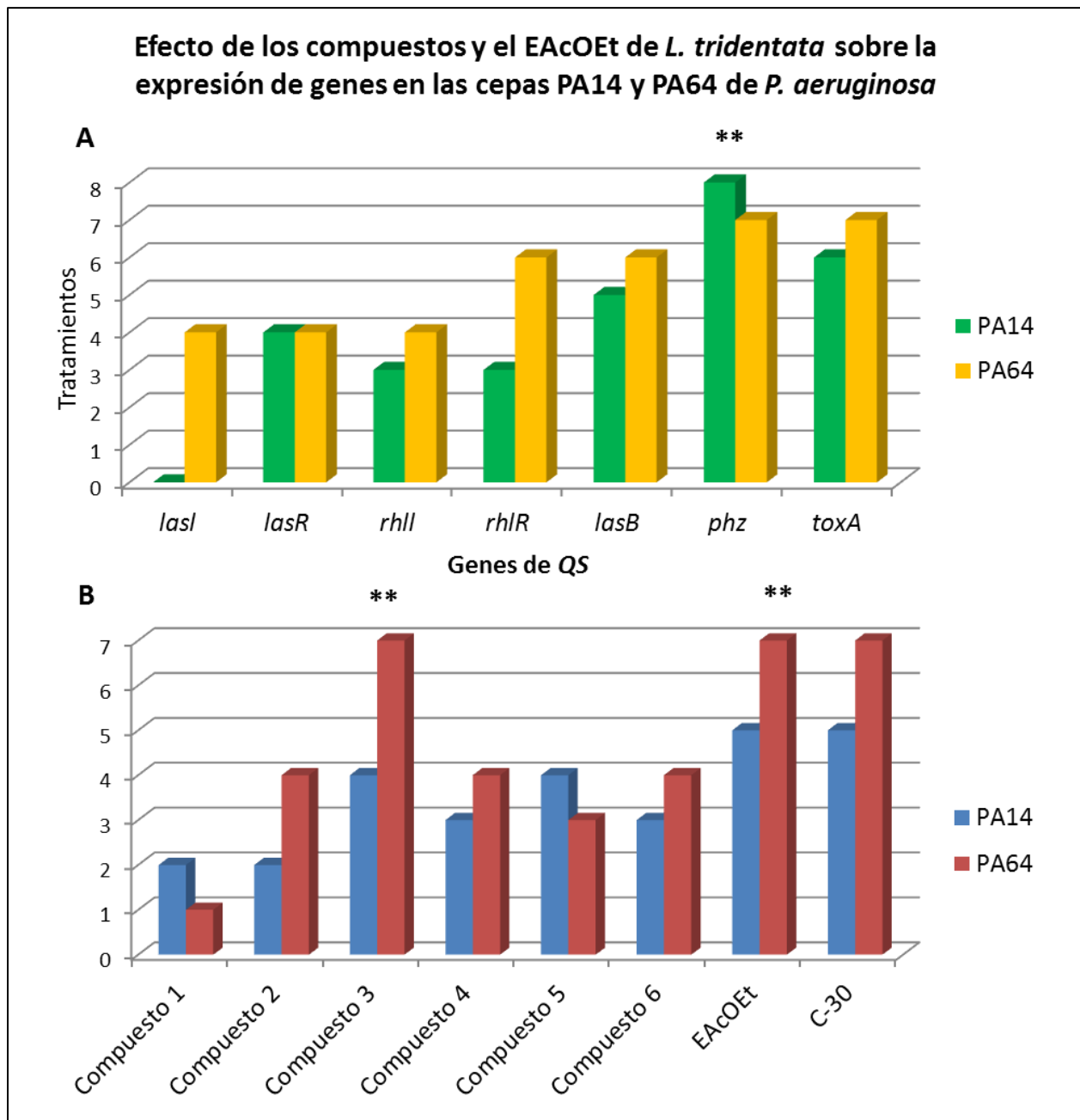


Figura 29. Efecto de los tratamientos y el EAcOEt de *L. tridentata* sobre la expresión génica de las cepas PA14 y PA64 de *P. aeruginosa*. En la gráfica (A) se observa el efecto que tuvieron los compuestos purificados y el EAcOEt de *L. tridentata* en disminución de la expresión de cada gen involucrado en el sistema de percepción de quórum en comparación a las cepas sin tratamiento de PA14 y PA64, respectivamente. ** Representa el gen *phz* que tuvo la mayor disminución en la expresión génica en ambas cepas por el efecto de los compuestos purificados y el EAcOEt.

En la gráfica (B) se observa efecto que tuvo cada compuesto sobre la reducción de al menos 50% de la expresión de los genes analizados en las cepas PA14 y PA64, respectivamente. **Representa los resultados más significativos (compuesto3 y el EAcOEt) que tuvieron la mayor disminución en la expresión de los genes analizados en ambas cepas.

7.0 DISCUSIÓN

La alta presencia de *P. aeruginosa* en pacientes inmunodeprimidos, enfermos por fibrosis quística o por infecciones nosocomiales representa un grave problema de salud a nivel nacional y mundial. Este patógeno posee un metabolismo aerobio estricto, sin embargo, puede crecer en condiciones anaérobicas utilizando nitrato o arginina como receptor final de electrones. Su capacidad evolutiva la hace una bacteria versátil nutricionalmente, pudiendo utilizar como fuentes de carbono gran variedad de carbohidratos, alcoholes y aminoácidos. En condiciones de laboratorio, crece sin problema en cualquier medio y en condiciones óptimas de crecimiento, esta bacteria crece a 37°C, siendo capaz de crecer a 42°C pero no a condiciones menores a 4°C, además de que diversas cepas pueden secretar factores de virulencia en tiempos menores a las cepas control en ambientes controlados.

La acelerada aparición de cepas extremoresistentes y panresistentes se debe, entre otros factores, al uso excesivo de los antibióticos, la presión selectiva que estos ejercen como última opción para erradicarla y a la naturaleza de esta bacteria para desarrollar y adquirir mecanismos de resistencia, como consecuencia de su variable tasa evolutiva (12). Con base en esto, surge la necesidad de buscar terapias alternas novedosas que puedan suprimir a dicha bacteria sin generar ningún tipo de resistencia. Una alternativa sería el bloqueo, la represión o la disminución de la comunicación celular bacteriana con el objetivo de evitar la secreción de moléculas asociadas con su alta morbimortalidad, mecanismo al cual se llama “*quorum quenching*”. Además, ha despertado el interés en el uso de moléculas de origen biológico como son los metabolitos secundarios de plantas endémicas para evaluar su posible actividad *quorum quenching* y si estas alteraciones se reflejan a nivel transcripcional.

Explorar los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de *P. aeruginosa* es determinante para el desarrollo y elección de herramientas que contrarresten el arsenal que esta bacteria tiene para generar resistencia cada vez más efectiva en tan poco tiempo (125). Para ello, es de vital importancia indagar su complejidad genética y genómica, las cuales le permite a este patógeno integrar material genético exógeno y desarrollar las mutaciones necesarias para prosperar y sobrevivir en diversos nichos ecológicos. El impacto en la patogenia de las infecciones por *P. aeruginosa* está determinado por la secreción de factores de virulencia, sin embargo, en los casos clínicos es complicado distinguir entre colonización simple e infección, lo cual puede tener como consecuencia discrepancia en los resultados obtenidos de diversos estudios dado que no hay una herramienta de diagnóstico que precise y evalúe el potencial de virulencia de una cepa clínica aislada (126).

En este estudio se abordó a nivel *in vitro* el efecto de 6 metabolitos secundarios purificados y un extracto de acetato de etilo (EAcOEt) extraídos de *Larrea tridentata* como posibles inhibidores o represores del sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa* en dos cepas aisladas de muestras clínicas (PA14 y PA64) bajo concentraciones de 1, 10 y 100 μ M. Posteriormente se analizó la actividad transcripcional de los genes involucrados en el sistema de percepción de quórum cuando están bajo tratamientos por el EAcOEt y los compuestos purificados. Por una parte, PA14 es una cepa silvestre que presenta mayor grado de virulencia en comparación a la cepa PAO1, mientras que PA64 es una cepa aislada de muestras clínicas que ha presentado resistencia extensa (XDR, resistencia a todos menos 1 o 2 clases de antibióticos), llegando en ocasiones inclusive a la panresistencia (PDR, resistencia a todos los antibióticos disponibles).

Los resultados mostraron que la cepa farmacorresistente (PA64) presentó mayor disminución en la expresión génica en la mayoría de los tratamientos por los compuestos purificados y el extracto bioactivo, siendo el gen *phz* que participa en la biosíntesis de la pirocianina el que tuvo una mayor reducción en los niveles de expresión génica, seguido del gen *toxA* que codifica para la exotoxina A. Mientras que para los genes *lasB*, *rhIR*, *lasR*, *rhII* y *lasI* la disminución en niveles de expresión génica en algunos tratamientos fue significativa aunque un tanto contrastante, ya que en algunas condiciones se sobreexpresó la actividad de los genes *lasI*, *lasR* y *lasB*, además de no seguir un patrón de red génica que determina el sistema de percepción de quórum en *P. aeruginosa* como la mayoría de los estudios señalan, ya que la poca reducción transcripcional del sistema Las deja entre ver que este patógeno recurre a otros mecanismos moleculares para sobrevivir.

No obstante, se sabe que el sistema de percepción de quórum es un sistema de regulación génica per se determinado por la densidad poblacional, además, en el caso de esta bacteria se ha determinado que tiene cuatro sistemas de quórum que están conectados entre sí. Los sistemas *lasR*-*lasI* y *rhIR*-*rhII* son los que más se han caracterizado molecularmente y son también los que participan de manera central en la expresión de factores de virulencia y en la retroalimentación de otros genes reguladores. Investigaciones acerca del sistema *pqsR* señalan que también pueden retroalimentar y activar otros sistemas, tales como el sistema *rhIR*-*rhII*, el cual está determinado por la señalización de moléculas autoinducidas 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS). El rol que ocupa *lasR* en el sistema de percepción de quórum es fundamental, ya que es un gen regulador positivo que promueve la transcripción de otros complejos reguladores (*rhIR* y *pqsR*), y de diferentes proteasas alcalinas como son la elastasa A y B y la toxina A (127). El autoinductor con que interacciona *lasR* es el N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona, que se sintetiza por la reacción catalítica de la enzima sintetasa del autoinductor *lasI*.

En la figura 22 se puede observar que todos los tratamientos disminuyeron la expresión del gen *lasI* en la cepa PA64 respecto a la cepa sin tratamiento, sin embargo, estas disminuciones en la expresión génica no son proporcionales a los niveles de expresión de *lasR* que no mostró cambios significativos en relación a la cepa sin tratamiento y que se puede observar en la figura 23, solo los compuestos 3, 4, 6 y el extracto de acetato de etilo en la cepa farmacorresistente logran disminuir su actividad transcripcional. Esto significa que la poca interacción entre regulador transcripcional y la enzima sintasa es baja y contradictoria, debido a que bajo un esquema jerárquico, esto supone que mientras los niveles de *lasR* no cambian, los niveles de *lasI* no deben cambiar por lo que los niveles de autoinductores N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona se expresan siempre que se alcanza una elevada densidad de *P. aeruginosa*, como sería el caso de cualquier tipo de infección. Además, si los niveles de expresión *lasR* se mantienen sin ser reprimidos, los niveles de expresión de los genes *toxA* y *lasB* que codifican para la exotoxina y elastasa, respectivamente, no deberían tener efecto en sus niveles de expresión, lo que no ocurre en la mayoría de nuestros resultados. Sin embargo, el hecho de que se reduzcan los niveles de expresión de *lasI* y *lasB* mientras que los niveles de expresión de *lasR* se mantienen irregulares, se puede asociar a dos escenarios.

Por una parte, asumiendo que durante el crecimiento de *P. aeruginosa*, la fase estacionaria es en la cuál la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y hay una acumulación de productos tóxicos, después de 24 h de incubación, las bacterias se encuentran en esta fase y es el tiempo en que se cuantificaron los factores de virulencia *in vitro*, así como los niveles de expresión génica mediante ensayos de PCR. Esto significa que aunque la producción de la molécula N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona está autoregulada positivamente, su concentración alcanza nivel constante mucho antes de la fase estacionaria (128) por lo que la bacteria antes de las 24 h de incubación ya dejó de transcribir *lasI* como una medida preventiva y economizadora de energía una vez que ha sintetizado los suficientes autoinductores de tipo N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona y por esa misma razón se observa bajos niveles de expresión génica de este gen, que no son necesariamente producto de la bioactividad inhibitoria de los compuestos.

Existen estudios como el Wagner, VE, et al., 2003 y Chang, et al., 2003 (129, 130) que abordaron este comportamiento, en los que observaron como los tiempos de incubación, la disponibilidad de oxígeno y la composición del medio disminuyeron la transcripción de genes asociados a la resistencia y a la secreción de metabolitos secundarios como son algunas toxinas, ya que las poblaciones bacterianas en cultivos *in vitro* se enfrentan a fuerzas de selección que favorecen la transcripción inmediata de ciertos genes indispensables para la sobrevivencia como son los del metabolismo primario, reduciendo la transcripción de otros genes asociados a la resistencia.

Por otra parte, el segundo escenario está relacionado con la interconectividad que existe entre los sistemas, ya que los resultados de diversas investigaciones señalan que los circuitos Las, Rhl y Pqs se organizan de una manera jerárquica siendo el sistema Las el principal regulador. Este supuesto implicaba experimentalmente que si se eliminaba el sistema Las, la actividad de los otros se apagaban y por tanto disminuía la virulencia en la cepa (131–133). A partir de estas observaciones, las investigaciones se han enfocado en tratar de bloquear el sistema Las, tales como el diseño de anticuerpos contra lasR, el uso de moléculas que degraden los autoinductores, y la modificación de estructuras de compuestos similares al autoinductor.

Estudios como el de Yang, et al., 2008 (130) lograron reprimir la actividad de *lasR*, sin embargo, no lograron bloquear totalmente la virulencia de esta bacteria, lo que significa cambiar de paradigma acerca de que *lasR* no es el único regulador transcripcional positivo capaz de activar y regular el sistema de quórum en *P. aeruginosa*. Esto también sugiere que la bacteria utiliza a otros reguladores transcripcionales para lograr la secreción de autoinductores y factores de virulencia.

En 2003, Diggle (66) y colaboradores determinaron que *pqsR* también puede superar la dependencia de *lasR* en la activación de la expresión del sistema rhl y en la producción de factores de virulencia a través de la sobreexpresión de *rhlR* el cual regula la expresión de genes que codifican factores de virulencia como la elastasa y piocianina. Además se demostró que la expresión de la enzima sintasa *rhlI* podría restablecer la producción de varios exoproductos como elastasa, piocianina, hemolisina y ramnolípidos y que la presencia de *rhlI* y *rhlR* son necesarios para la activación completa de los promotores *rhlABR* y *lasB* (134), denotando que *rhlR* puede regular la expresión de *lasI* (135).

La figura 24 muestra el efecto que tuvieron los compuestos purificados y el EAcOEt sobre la expresión de *rhlI*, en ella se observa que todos los tratamientos disminuyeron la expresión de este gen en comparación a la cepa sin tratamiento para ambas cepas de *P. aeruginosa* (PA14 y PA64). Aunado a esto, la disminución en los niveles de expresión génica de *rhlR* en respuesta a los metabolitos secundarios como ocurre en los tratamientos 1,3,6 y el EAcOEt de la cepa PA14 y en la mayoría de los tratamientos de la cepa PA64 (1,2,3,4,5, EAcOEt) en relación a las cepas sin tratamiento, sugiere que la modificación de los niveles de expresión de *pqsR* puede alterar la cascada de señalización de los otros reguladores transcripcionales como *rhlR* que puede activar la expresión de genes en la red de percepción de quórum. Esto implica que al existir una reducción en la expresión de este gen, los niveles de expresión génica que codifican para la exotoxina A, elastasa y piocianina, también deben reducir sus niveles de expresión, lo cual ocurre en la mayoría de los resultados obtenidos en este trabajo.

Con base en lo anterior, se plantea que los metabolitos secundarios purificados y el EAcOEt tengan un efecto o actividad selectiva hacia el sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa* y que dicho efecto puede actuar en tres niveles. i) Inactivación del complejo proteico a través de la represión o inhibición de reguladores transcripcionales. ii) Modificación enzimática a través de la represión, modificación o inhibición de las sintasas y/o operones encargadas de la producción de moléculas autoinducidas. iii) Modificación química de los autoinductores a través de la relación estructura- actividad.

Larrea tridentata contiene gran número de metabolitos secundarios, la mayoría de los cuales se almacenan en la parte aérea, tales como lignanos, flavonoides, terpenos entre otras moléculas con propiedades antioxidantes, siendo el EAcOEt el que alberga gran cantidad de estos metabolitos secundarios, esto explica el efecto que mostró en la expresión génica de los genes asociados al sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa*, ya que en los tratamientos de la cepa PA64 redujo la expresión génica de manera significativa en todos los genes analizados respecto a la cepa sin tratamientos (figura 29). A partir del EAcOEt se obtuvieron compuestos de tipo lignano, que son metabolitos secundarios con base polifenólica con propiedades antioxidantes, en la figura 8 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto (5R)-5-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 1) en donde se puede observar los dos anillos aromáticos y un anillo de ciclohexano saturado. Asimismo el compuesto (8R)-8-(4-hidroxifenil)-3-metoxi-6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (compuesto 3) también pertenece al grupo de los lignanos, cuyo espectro de resonancia magnética nuclear (figura 12) es muy similar al del compuesto 1, lo que lo diferencia del compuesto 1 es que solo cambia el grupo metoxilo de la posición 8 a la posición 7.

El compuesto 3 fue el que mayor efecto tuvo en la expresión génica, ya que disminuyeron significativamente la expresión de los genes *lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*, *lasB*, *phz*, *toxA* en la cepa PA64, mientras que en la cepa PA14, disminuyeron la expresión de los genes *rhII*, *lasB*, *phz*, *toxA* respecto a la expresión génica de las cepas sin tratamiento, respectivamente. No obstante, el compuesto 1 solo tuvo efecto sobre *rhIR* en la cepa PA64 ya que redujo la expresión génica significativamente, mientras que en la cepa PA14 solo disminuyeron significativamente la expresión de los genes *lasB* y *phz* en función a las cepas sin tratamiento. De acuerdo a la literatura, se sabe que los lignanos actúan a través de un sistema competitivo contra estructuras complejas ya que en su estructura, los anillos aromáticos pueden desestabilizar el sitio de unión con los complejos receptores de los autoinductores *lasI* y *rhII*, 3-oxo-C12- homoserina lactona y butil-homoserina lactona, respectivamente (136).

Además, en trabajos como el de Lu, et al., 2014 (137) determinaron estructuras similares a este tipo de compuestos y señalaron que estas estructuras pueden fungir como antagonistas de *PqsR*, que en su mayoría son análogos a la estructura del autoinductor 2-heptil-4-hidroxiquinolina (HHQ) lo que evita la interacción total con los otros sistemas (*las* y *rhl*) provocando interferencia en la cascada de señalización del sistema de percepción de quórum. Esto posiblemente explique porque disminuyeron los niveles de expresión génica de *rhlI*, *rhlR*, *lasB*, *phz* y *toxA* cuando son tratados con estos compuestos. Con base a lo anterior, los resultados mostrados en este trabajo se alinean a la idea de que el sistema *psq* regula la expresión de múltiples genes reguladores como *rhlR*, de genes de virulencia tales como *phz* que está involucrado en la biosíntesis de piocianina, el gen *hcnAB* responsables de la producción de cianuro de hidrógeno y *lasB* que codifica para elastasa (138).

Por otra parte, el compuesto 4,4'-(2,3-dimetilbutano-1,4-diil)dibenceno-1,2-diol (compuesto 2) es comúnmente conocido como ácido nordihidroguayarático (NDGA), también es un compuesto fenólico que presenta actividad antiséptica, antiviral, antimicrobiana, nematicidad, y antitumorigénica (139). Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen propiedades antioxidantes o reductoras que ayudan a proteger a las células del estrés oxidativo causadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS). En este trabajo, los tratamientos bajo el compuesto 2 disminuyeron significativamente la expresión génica de los genes *rhlI*, *rhlR*, *phz*, *toxA* en la cepa PA64, mientras que en la cepa PA14 este compuesto redujo significativamente la expresión génica de *lasB*, *phz*, *toxA* en relación a la cepa sin tratamiento. Con base a lo anterior, cabe destacar que *P. aeruginosa* utiliza moléculas de tipo N- acil homoserina lactona tales como la butil-homoserina lactona para activar la expresión de genes que regulan la producción de autoinductores que interactúan con los receptores celulares para su crecimiento poblacional y éstas tienen actividad oxidativa como parte de su mecanismo de infección. Además, la piocianina que secreta *P. aeruginosa* es una molécula altamente oxidativa capaz de destruir células de los pulmones cuando se ha infectado durante la fibrosis quística. Por consiguiente, la actividad antioxidante del ácido nordihidroguayarático puede estar reaccionando con la producción de piocianina, además de estar interfiriendo en la interacción que existe entre los autoinductores producidos por *rhlI* (butil-homoserina lactona) y su complejo receptor *rhlR* que indirectamente afecta la producción de factores de virulencia tales como la elastasa y piocianina debido a que son moléculas que se pueden transportar a través de membranas celulares y al interactuar con estos autoinductores (butil-homoserina lactona) inducen su actividad antioxidante gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres. Esto representa una posible explicación de porque disminuyeron significativamente la expresión génica de *rhlI*, *rhlR*, *lasB*, *phz*, *toxA* cuando están bajo este compuesto.

Del mismo modo, el compuesto 5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 4) es una flavona tetrasustituida en el anillo aromático (anillo A) y con un sistema *para* sustituido en el anillo aromático (figura 13). Mientras que el compuesto 5,7,8-trihidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona (compuesto 5) muestra las señales características para una flavona trihidroxilada en el anillo A y con un patrón de sustitución 1,4 en el anillo C (figura 14). Ambas moléculas pertenecen al grupo de flavonoides, compuestos que muestran una amplia gama de funciones biológicas que van desde la actividad antiinflamatorias hasta inhibidores del sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa* (140). Cabe señalar que este tipo de metabolitos secundarios parten de un origen biosintético común y por tanto, poseen la misma estructura básica con 15 átomos de carbono, 2 unidades aromáticas, 2 anillos C6 unidos por una cadena C3 (141), estos pueden subdividirse según el grado de oxidación y la naturaleza de los sustituyentes.

Vasavi HS, et al.,2014 (142) demostraron el análisis del comportamiento de que algunos flavonoides pueden unirse a los receptores y reguladores transcripcionales del sistema de percepción de quórum *lasR*, *rhIR* y *psR* y pueden reducir significativamente la capacidad de unión al DNA de factores transcripcionales a las regiones promotoras de los genes asociados al sistema de percepción de quórum, además de inhibir la producción de factores de virulencia y el *swarming* (movilidad bacteriana sobre los medio de cultivo sólido por la presencia de una película fina de crecimiento expansivo) a través de un sistema alostérico.

En este trabajo mostramos que el compuesto 4 redujo significativamente la expresión de los genes *lasB*, *phz*, *toxA* en la cepa PA14, mientras que en la cepa PA64 se redujo significativamente la expresión de los genes *rhIR*, *lasB*, *phz*, *toxA*. En respuesta a la incubación con el compuesto 5, los genes *lasR*, *lasB*, *phz*, *toxA* redujeron sus niveles de expresión en la cepa PA14, mientras que en la cepa PA64 los genes *lasI*, *phz*, *toxA* fueron los que disminuyeron la expresión génica en relación a la cepas sin tratamiento. La relación estructura-actividad (SAR) indica que la presencia de grupos hidroxilos en el anillo A de la flavona (dihidroxiladas, trihidroxiladas o tetrahidroxilas) son necesarios para la inhibición o disminución de *lasR* y *rhIR* (143) y que dicha actividad es a través de un sistema no competitivo, debido a que no son estructuralmente similares a las moléculas autoinductoras o competitivas como lo son las furanonas halogenadas como C-30, que intervienen en la cascada de señalización e inhiben la expresión de factores de virulencia. La actividad de estas moléculas radica en la agregación o eliminación de grupos funcionales que desactiva la función de los receptores, esto puede explicar porque hubo disminución en los niveles de expresión de los genes *rhIR*, *lasI*, *lasB*, *phz* y *toxA* en los tratamientos bajo los compuestos 4 (flavona tetrasustituida) y 5 (flavona trihidroxilada en el anillo A) en la cepa PA64.

Aunado a lo anterior, todos los tratamientos con flavonoides en este estudio (cepa PA14 y PA64) mostraron reducción significativa en la expresión del gen *phz*, que codifica para piocianina, que basados en el trabajo de Paczkowski *et al.*, en 2017 (143) demostraron a través de una doble mutante el uso de flavonas trihidroxiladas en el anillo A inhibe la actividad de los complejos *lasR* y *rhIR* por la eliminación o modificación de grupos funcionales sobre los receptores de los complejos reguladores (*lasR* y *rhIR*) que además disminuyen significativamente la producción de piocianina y el *swarming*. En el 2011, Vendeputte OM, *et al.*,(144) demostraron que el uso de flavonas dihidroxiladas como la naringenina y el taxifolina, cuya base estructural es similar a la del compuesto 5, redujeron la expresión de varios genes controlados por el sistema de percepción de quórum (*lasI, rhII, rhIR, lasA, lasB, phz* y *rhIA*) así como la producción de N-(3-oxododecanoil)- homoserina lacona que son controlados por el gen *lasI*.

Los resultados mostrados en este tesis sirven como base para posteriores trabajos que puntualicen y profundicen un análisis más completo del efecto que tienen estos metabolitos secundarios sobre el sistema de percepción de quórum de cepas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* ya sea de manera indirecta o directa, como es en este caso. La alta variabilidad de cepas intrapoblacionales y monoclonales es una limitante para establecer un tratamiento eficaz que se acople a las condiciones *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, el uso de moléculas de amplio espectro con alta actividad inhibitoria ayuda a diseñar una plataforma sólida para en un futuro próximo desarrollar técnicas con potencial nanomolar o el perfeccionamiento de una terapia combinatoria.

8.0 CONCLUSIONES

- ❖ Los metabolitos secundarios y el extracto de acetato de etilo disminuyeron de manera preferencial la expresión de los genes (*phz*, *toxA*, *lasB*, *rhIR*) que son regulados por el sistema de percepción de quórum en la cepa silvestre (PA14) y en la cepa farmacorresistente (PA64)

- ❖ El gen *phz* que codifica para pirocianina, disminuyó de manera significativa sus niveles de expresión génica, ya que en la cepa PA14 todos los tratamientos por los compuestos (1,2,3,4,5 y 6), C-30 y el EAcOEt tuvieron este efecto. Mientras que en la cepa PA64 los tratamientos por los compuestos (2,3,4,5 y 6), C-30 y el EAcOEt fueron los que disminuyeron de manera significativa la expresión de este gen en relación a la cepa sin tratamiento.

- ❖ El extracto de acetato de etilo (EAcOEt) y el compuesto 3 fueron las sustancias que redujeron de manera significativa la expresión de los genes regulados por el sistema de percepción de quórum (*lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR*, *lasB*, *phz*, *toxA*) en relación a la cepa sin tratamiento de PA64. En la cepa PA14, el efecto del EAcOEt solo disminuyeron de manera significativa la expresión de los genes *lasR*, *rhII*, *rhIR*, *phz*, *toxA*, mientras que el compuesto 3 tuvo efecto significativo en la reducción de la expresión de los genes *rhII*, *lasB*, *phz*, *toxA*.

9.0 REFERENCIAS

1. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8(6):423–435.
2. Calvo, J. LM-M (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Elsevier- Enfermedades Infecc y Microbiol Clin* 27((1)):44–52.
3. World Health (2014) *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance* Available at: apps.who.int.
4. World Health (2017) *Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use 5th rev.* Available at: apps.who.int.
5. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA (2017) Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J Antibiot (Tokyo)* 70(1):3–24.
6. Guentzel MN (1996) *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus* (University of Texas Medical Branch at Galveston) Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413290> [Accessed December 26, 2018].
7. Gobernado M, Quimioterap CA-RE (2007) Introducción a los carbapenémicos. *seq.es*:23.
8. Casellas JM, Blanco MG, Pinto ME (1994) The sleeping giant. Antimicrobial resistance. *Infect Dis Clin North Am* 8(1):29–45.
9. Claudio, Reynolds ND, Simons mp (2016) *Emerging antibiotic resistance: a global threat and critical healthcare problem* (Instituto Nacional de Salud)
10. Reuter K, Steinbach A, Helms V (2016) Interfering with Bacterial Quorum Sensing. *Perspect Medicin Chem* 8:PMC.S13209.
11. Magiorakos A-P, et al. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(3):268–281.
12. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22(4):582–610.
13. Lomovskaya O Warren MIA (2001) Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Am Soc Microbiol-Antimicrobial agents Chemother* 45(1):105–116.
14. Lodge J, Minchin LP (1990) Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC β -lactamase. *Biochem J* 272((3)):627–631.
15. Jacoby G (2009) AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22(1):161–182.
16. Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape CJ (2015) The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Elsevier- Drug Resist* 21:41–59.
17. Rahme L, Tan M LL et al. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 94((24)):13245–13250.
18. Tam M-W A (2000) *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Elsevier* 3((1)):29–34.
19. Soberón-Chávez G, Palmeros B (1994) *Pseudomonas* Lipases: Molecular Genetics and Potential Industrial Applications. *Crit Rev Microbiol* 20(2):95–105.
20. Hardalo C, Edberg SC (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk from Drinking Water. *Crit Rev Microbiol* 23(1):47–75.

21. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James G (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176((8)):2137–42.
22. Nickel J, Ruseska I, Wright J et al. (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 27((4)):619–24.
23. Latifi A, et al. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 17(2):333–343.
24. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21(6):1137–1146.
25. Stover C, Pham X, Erwin SM (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959.
26. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B (2011) *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol* 2:150.
27. Gaytán-Alcocer M (2015) Diagnóstico molecular de *pseudomonas aeruginosa*. *ri.uaemex.mx*.
28. Stover C, Pham X, Erwin SM (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *nature.com*. Available at: <https://www.nature.com/articles/35023079> [Accessed December 26, 2018].
29. Lee D, Urbach, JM GW (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7((10)):90.
30. He J, Baldini R, Deziel E et al. (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci* 101((8)):2530–2535.
31. Schmidt K, Tümmler B RU (1996) Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J Bacteriol* 178((1)):85–93.
32. et al. L. Wiehlmann GWCN (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 104((19)):8101–8106.
33. Römling U, J Wingender, H Müller BT (1994) A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol* 60((6)):1734–8.
34. Lu H-M, Motley ST, Lory S (1997) Interactions of the components of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and extracellular protein secretion. *Mol Microbiol* 25(02):247–259.
35. C Kiewitz BT (2000) Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol* 182((11)):3125–3135.
36. Rossolini, GM EM (2005) Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Elsevier-Clinical Microbiol Infect* 11(4):17–32.
37. Martínez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A (2008) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Infect Dis* 47(12):1526–1533.
38. Trouillet J, Vuagnat AC *Pseudomonas aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia: Comparison of Episodes Due to Piperacillin-Resistant versus

- Piperacillin-Susceptible Organisms. *Clin Infect Dis* 34(8):1047–1054.
39. Vallés J, Mariscal D, Cortés P, Coll AV (2004) Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with. *Springer* 30(9):1768–1775.
 40. Hayes D, Farrell PM, Li Z, West SE (2010) *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 45(1):55–61.
 41. Mahar P, Padiglione A, Cleland H, Paul E, Burns MH (2010) *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in burns patients: risk factors and outcomes. *Elsevier* 36(8):1228–1233.
 42. Kunin CMC (2001) Nosocomial urinary tract infections and the indwelling catheter: what is new and what is true? *search.proquest.com* 120(1):10–12.
 43. Mojena Rodríguez G, Santisteban Aguilera F, García Alarcón Y, Rodríguez Martínez Y & CRA (2017) Caracterización clínica, epidemiológica y terapéutica de los pacientes con otitis externa maligna. *Clin Epidemiol Ther Charact patients with Malig Extern otitis* 21(3):287–297.
 44. Schechner V, Gottesman (2011) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia upon hospital admission: risk factors for mortality and influence of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71(1):38–45.
 45. Blackwood L, Stone, RM BI (1983) Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infect Immun* 39(1):198–201.
 46. Roy-Burman A, Savel, RH SR (2001) Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Infect Dis* 183(12):1767–1774.
 47. Wolz C, Hohloch K, Ocaktan AP- (1994) Iron release from transferrin by pyoverdine and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 62(9):4021–4027.
 48. Yanagihara K (2003) Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. *J Med Microbiol* 52(6):531–535.
 49. Kessler E, Safrin M, Olson JC & O DE (2012) Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem* 268(10):7503–7508.
 50. Daddaoua A, et al. (2012) Genes for Carbon Metabolism and the ToxA Virulence Factor in *Pseudomonas aeruginosa* Are Regulated through Molecular Interactions of PtxR and PtxS. *PLoS One* 7(7):e39390.
 51. Laarman A, Bardoel BRM- (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol* 188(1):386–393.
 52. Lequette Y, Greenberg EP (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187(1):37–44.
 53. Jensen V, Löns, D, Zaoui C BFZ (2006) RhIR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways. *Am Soc Microbiol* 118(24):8601–8606.
 54. Adam EC, Mitchell, B S, Schumacher DU GG, Schumacher DU, Grant G, Schumacher U (1997) *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med* 155(6):2102–4.
 55. Denning GM, et al. (1998) *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8

- expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* 66(12):5777–84.
56. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D (2004) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 72(7):4275–8.
 57. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP (1996) CENSUS AND CONSENSUS IN BACTERIAL ECOSYSTEMS: The LuxR-LuxI Family of Quorum-Sensing Transcriptional Regulators. *Annu Rev Microbiol* 50(1):727–751.
 58. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001) Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annu Rev Genet* 35(1):439–468.
 59. Beck von Bodman S, Farrand SK (1995) Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J Bacteriol* 177(17):5000–8.
 60. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55(1):165–199.
 61. Lee J, et al. (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 9(5):339–343.
 62. Déziel E, et al. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5):1339–44.
 63. Pesci EC, et al. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 96(20):11229–11234.
 64. Camilli A, et al. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Sci* 311(5764):1113–6.
 65. Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1):26–41.
 66. Diggle SP, et al. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50(1):29–43.
 67. Reuter K, Steinbach A, Helms V (2016) Interfering with bacterial quorum sensing. *Perspect Medicin Chem*. doi:10.4137/PMC.s13209.
 68. Strateva T, Mitov I (2011) Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* 61(4):717–732.
 69. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179(10):3127–32.
 70. Parkins MD, Ceri H, Storey DG (2001) *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* 40(5):1215–1226.
 71. Ledgham F, Soscia C, Chakrabarty A, Lazdunski A, Foglino M (2003) Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Res Microbiol* 154(3):207–213.
 72. Westfall LW, et al. (2006) *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF - oprN*. *FEMS Microbiol Lett* 255(2):247–254.
 73. Juhas M, et al. (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Soc* 150(4):831–841.
 74. Seet Q, Zhang L-H (2011) Anti-activator QslA defines the quorum sensing threshold and response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 80(4):951–965.

75. Rapp RP (1998) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous and Oral Azithromycin: Enhanced Tissue Activity and Minimal Drug Interactions. *Ann Pharmacother* 32(7–8):785–793.
76. Persson T, Givskov M, Nielsen J (2005) Quorum Sensing Inhibition: Targeting Chemical Communication in Gramnegative Bacteria. *Curr Med Chem* 12(26):3103–3115.
77. Mah T-F, et al. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426(6964):306–310.
78. Manefield M, et al. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiol Soc* 145(2):283–291.
79. Vestby LK, et al. (2010) A synthetic furanone potentiates the effect of disinfectants on *Salmonella* in biofilm. *J Appl Microbiol* 108(3):771–778.
80. He Z, et al. (2012) Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. *Int J Antimicrob Agents* 40(1):30–35.
81. Rice SA, et al. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol Soc* 148(1):87–102.
82. Harvey AL (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 13(19–20):894–901.
83. Kalia VC (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv* 31(2):224–245.
84. Kinoshita H, et al. (1997) Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* 179(22):6986–93.
85. Martinelli D, Grossmann G, Séquin U, Brandl H, Bachofen R (2004) Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol* 4(1):25.
86. Thenmozhi R, Nithyanand P, Rathna J, Karutha Pandian S (2009) Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57(3):284–294.
87. Paul D, Kim YS, Ponnusamy K, Kweon JH (2009) Application of Quorum Quenching to Inhibit Biofilm Formation. *Environ Eng Sci* 26(8):1319–1324.
88. Rasmussen TB, et al. (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 151(5):1325–1340.
89. Uroz S, Heinonsalo J (2008) Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65(2):271–278.
90. Zhu H, He CC, Chu Q-H (2011) Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Lett Appl Microbiol* 52(3):269–274.
91. Bodini SF, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F (2009) Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and *p*-coumaric acid. *Lett Appl Microbiol* 49(5):551–555.
92. Bjarnsholt T, et al. (2005) Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 151(12):3873–3880.
93. Keshavan ND, Chowdhary PK, Haines DC, González JE (2005) L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 187(24):8427–36.
94. Vatter DA, Mihalik K, Crixell SH, McLean RJC (2007) Dietary phytochemicals as

- quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia* 78(4):302–310.
95. Jadhav U, Ezhilarasan R, Vaughn SF, Berhow MA, Mohanam S (2007) Dietary Isothiocyanate Iberin Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *J Pharmacol Sci* 103(2):247–251.
 96. Tan SY-Y, et al. (2014) Comparative systems biology analysis to study the mode of action of the isothiocyanate compound Iberin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 58(11):6648–59.
 97. Barbour MG (1969) Age and Space Distribution of the Desert Shrub *Larrea Div Aricata*. *Ecology* 50(4):679–685.
 98. Sakakibara M, Difeo D, Nakatani N, Timmermann B, Mabry TJ (1976) Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. Divaricata*. *Phytochemistry* 15(5):727–731.
 99. Hunziker JH, Palacios RA, Valesi AG De, Poggio L (1972) Species Disjunctions in *Larrea*: Evidence From Morphology, Cytogenetics, Phenolic Compounds, and Seed Albumins. *Ann Missouri Bot Gard* 59(2):224.
 100. R.H. Lira-Saldívar. (2003) Revista mexicana de fitopatología. *Rev Mex Fitopatol* 21(2):214–222.
 101. Belmares H, et al. (1979) New Rubber Antioxidants and Fungicides Derived from *Larrea Tridentata* (Creosote Bush). *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 18(3):220–226.
 102. Ruiz-Martinez J, Ascacio JA, Rodriguez R, Morales D, Aguilar CN (2011) Journal of medicinal plant research. *J Med Plants Res* 5(13):2791–2797.
 103. Pinzón SM (2009) *Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana* (UNAM, México). 9a Ed.
 104. Estrada E (2009) *Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana* (Universidad Nacional Autónoma de México, México). 5a Ed.
 105. Jardine K, et al. (2010) Volatile organic compound emissions from *Larrea tridentata* (creosotebush). *Atmos Chem Phys* 10(24):12191–12206.
 106. Martins S, Aguilar CN, Teixeira JA, Mussatto SI (2012) Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Sep Purif Technol* 88:163–167.
 107. Rzedowski J (1987) Atlas cultural de México; flora/. 222.
 108. C.L García, Martínez A.R OJL (2010) Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva* 2(9):9–18.
 109. Velazquez Monreal J (1983) Evaluacion del poder bactericida o bacteriostatico de la fraccion etanolica de la resina de gobernadora contra las bacterias fitopatogenas (*erwinia amylovora*, *erwinia atroseptica* y *pseudomonas solanacearum*)./ Jose Joaquin, Velazquez Monreal. dissertation (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México). doi:qk 591.z9 .v44 1983.
 110. Hui-Zheng X, et al. (1988) 3 β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 β -(4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27(1):233–235.
 111. Youngren JF, et al. (2005) Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA) Inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu Receptors and Suppresses Growth in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res Treat* 94(1):37–46.
 112. Bashyal B, Li L, Bains T, Debnath A, LaBarbera D V. (2017) *Larrea tridentata*: A novel source for anti-parasitic agents active against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Naegleria fowleri*. *PLoS Negl Trop Dis* 11(8):32–58.
 113. Chan JKW, et al. (2018) Nordihydroguaiaretic Acid, a Lignan from *Larrea tridentata* (Creosote Bush), Protects Against American Lifestyle-Induced Obesity Syndrome Diet-Induced Metabolic Dysfunction in Mice. *J Pharmacol Exp Ther*

- 365(2):281–290.
114. Roškar I, Štrukelj B, Lunder M (2016) Screening of Phenolic Compounds Reveals Inhibitory Activity of Nordihydroguaiaretic Acid Against Three Enzymes Involved in the Regulation of Blood Glucose Level. *Plant Foods Hum Nutr* 71(1):88–89.
 115. Park S, Heo Y, Choi Y, Microbiology ED (2005) undefined Conserved virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* are required for killing *Bacillus subtilis*. *espace.inrs.ca*. Available at: <http://espace.inrs.ca/id/eprint/2244>
 116. Perlmann GE LL (1970) *Methods enzymology* (Proteolytic Enzymes). Vol-19 Available at: https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0,5&q=Perlmann+GE,+Loren+L.+Methods+enzymology+Vol-19,+Proteolytic+Enzymes+1970%3A665-73.
 117. Yoani Vicedo Y, Vicedo A, García JC (2000) Capacidad inhibitoria de la actividad proteolítica del Elhibin: su efecto en suero de pacientes quemados. *Rev Cuba Investig Biomédicas* 19(3):172–177.
 118. Siddique M, Farooq R, Of AS (2011) Removal of Reactive Blue 19 from wastewaters by physicochemical and biological processes-A Review. *J Chem Soc Pak* 33(1):284–293.
 119. Kurachi M (1958) Studies on the biosynthesis of pyocyanine.(II): Isolation and determination of pyocyanine. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* 1(1):174–187.
 120. Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K (2014) Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Int J Mol Epidemiol Genet* 5(3):125–34.
 121. Toschka HY, et al. (1988) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* 16(5):2348.
 122. Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17(4):840–62, table of contents.
 123. Pereira F, et al. (2010) Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res* 38(22):e203–e203.
 124. Mavrodi D V, et al. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183(21):6454–65.
 125. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH (2007) The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* 67(3):351–368.
 126. Juhas M, Eberl L, Tummler B (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 7(4):459–471.
 127. Gambello MJ, Iglewski BH (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173(9):3000–9.
 128. Rampioni G, et al. (2007) RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 66(6):1557–1565.
 129. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185(7):2080–95.
 130. Yang L, et al. (2008) In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol* 190(8):2767–76.
 131. Heurlier K, et al. (2005) Quorum-sensing-negative (lasR) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J Bacteriol* 187(14):4875–83.

132. Schuster M, Peter Greenberg E (2006) A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296(2–3):73–81.
133. Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M (2009) Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol* 73(6):1072–1085.
134. Brint JM, Ohman DE (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177(24):7155–63.
135. Dekimpe V, Deziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155(3):712–723.
136. Bouyahya A, Dakka N, Et-Touys A, Abrini J, Bakri Y (2017) Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pac J Trop Med* 10(8):729–743.
137. Lu C, et al. (2014) Optimization of anti-virulence PqsR antagonists regarding aqueous solubility and biological properties resulting in new insights in structure–activity relationships. *Eur J Med Chem* 79:173–183.
138. Déziel E, et al. (2004) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhIRI or the production of N-acyl- L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55(4):998–1014.
139. Paracatu LC, et al. (2015) Hydrophobicity and antioxidant activity acting together for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid. *Food Funct* 6(6):1818–1831.
140. Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013:162750.
141. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13(10):572–584.
142. Vasavi HS, Arun AB, Rekha P-D (2014) Anti-quorum sensing activity of *Psidium guajava* L. flavonoids against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol Immunol* 58(5):286–293.
143. Paczkowski JE, et al. (2017) Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. *J Biol Chem* 292(10):4064–4076.
144. Vandeputte OM, et al. (2011) The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 157(7):2120–2132.

10. ANEXOS

10.1 Cálculo de concentraciones

Se calcularon las concentraciones a 100, 10 y 1 μM a partir de 0.100 g de muestra en 1 mL de disolvente (DMSO).

Fórmulas

$$M = \frac{n}{V} = \frac{m}{PM} \frac{1}{V} \quad n = \frac{\text{masa}}{\text{moles}} \quad V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Milimolar (mM)	Molar (M)	Micromolar (μM)
1000	1	1,000,000
100	0.1	100,000
10	0.01	10,000
1	0.001	1,000
0.1	0.0001	100
0.01	0.00001	10
0.001	0.000001	1

Compuesto 1

PM= 298.16 g/mol

$$M = \left(\frac{0.100 \text{ g}}{298.16 \text{ g/mol}} \right) / (1 \text{ mL}) \left(\frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 0.335 \text{ M}$$

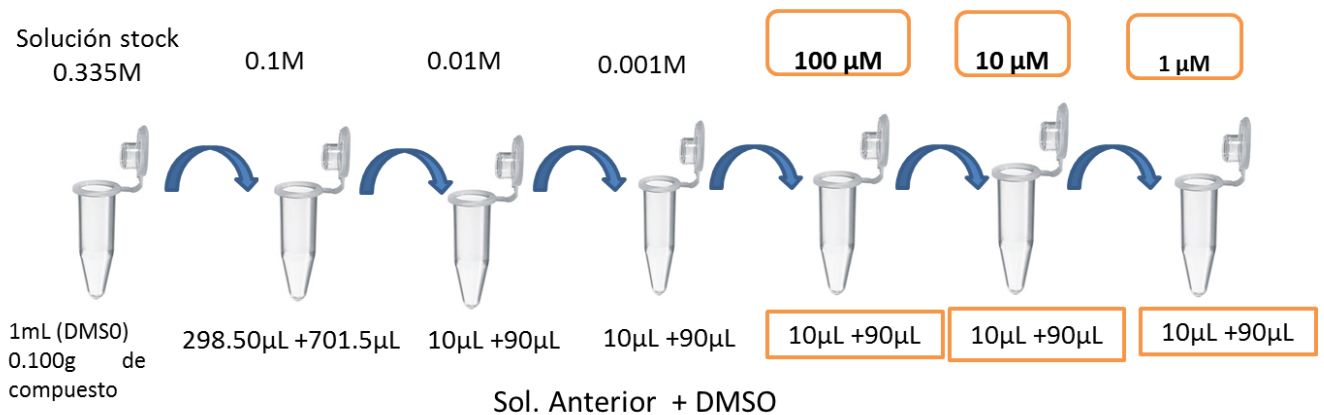
V= 1 mL

$C_1 = 0.335 \text{ M}$

$$V_1 = \frac{(1000 \mu\text{L})(0.1 \text{ M})}{(0.335 \text{ M})} = 298.50 \mu\text{L}$$

$C_2 = 0.1 \text{ M}$

$V_2 = 1 \text{ mL (1000 } \mu\text{L)}$



Compuesto 2

$$PM = 302.36 \text{ g/mol} \quad M = \left(\frac{0.100 \text{ g}}{302.36 \text{ g/mol}} \right) / (1 \text{ mL}) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 0.330 \text{ M}$$

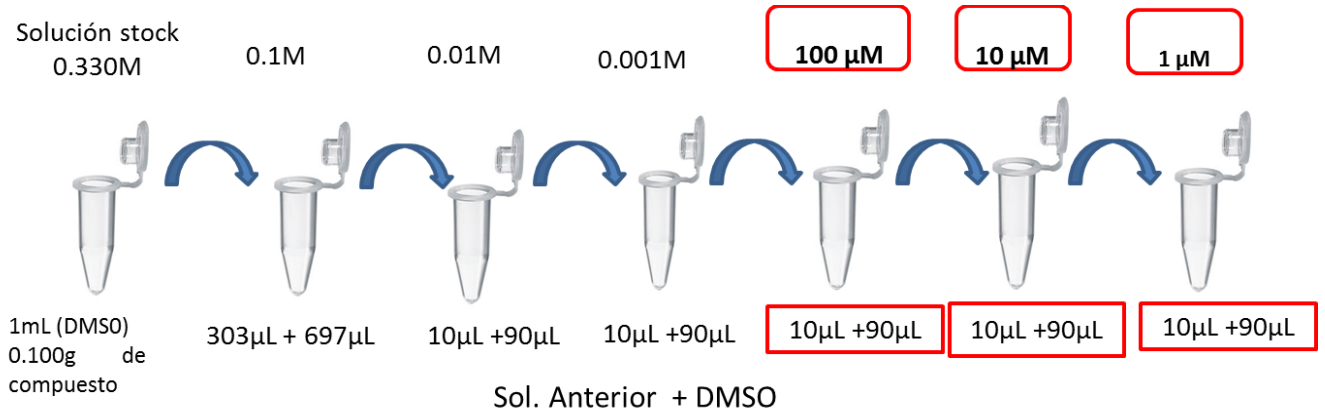
$$V = 1 \text{ mL}$$

$$C_1 = 0.330 \text{ M}$$

$$V_1 = \frac{(1000 \mu\text{L})(0.1 \text{ M})}{(0.330 \text{ M})} = 303.03 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0.1 \text{ M}$$

$$V_2 = 1 \text{ mL (1000 } \mu\text{L)}$$

**Compuesto 3**

$$PM = 298.16 \text{ g/mol} \quad M = \left(\frac{0.100 \text{ g}}{298.16 \text{ g/mol}} \right) / (1 \text{ mL}) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 0.335 \text{ M}$$

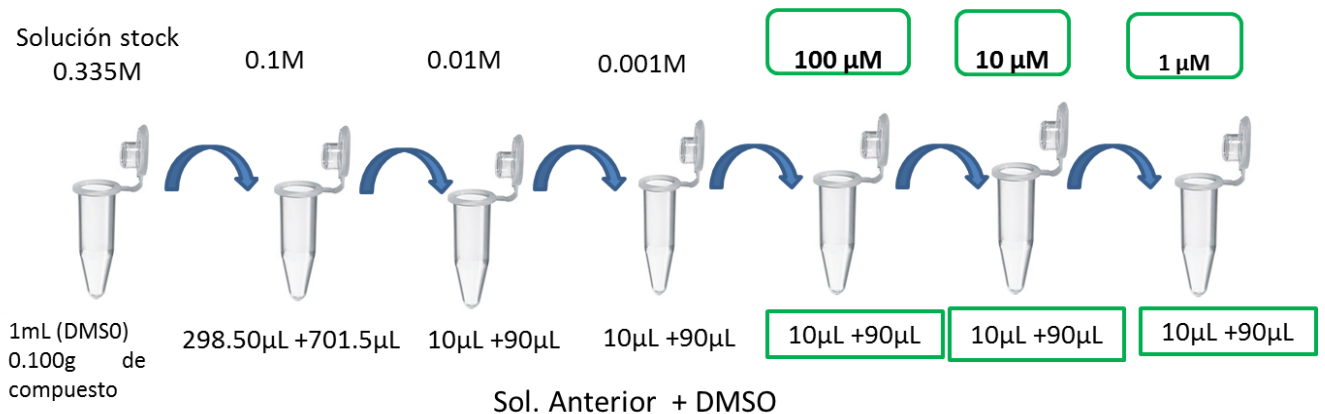
$$V = 1 \text{ mL}$$

$$C_1 = 0.335 \text{ M}$$

$$V_1 = \frac{(1000 \mu\text{L})(0.1 \text{ M})}{(0.335 \text{ M})} = 298.50 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0.1 \text{ M}$$

$$V_2 = 1 \text{ mL (1000 } \mu\text{L)}$$



Compuesto 4

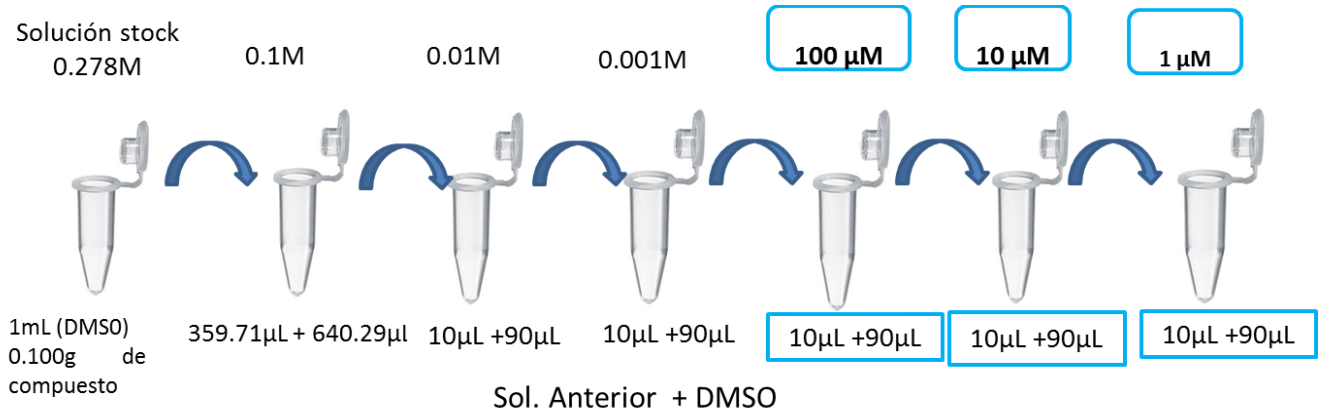
PM= 359.11 g/mol

$$M = \left(\frac{0.100 \text{ g}}{359.11 \text{ g/mol}} \right) / (1 \text{ mL}) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 0.278 \text{ M}$$

V= 1 mL

C₁= 0.278 M

$$V_1 = \frac{(1000 \mu\text{L})(0.1 \text{ M})}{(0.278 \text{ M})} = 359.71 \mu\text{L}$$

C₂= 0.1 MV₂= 1 mL (1000 μL)**Compuesto 5**

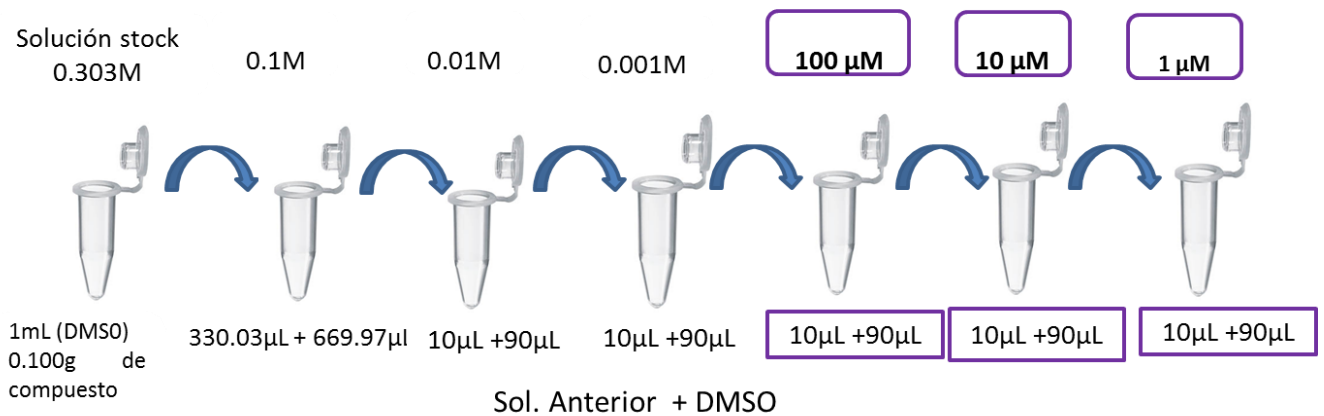
PM= 330.07 g/mol

$$M = \left(\frac{0.100 \text{ g}}{330.07 \text{ g/mol}} \right) / (1 \text{ mL}) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 0.303 \text{ M}$$

V= 1 mL

C₁= 0.303 M

$$V_1 = \frac{(1000 \mu\text{L})(0.1 \text{ M})}{(0.303 \text{ M})} = 330.03 \mu\text{L}$$

C₂= 0.1 MV₂= 1 mL (1000 μL)

Compuesto 6

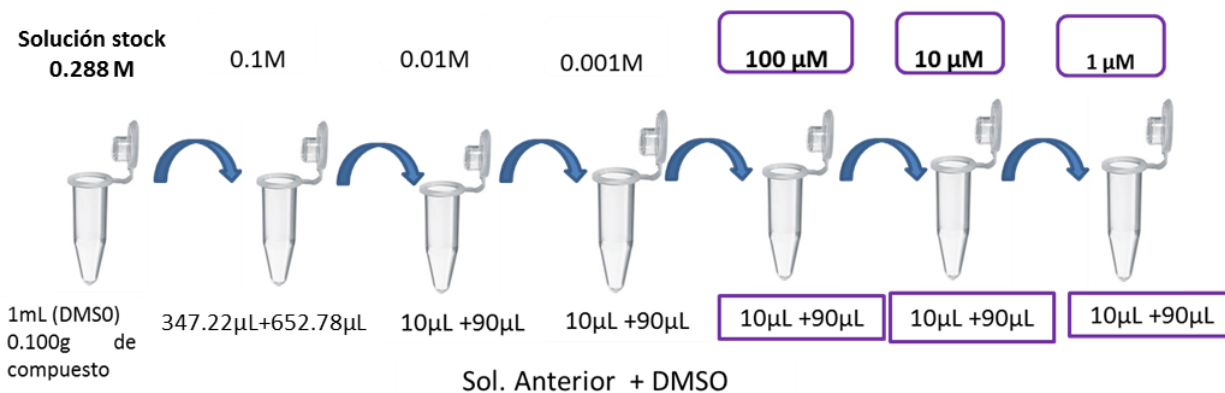
PM= 346.29 g/mol

$$M = \left(\frac{0.100 \text{ g}}{346.29 \text{ g/mol}} \right) / (1 \text{ mL}) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) = 0.288 \text{ M}$$

V= 1 mL

C₁= 0.288 M

$$V_1 = \frac{(1000 \mu\text{L})(0.1 \text{ M})}{(0.288 \text{ M})} = 347.22 \mu\text{L}$$

C₂= 0.1 MV₂= 1 mL (1000 μL)

10.2 Crecimiento bacteriano de las cepas PA14 y PA64

A continuación se presenta la tabla de los resultados de crecimiento de las cepas PA14 y PA64 después de cada tratamiento por metabolitos secundarios y un EAcOEt de *L. tridentata*, así como de sus respectivos controles (media aritmética, desviación estándar). El crecimiento se cuantificó después de 24 h de incubación a 37°C.

Para el caso de los tratamientos de crecimiento bajo C-30 se hicieron mediciones a 100 µM, 75 µM, 50 µM, 10 µM y 1 µM debido a que a 100 y 75 µM las bacterias no crecieron lo suficiente debido a la actividad bactericida de este compuesto a esas concentraciones, por lo que para este compuesto se hicieron mediciones de C-30 a 1, 10 y 50 µM.

Tabla 8.1 Crecimiento bacteriano bajo C-30

Concen.	Tratamiento	Cepa PA14		Cepa PA64	
		\bar{x}		\bar{x}	
100 µM	C-30	0.01076	0.0097 ± 0.0123	0.00796	0.0064 ± 0.0093
75 µM		0.09136	0.0870 ± 0.0973	0.0937	0.0876 ± 0.1002
50 µM		0.23653	0.2297 ± 0.2455	0.2367	0.2301 ± 0.2433
10 µM		0.24773	0.2416 ± 0.2518	0.2515	0.2498 ± 0.2544
1 µM		0.25906	0.2578 ± 0.2601	0.2455	0.2365 ± 0.2587

Tabla 8.2 Crecimiento bacteriano.

Concen.	Tratamiento	Cepa PA14		Cepa PA64	
		\bar{x}		\bar{x}	
100 µM	Cepa sin tratamiento	0.260366	0.2443 ± 0.2816	0.24906	0.2076 ± 0.2753
	DMSO	0.2549	0.2356 ± 0.2723	0.2447	0.2286 ± 0.2587
	C-30 (50 µM)	0.264183	0.2365 ± 0.2773	0.2732	0.2576 ± 0.2943
	Extracto AcOEt	0.255116	0.2348 ± 0.2667	0.28123	0.2589 ± 0.3034
	Compuesto 1	0.239283	0.2076 ± 0.2642	0.26305	0.2479 ± 0.2768
	Compuesto 2	0.244666	0.2212 ± 0.2602	0.26798	0.2563 ± 0.2814
	Compuesto 3	0.226025	0.2173 ± 0.2356	0.22605	0.2017 ± 0.2447
	Compuesto 4	0.21985	0.1987 ± 0.2419	0.26088	0.2456 ± 0.2748
	Compuesto 5	0.22135	0.1987 ± 0.2378	0.26946	0.2628 ± 0.2789
10 µM	Compuesto 6	0.25677	0.2387 ± 0.2896	0.23233	0.1974 ± 0.2543
	Cepa sin tratamiento	0.2727	0.2552 ± 0.2993	0.2921	0.2658 ± 0.3076
	DMSO	0.2597	0.2467 ± 0.2874	0.27555	0.2459 ± 0.2924
	C-30	0.231875	0.2074 ± 0.2689	0.25845	0.2456 ± 0.2665
	Extracto AcOEt	0.2331	0.2019 ± 0.2567	0.24135	0.1965 ± 0.2654
Compuesto 1	0.248975	0.2062 ± 0.2876	0.246325	0.2375 ± 0.2579	

	Compuesto 2	0.265725	0.2168 ± 0.3091	0.246775	0.2115 ± 0.2754
	Compuesto 3	0.251225	0.2254 ± 0.2753	0.259175	0.2447 ± 0.2682
	Compuesto 4	0.219825	0.2118 ± 0.2354	0.262125	0.2453 ± 0.2777
	Compuesto 5	0.228825	0.2020 ± 0.2567	0.25685	0.2423 ± 0.2654
	Compuesto 6	0.24415	0.2293 ± 0.2673	0.23542	0.2278 ± 0.2431
1 μM	Cepa sin tratamiento	0.29565	0.2785 ± 0.3091	0.30515	0.2869 ± 0.3346
	DMSO	0.28272	0.2748 ± 0.2892	0.2925	0.2817 ± 0.3043
	C-30	0.25935	0.2345 ± 0.2782	0.26535	0.2367 ± 0.289
	Extracto AcOEt	0.27462	0.2567 ± 0.2889	0.27279	0.2504 ± 0.2852
	Compuesto 1	0.30217	0.2890 ± 0.3123	0.29072	0.2743 ± 0.312
	Compuesto 2	0.27057	0.2470 ± 0.2894	0.29187	0.2765 ± 0.3086
	Compuesto 3	0.2835	0.2679 ± 0.2996	0.28775	0.2679 ± 0.3186
	Compuesto 4	0.247825	0.2103 ± 0.2679	0.274325	0.2641 ± 0.2907
	Compuesto 5	0.263975	0.2456 ± 0.2753	0.279675	0.2689 ± 0.289
	Compuesto 6	0.273875	0.2569 ± 0.296	0.2648	0.2245 ± 0.2869

10.3 Cuantificación de elastasa

La tabla 8.3 muestra los resultados de la cuantificación de elastasa *in vitro* de las cepas PA14 y PA64 después de cada tratamiento así como de sus respectivos controles (media aritmética, desviación estándar). La cuantificación se obtuvo después de un periodo de crecimiento y posteriormente a 1 h de incubación a 37°C.

Concen.	Tratamiento	Cepa PA14		Cepa PA64	
		\bar{x}		\bar{x}	
100 μ M	Cepa sin tratamiento	0.415266	0.3931 \pm 0.4416	0.3833	0.3588 \pm 0.3997
	DMSO	0.402333	0.3785 \pm 0.4276	0.37101	0.3488 \pm 0.3898
	C-30 (50 μ M)	0.333766	0.3021 \pm 0.3678	0.25998	0.2465 \pm 0.2684
	Extracto AcOEt	0.35965	0.3348 \pm 0.3802	0.27765	0.2547 \pm 0.2967
	Compuesto 1	0.391633	0.3793 \pm 0.4029	0.37325	0.3579 \pm 0.3878
	Compuesto 2	0.346183	0.3212 \pm 0.3678	0.36306	0.3563 \pm 0.3714
	Compuesto 3	0.329533	0.3178 \pm 0.3417	0.32398	0.3017 \pm 0.3447
	Compuesto 4	0.37513	0.3587 \pm 0.3902	0.36528	0.3456 \pm 0.3785
	Compuesto 5	0.37854	0.3636 \pm 0.4095	0.36508	0.3561 \pm 0.3789
	Compuesto 6	0.39285	0.3746 \pm 0.4087	0.27398	0.2547 \pm 0.2956
10 μ M	Cepa sin tratamiento	0.3727	0.3552 \pm 0.3993	0.3546	0.3076 \pm 0.3874
	DMSO	0.3514	0.3354 \pm 0.3674	0.34552	0.3145 \pm 0.3652
	C-30	0.33187	0.3074 \pm 0.3689	0.28845	0.2756 \pm 0.2965
	Extracto AcOEt	0.3331	0.3019 \pm 0.3567	0.32385	0.3056 \pm 0.3379
	Compuesto 1	0.38397	0.3662 \pm 0.3957	0.34632	0.3375 \pm 0.3579
	Compuesto 2	0.38072	0.3576 \pm 0.4091	0.38677	0.3564 \pm 0.4115
	Compuesto 3	0.38122	0.3653 \pm 0.3954	0.37417	0.3596 \pm 0.4047
	Compuesto 4	0.32732	0.3187 \pm 0.3354	0.36212	0.3453 \pm 0.3777
	Compuesto 5	0.34837	0.3345 \pm 0.3621	0.3568	0.3423 \pm 0.3654
	Compuesto 6	0.35665	0.3341 \pm 0.3793	0.33542	0.3278 \pm 0.3431
1 μ M	Cepa sin tratamiento	0.32065	0.2785 \pm 0.398	0.34107	0.2907 \pm 0.3869
	DMSO	0.311975	0.2562 \pm 0.3762	0.33087	0.3764 \pm 0.2953
	C-30	0.31435	0.3079 \pm 0.3245	0.28535	0.2987 \pm 0.267
	Extracto AcOEt	0.374625	0.3567 \pm 0.3889	0.37272	0.3852 \pm 0.3504
	Compuesto 1	0.412175	0.3890 \pm 0.4378	0.36572	0.3890 \pm 0.312
	Compuesto 2	0.370575	0.3470 \pm 0.3894	0.36687	0.3968 \pm 0.3086
	Compuesto 3	0.3835	0.3679 \pm 0.3996	0.33775	0.3778 \pm 0.2867
	Compuesto 4	0.347825	0.3103 \pm 0.3679	0.29932	0.3645 \pm 0.2641
	Compuesto 5	0.363975	0.3456 \pm 0.3753	0.37967	0.3890 \pm 0.3689
	Compuesto 6	0.373875	0.3569 \pm 0.396	0.3648	0.3869 \pm 0.3245

10.4 Cuantificación de proteasa alcalina

La tabla 8.3 muestra los resultados de la cuantificación de proteasa *in vitro* de las cepas PA14 y PA64 después de cada tratamiento así como de sus respectivos controles (media aritmética, desviación estándar). La cuantificación se obtuvo después de un periodo de crecimiento por 2 h de incubación a 37°C.

Tabla 8.4 Cuantificación de proteasa.

Tabla 8.4 Cuantificación de proteasa.					
Concen.	Tratamiento	Cepa PA14		Cepa PA64	
		\bar{x}		\bar{x}	
100 μM	Cepa sin tratamiento	0.3946	0.3783 \pm 0.4279	0.42138	0.3993 \pm 0.4376
	DMSO	0.387433	0.3698 \pm 0.4292	0.4156	0.3765 \pm 0.4321
	C-30 (50 μM)	0.297483	0.2841 \pm 0.3174	0.30073	0.2868 \pm 0.3147
	Extracto AcOEt	0.38453	0.3702 \pm 0.4053	0.434583	0.3977 \pm 0.4601
	Compuesto 1	0.3756	0.3567 \pm 0.389	0.39856	0.3901 \pm 0.4045
	Compuesto 2	0.35368	0.3431 \pm 0.3753	0.431633	0.4021 \pm 0.4589
	Compuesto 3	0.292216	0.2679 \pm 0.3092	0.341633	0.3246 \pm 0.3547
	Compuesto 4	0.374966	0.3587 \pm 0.3902	0.38808	0.3722 \pm 0.3987
	Compuesto 5	0.37513	0.3578 \pm 0.3995	0.44595	0.4205 \pm 0.4622
	Compuesto 6	0.394583	0.3866 \pm 0.4105	0.40111	0.3934 \pm 0.4213
10 μM	Cepa sin tratamiento	0.38527	0.3813 \pm 0.3874	0.35135	0.3367 \pm 0.3678
	DMSO	0.38012	0.3760 \pm 0.3869	0.3446	0.3305 \pm 0.3644
	C-30	0.308	0.2974 \pm 0.3201	0.30162	0.2956 \pm 0.3102
	Extracto AcOEt	0.3751	0.3617 \pm 0.3832	0.3742	0.3562 \pm 0.3876
	Compuesto 1	0.3828	0.3732 \pm 0.3901	0.3586	0.3512 \pm 0.3675
	Compuesto 2	0.35615	0.3423 \pm 0.3694	0.38825	0.3861 \pm 0.3934
	Compuesto 3	0.37185	0.3635 \pm 0.3802	0.37127	0.3622 \pm 0.3821
	Compuesto 4	0.3646	0.3514 \pm 0.3718	0.3576	0.3521 \pm 0.3623
	Compuesto 5	0.38322	0.3763 \pm 0.3934	0.35795	0.3459 \pm 0.3752
	Compuesto 6	0.39615	0.3856 \pm 0.4073	0.34315	0.3392 \pm 0.3512
1 μM	Cepa sin tratamiento	0.36082	0.3517 \pm 0.3725	0.37396	0.3632 \pm 0.3872
	DMSO	0.35825	0.3502 \pm 0.3678	0.36927	0.3458 \pm 0.3803
	C-30	0.30495	0.2968 \pm 0.3212	0.31255	0.2998 \pm 0.3245
	Extracto AcOEt	0.35175	0.3419 \pm 0.3676	0.38337	0.3678 \pm 0.3967
	Compuesto 1	0.40248	0.3873 \pm 0.4231	0.398725	0.3867 \pm 0.4125
	Compuesto 2	0.36675	0.3417 \pm 0.3894	0.40905	0.3902 \pm 0.4234
	Compuesto 3	0.38817	0.3745 \pm 0.4012	0.35868	0.3467 \pm 0.3656
	Compuesto 4	0.35880	0.3387 \pm 0.3721	0.3924	0.3678 \pm 0.4202
	Compuesto 5	0.34605	0.3245 \pm 0.3587	0.382025	0.3749 \pm 0.3876
	Compuesto 6	0.3708	0.3645 \pm 0.3789	0.369275	0.3634 \pm 0.3769

10.5 Cuantificación de piocianina

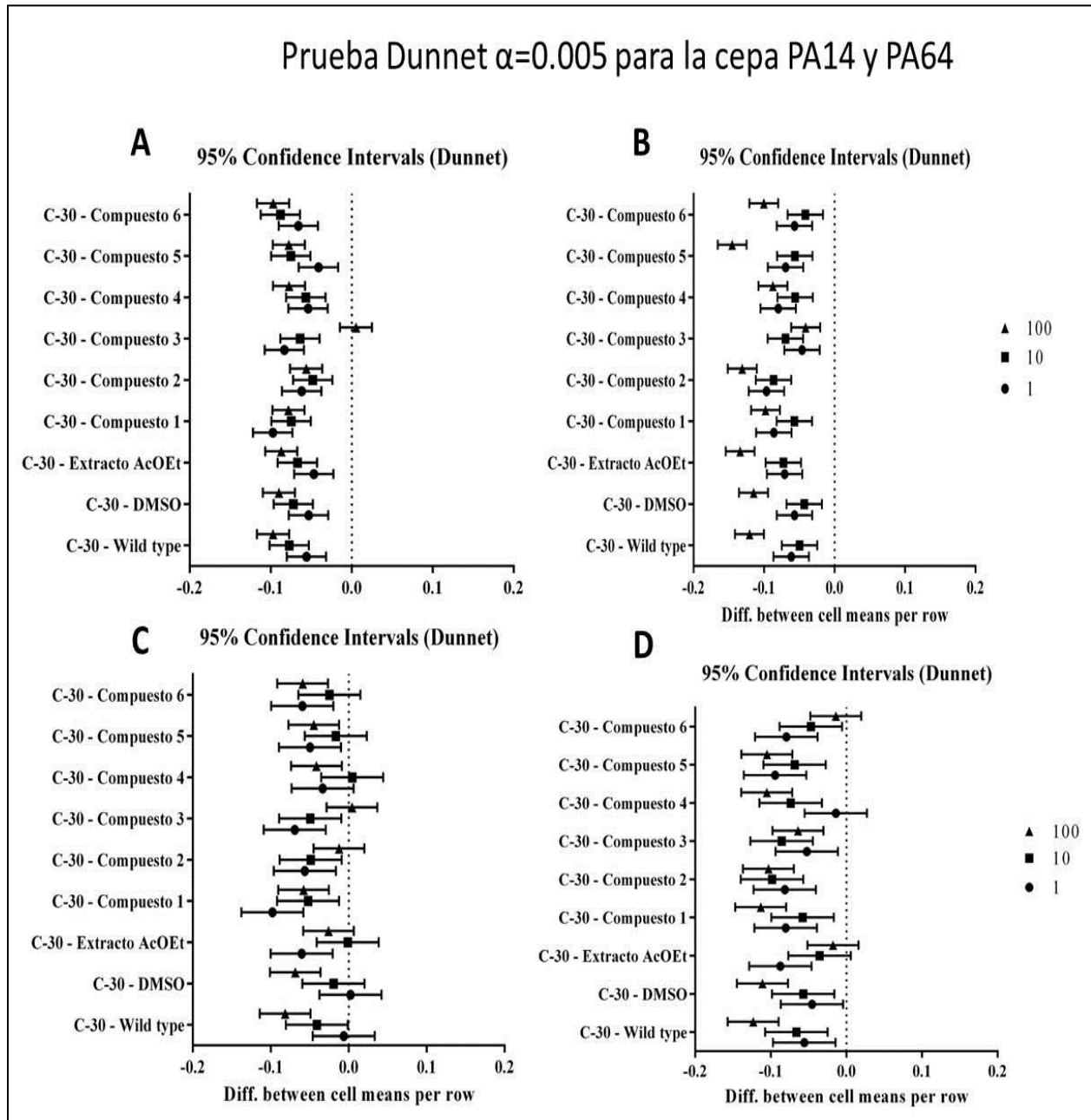
La tabla 8.5 muestra los resultados de la cuantificación de piocianina *in vitro* de las cepas PA14 y PA64 después de cada tratamiento así como de sus respectivos controles (media aritmética, desviación estándar). La cuantificación de piocianina se obtuvo después de un periodo de crecimiento de 24 h a 37°C.

Tabla 8.5 Cuantificación de piocianina.

Tabla 8.5 Cuantificación de piocianina.					
Concen.	Tratamiento	Cepa PA14		Cepa PA64	
		\bar{x}		\bar{x}	
100 μ M	Cepa sin tratamiento	0.0262	0.0248 \pm 0.027	0.022466	0.0214 \pm 0.0234
	DMSO	0.02546	0.0239 \pm 0.0268	0.022133	0.0212 \pm 0.0228
	C-30 (50 μ M)	0.01356	0.0129 \pm 0.0141	0.01348	0.0121 \pm 0.0147
	Extracto AcOEt	0.01395	0.0137 \pm 0.0142	0.01448	0.0140 \pm 0.0151
	Compuesto 1	0.01556	0.0149 \pm 0.0163	0.01473	0.0139 \pm 0.0158
	Compuesto 2	0.01685	0.0153 \pm 0.0212	0.01401	0.0135 \pm 0.0143
	Compuesto 3	0.01876	0.0179 \pm 0.0197	0.01366	0.0131 \pm 0.0141
	Compuesto 4	0.01803	0.0172 \pm 0.0192	0.01331	0.0124 \pm 0.0142
	Compuesto 5	0.02276	0.0211 \pm 0.0261	0.01378	0.0134 \pm 0.0141
	Compuesto 6	0.01945	0.0187 \pm 0.0201	0.00966	0.0084 \pm 0.0112
10 μ M	Cepa sin tratamiento	0.03085	0.0295 \pm 0.032	0.0265	0.0258 \pm 0.0272
	DMSO	0.02957	0.0278 \pm 0.0318	0.02582	0.0245 \pm 0.0269
	C-30	0.02292	0.0222 \pm 0.0235	0.02067	0.0197 \pm 0.0221
	Extracto AcOEt	0.0244	0.0237 \pm 0.0252	0.02777	0.0267 \pm 0.0287
	Compuesto 1	0.02065	0.0185 \pm 0.0232	0.02535	0.0245 \pm 0.0263
	Compuesto 2	0.01802	0.0167 \pm 0.0192	0.02635	0.0253 \pm 0.0272
	Compuesto 3	0.02792	0.0265 \pm 0.0293	0.0271	0.0262 \pm 0.0281
	Compuesto 4	0.02200	0.0200 \pm 0.0235	0.02762	0.0268 \pm 0.0283
	Compuesto 5	0.03877	0.0372 \pm 0.0402	0.02357	0.0228 \pm 0.0241
	Compuesto 6	0.02847	0.0272 \pm 0.0297	0.02117	0.0196 \pm 0.0221
1 μ M	Cepa sin tratamiento	0.02882	0.0282 \pm 0.0301	0.03617	0.0354 \pm 0.0372
	DMSO	0.02772	0.0267 \pm 0.0287	0.03367	0.0286 \pm 0.0367
	C-30	0.02275	0.0212 \pm 0.0237	0.02342	0.0224 \pm 0.0245
	Extracto AcOEt	0.0306	0.0289 \pm 0.032	0.03862	0.0378 \pm 0.0397
	Compuesto 1	0.02772	0.0268 \pm 0.0284	0.02685	0.0253 \pm 0.0282
	Compuesto 2	0.02942	0.0285 \pm 0.0301	0.03745	0.0302 \pm 0.0413
	Compuesto 3	0.02952	0.0285 \pm 0.0307	0.03582	0.0346 \pm 0.0366
	Compuesto 4	0.02665	0.0259 \pm 0.0275	0.03875	0.0367 \pm 0.0402
	Compuesto 5	0.04175	0.0398 \pm 0.0434	0.03842	0.0379 \pm 0.0389
	Compuesto 6	0.0279	0.0264 \pm 0.0292	0.0272	0.0264 \pm 0.0279

10.6 Gráficas de prueba Dunnet

La figura 16.2 muestra el análisis estadístico (Prueba de Dunnet) con $\alpha=0.005$ para los tratamientos de las cepas PA14 y PA64 bajo concentraciones a 100,10 y 1 μ M.



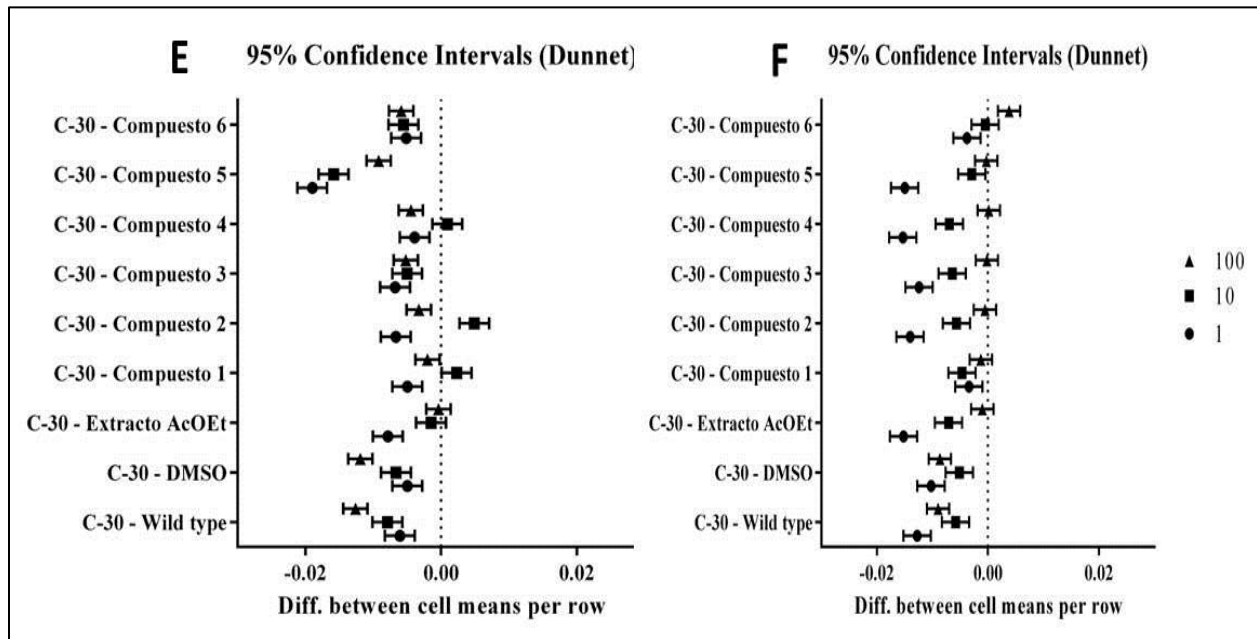


Figura 16.2 Gráficas de Dunnett de los valores numéricos obtenidos de la cuantificación de la producción de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*. La imagen (A) muestra los valores de proteasa de la cepa sin tratamiento PA 14, mientras que la figura (B) corresponde a los valores de proteasa registrados por la cepa farmacorresistente PA64. La figura (C) corresponde a valores de elastasa de la cepa PA14, mientras la figura (D) muestra valores de elastasa de la cepa PA64. La figura (E) muestran valores de piocianina de la cepa PA14, y la figura (F) muestra valores de la cepa PA64, con un intervalo de confianza de 95% ($\alpha=0.005$) bajo las tres concentraciones utilizadas (100, 10 y 1 μM). El eje inferior muestra las diferencias entre los valores registrados por cada tratamiento que corresponde al eje vertical respecto a C-30 contra todos los tratamientos, si los valores tienden a ser negativos significa que son datos superiores a los registrados por C-30. Si los valores tienden a ser positivos significan que son valores inferiores a los registrados por C-30 y si los valores se mantienen en cero, significa que no hay diferencia respecto a la cepa control.

10.7 Densitometría de imagen

La tabla 9 muestra los valores numéricos y porcentuales de la densitometría de Imagen para cada gen utilizado respecto a la cepa sin tratamiento, para ello, se normalizaron los resultados en función a los valores de la expresión del gen constitutivo 16s rRNA para cada cepa.

Tabla 9. Valores de densitometría de imagen para cada gen (*lasI, lasR, rhII, rhIR, lasB, phz* y *toxA*) en ambas cepas (PA14 y PA64) de *P. aeruginosa* bajo tratamiento de metabolitos secundarios y un EAcOEt de *Larrea tridentata*.

Gen <i>lasI</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo 16s rRNA (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	6045.497	16881.497	0.3581138	100
Compuesto 1	8974.891	16378.083	0.54798178	153.018895
Compuesto 2	8885.426	16533.497	0.53741964	150.069515
Compuesto 3	14889.74	16439.669	0.90572018	252.91407
Compuesto 4	8293.912	16598.376	0.49968214	139.531663
Compuesto 5	11632.79	16046.033	0.72496361	202.439452
Compuesto 6	5032.033	16300.376	0.30870656	86.2034811
Extracto de AcOEt	5095.962	16490.74	0.30901961	86.2908968
C-30	4588.033	15961.447	0.28744468	80.2662953
Gen <i>lasI</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	15190.083	16178.497	0.9389057	100
Compuesto 1	10271.255	16510.74	0.62209538	66.2574929
Compuesto 2	8999.912	16432.619	0.54768579	58.332354
Compuesto 3	5599.205	16375.619	0.34192326	36.4172099
Compuesto 4	8659.74	16607.617	0.52143182	55.536123
Compuesto 5	3569.891	15979.452	0.2234051	23.7941996
Compuesto 6	11346.276	16532.912	0.68628418	73.0940482
Extracto de AcOEt	4485.619	16417.497	0.27322186	29.1000318
C-30	5813.912	16795.912	0.34615042	36.8674321

Gen <i>lasR</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo 16s rRNA (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	15304	16881.497	0.90655467	100
Compuesto 1	13709.9	16378.083	0.8370882	92.33731
Compuesto 2	15969.6	16533.497	0.96589366	106.54555
Compuesto 3	16023.2	16439.669	0.97466683	107.513298
Compuesto 4	8765.7	16598.376	0.52810588	58.254168
Compuesto 5	3974.4	16046.033	0.24768739	27.3218367
Compuesto 6	6208.9	16300.376	0.38090532	42.0168066
Extracto de AcOEt	4264.1	16490.74	0.25857542	28.5228708
C-30	5373.9	15961.447	0.33668	37.1384111

Gen <i>lasR</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	9035.9	16178.497	0.55851294	100
Compuesto 1	15668	16510.74	0.94895807	169.907982
Compuesto 2	10508.03	16432.619	0.63946167	114.493617
Compuesto 3	3604	16375.619	0.22008328	39.4052252
Compuesto 4	7028.8	16607.617	0.42322749	75.7775609
Compuesto 5	8883.2	15979.452	0.55591393	99.534655
Compuesto 6	1016.4	16532.912	0.06147737	11.0073318
Extracto de AcOEt	668.698	16417.497	0.04073081	7.29272497
C-30	1005.7	16795.912	0.05987767	10.7209092

Gen <i>rhlI</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo 16s rRNA (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	14165.154	16881.497	0.83909348	100
Compuesto 1	8015.134	16378.083	0.48938169	58.322667
Compuesto 2	8667.326	16533.497	0.52422824	62.4755469
Compuesto 3	5993.134	16439.669	0.3645532	43.4460777
Compuesto 4	12769.205	16598.376	0.76930448	91.6828102
Compuesto 5	9952.447	16046.033	0.62024346	73.9182792
Compuesto 6	11129.74	16300.376	0.68279038	81.3723863
Extracto de AcOEt	4984.619	16490.74	0.30226776	36.0231328
C-30	3562.619	15961.447	0.22320151	26.6003147
Gen <i>rhlI</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	12717.669	16178.497	0.7860847	100
Compuesto 1	8273.497	16510.74	0.50109789	63.7460429
Compuesto 2	1925.719	16432.619	0.11718881	14.9079108
Compuesto 3	1971.891	16375.619	0.12041627	15.3184857
Compuesto 4	9745.69	16607.617	0.58682049	74.6510511
Compuesto 5	7191.962	15979.452	0.45007563	57.2553611
Compuesto 6	7596.205	16532.912	0.45945959	58.4491201
Extracto de AcOEt	5220.205	16417.497	0.31796595	40.449324
C-30	2926.719	16795.912	0.17425187	22.1670597

Gen <i>rhlR</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo 16s rRNA (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	12619.861	16881.497	0.7475558	100
Compuesto 1	9888.255	16378.083	0.60374923	80.7630989
Compuesto 2	12899.205	16533.497	0.78018613	104.364935
Compuesto 3	6960.79	16439.669	0.42341424	56.6398177
Compuesto 4	12751.033	16598.376	0.76820967	102.762854
Compuesto 5	12774.619	16046.033	0.79612319	106.496825
Compuesto 6	4799.74	16300.376	0.29445578	39.3891378
Extracto de AcOEt	2934.548	16490.74	0.17795126	23.804412
C-30	2212.447	15961.447	0.13861193	18.5420181

Gen <i>rhIR</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	14899.546	16178.497	0.92094748	100
Compuesto 1	4085.497	16510.74	0.24744481	26.8685045
Compuesto 2	6744.326	16432.619	0.41042307	44.5653073
Compuesto 3	5057.74	16375.619	0.30885794	33.5369769
Compuesto 4	4555.93	16607.617	0.27432774	29.7875551
Compuesto 5	10140.709	15979.452	0.63460931	68.9083064
Compuesto 6	14687.93	16532.912	0.8884055	96.4664679
Extracto de AcOEt	2356.498	16417.497	0.14353577	15.5856625
C-30	2292.429	16795.912	0.13648732	14.8203152

Gen <i>laB</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo 16s rRNA (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	16601.79	16881.497	0.98343115	100
Compuesto 1	6556.548	16378.083	0.40032451	40.7069175
Compuesto 2	1488.355	16533.497	0.09002058	9.15372476
Compuesto 3	1506.426	16439.669	0.0916336	9.31774398
Compuesto 4	7758.962	16598.376	0.46745308	47.5328732
Compuesto 5	7336.104	16046.033	0.45719113	46.489389
Compuesto 6	13144.033	16300.376	0.80636379	81.9949411
Extracto de AcOEt	8514.497	16490.74	0.51631989	52.5018845
C-30	10479.619	15961.447	0.65655821	66.76199
Gen <i>lasB</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	12299.669	16178.497	0.76024794	1000
Compuesto 1	9279.962	16510.74	0.56205609	73.9306301
Compuesto 2	9371.376	16432.619	0.57029108	75.0138275
Compuesto 3	5399.619	16375.619	0.32973526	43.372069
Compuesto 4	2435.79	16607.617	0.14666704	19.2920008
Compuesto 5	15124.861	15979.452	0.94651938	124.501407
Compuesto 6	2356.406	16532.912	0.14252819	18.7475929
Extracto de AcOEt	3142.648	16417.497	0.19142065	25.1787139
C-30	2821.598	16795.912	0.16799314	22.0971517

Gen <i>phz</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo 16s rRNA (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	16844.447	16881.497	0.99780529	100
Compuesto 1	3912.426	16378.083	0.2388818	23.9407233
Compuesto 2	2829.477	16533.497	0.17113603	17.1512448
Compuesto 3	2513.477	16439.669	0.15289097	15.3227263
Compuesto 4	3189.184	16598.376	0.19213832	19.2560931
Compuesto 5	2362.062	16046.033	0.14720536	14.752914
Compuesto 6	1956.234	16300.376	0.12001159	12.0275558
Extracto de AcOEt	484.749	16490.74	0.02939522	2.94598801
C-30	1917.012	15961.447	0.12010264	12.0366815

Gen <i>phz</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	15778.033	16178.497	0.97524714	100
Compuesto 1	11546.326	16510.74	0.69932214	71.7071711
Compuesto 2	1377.77	16432.619	0.0838436	8.59716478
Compuesto 3	1221.497	16375.619	0.07459242	7.64856553
Compuesto 4	4622.205	16607.617	0.27831838	28.5382406
Compuesto 5	1265.062	15979.452	0.07916805	8.11774195
Compuesto 6	579.335	16532.912	0.03504132	3.59307039
Extracto de AcOEt	881.305	16417.497	0.05368084	5.50433175
C-30	496.335	16795.912	0.02955094	3.03009764

Gen <i>toxA</i> (PA14)	Valor densitometría (U)	Valor del gen constitutivo <i>16s rRNA</i> (U)	Datos normalizados	Porcentaje (%)
cepa sin tratamiento	16484.74	16881.497	0.97649752	100
Compuesto 1	11338.497	16378.083	0.69229696	70.8959254
Compuesto 2	2631.012	16533.497	0.15913222	16.2962231
Compuesto 3	4451.083	16439.669	0.27075259	27.7269103
Compuesto 4	6835.619	16598.376	0.41182457	42.1736417
Compuesto 5	5928.376	16046.033	0.36946054	37.8352766
Compuesto 6	12948.569	16300.376	0.79437241	81.3491477
Extracto de AcOEt	6071.912	16490.74	0.36820131	37.7063226
C-30	4451.74	15961.447	0.27890579	28.5618534
Gen <i>toxA</i> (PA64)				
cepa sin tratamiento	14911.962	16178.497	0.92171492	1000
Compuesto 1	9310.79	16510.74	0.56392324	61.1819588
Compuesto 2	4690.79	16432.619	0.28545602	30.9700987
Compuesto 3	3517.79	16375.619	0.21481875	23.30642
Compuesto 4	6477.79	16607.617	0.39004934	42.3177851
Compuesto 5	2146.205	15979.452	0.1343103	14.5717833
Compuesto 6	2134.062	16532.912	0.12907962	14.0042889
Extracto de AcOEt	3165.598	16417.497	0.19281855	20.9195434
C-30	2673.134	16795.912	0.15915385	17.2671445

10.8 Efecto de los metabolitos secundarios y el EAcOEt sobre la expresión de los genes analizados en comparación a la cepas PA14 y PA64 sin tratamiento de *P. aeruginosa*

La siguiente tabla (tabla 10) resume la actividad de los compuestos y el EAcOEt sobre la expresión de cada gen controlado por el sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa*.

Tabla 10. Actividad de los compuestos y el EAcOEt sobre la expresión de cada gen controlado por el sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa*

		<i>lasI</i>		<i>lasR</i>	
Efecto sobre la expresión génica	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64	
Mayor de 100%	1,2,3,4,5		2,4		1,2
De 76- 100%	6, EAcOEt		1		5,4
De 50- 75%	C-30	1,2,4,6	4		
Menos de 50%		3,5,EAcOEt, C-30	5,6, EAcOEt, C-30		3,6, EAcOEt, C-30
		<i>rhlI</i>		<i>rhlR</i>	
Efecto sobre la expresión génica	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64	
Mayor de 100%			2,4,5		
De 76- 100%	4	4	1		6
De 50- 75%	1,2,5,6	1,5,6	3		5
Menos de 50%	3,EAcOEt, C-30	2,3, EAcOEt, C-30	6, , EAcOEt, C-30		1,2,3,4, EAcOEt, C-30
		<i>lasB</i>		<i>phz</i>	
Efecto sobre la expresión génica	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64	
Mayor de 100%		5			
De 76- 100%	6	2			
De 50- 75%	EAcOEt, C-30	1			1
Menos de 50%	1,2,3,4,5	3,4,6, EAcOEt, C-30	1,2,3,4,5,6, EAcOEt, C-30		2,3,4,5,6,EAcOEt, C-30
		<i>toxA</i>			
Efecto sobre la expresión génica	Tratamiento PA14	Tratamiento PA64			
Mayor de 100%					
De 76- 100%	6				
De 50- 75%	1	1			
Menos de 50%	2,3,4,5,EAcOEt C-30	2,3,4,5,6 EAcOEt, C-30			

La siguiente tabla (tabla 11) resume a los metabolitos secundarios y el EAcOEt que tuvieron mayor efecto (mayor disminución) sobre la expresión de genes controlados por el sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa*.

Tabla 11. Metabolitos secundarios y el EAcOEt que tuvieron mayor efecto (mayor disminución) sobre la expresión de genes controlados por el sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa*.

Compuesto/ EAcOEt	PA14	PA64
1	<i>lasB, phz</i>	<i>rhIR</i>
2	<i>lasB, phz, toxA</i>	<i>rhII, rhIR, phz, toxA</i>
3	<i>rhII, lasB, phz, toxA</i>	<i>lasI, lasR, rhII, rhIR, lasB, phz, toxA</i>
4	<i>lasB, phz, toxA</i>	<i>rhIR, lasB, phz, toxA</i>
5	<i>lasR, lasB, phz, toxA</i>	<i>lasI, phz, toxA</i>
6	<i>lasR, rhIR, phz</i>	<i>lasR, lasB, phz, toxA</i>
EAcOEt	<i>lasR, rhII, rhIR, phz, toxA</i>	<i>lasI, lasR, rhII, rhIR, lasB, phz, toxA</i>
C-30	<i>lasR, rhII, rhIR, phz, toxA</i>	<i>lasI, lasR, rhII, rhIR, lasB, phz, toxA</i>

