

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Miguel Angel González Ortíz	
Matrícula : 2142032613	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : 4° Cerrada de Tamaulipas, Lt 18 s/n, Barrio San Martín, Tultepec. Estado de México	
Teléfono : 58926306	Celular : 5615453271
Correo Electrónico : miguel_angel_1001@hotmail.com	CURP : GOOM950110HMCNRRG08

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Evaluación de la actividad antimicrobiana de furanonas halogenadas en cepas de pseudomonas aeruginosa de pacientes pediátricos con Fibrosis							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Bacteriología Experimental							
Dependencia : Instituto Nacional de Pediatría							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad : Coyoacán						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	01	11	2019		30	04	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público	Tipo: 1.- Externo
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición	

FIRMAS

Alberto Ortega Vázquez 35583

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Miguel Angel González Ortíz

Alumno
Nombre, firma

Victor Rafael Coria Jiménez 1054088

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Dr. María Angélica Gutiérrez Nava

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



2020
LEONA VICARIO

Instituto Nacional de Pediatría
Subdirección de Programación y
Evaluación Educativa
Departamento de Pre y Posgrado



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Ciudad de México, a 29 de septiembre de 2020
Oficio No. DPP/MEFL/SS/127/2020.

Asunto: Servicio Social

MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS
Directora de la División de Ciencias Biológicas y
De la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
P r e s e n t e .

Me dirijo a usted para informarle que el alumno **MIGUEL ANGEL GONZALEZ ORTIZ** con número de matrícula **2142032613** de la Lic. en Química Farmacéutica Biológica, ha concluido su Servicio Social en el Laboratorio de Bacteriología Experimental, en el protocolo "Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de algunas furanonas hacia cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes a fármacos, aisladas de pacientes pediátricos con fibrosis quística", durante el periodo comprendido del 01 de noviembre de 2019 al 30 de abril de 2020. Cubriendo un total de 480 horas.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

A t e n t a m e n t e .

DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
Jefe del Departamento



MEFL*ns

SALUD



Instituto Nacional de Pediatría
Dirección de Investigación
Subdirección de Medicina Experimental
Laboratorio de Bacteriología Experimental

Ciudad de México, 30 de septiembre de 2020

LBE/VRCJ/051/2020

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco.
Presente

Distinguida Mtra. Contreras Garfias:

Me dirijo a usted para comunicarle que el alumno **Miguel Angel González Ortiz**, con número de matrícula **2142032613**, de la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, realizó su Servicio Social en el laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.

El alumno mencionado realizó su Servicio Social en este laboratorio durante el periodo comprendido del 01 de noviembre del 2019 al 30 de abril del 2020 participando en la parte experimental del proyecto titulado "Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de algunas furanonas hacia cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a fármacos, aisladas de pacientes pediátricos con fibrosis quística", con número de registro **056/2019**, cubriendo un total de 480 horas.

Durante su estancia en el laboratorio, el alumno estandarizó la metodología para evaluar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a 15 furanonas y demostró la eficacia de los compuestos estudiados, lo que permitirá el desarrollo de nuevos fármacos contra cepas multirresistentes a los antibióticos.

Así también, quiero mencionar que Miguel Angel González Ortiz mostró una gran dedicación, compromiso y entusiasmo durante toda su estancia en nuestra Institución.

Sin otro particular, quedo de usted

Atentamente

Dr. Victor Rafael Coria Jiménez
Jefe del Laboratorio de
Bacteriología Experimental

Ccp. Pas. QFB Miguel Angel González Ortiz
Archivo

Ciudad de México, 23 de Julio de 2021

Mta. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco
P r e s e n t e

Distinguida Mtra. Contreras Garfias:

Me dirijo a usted para comunicarle que el alumno **Miguel Ángel González Ortíz**, con número de matrícula **2142032613**, de la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, realizó su Servicio Social en el laboratorio de Genética Molecular N-103 del Departamento de Sistemas Biológicos UAM-X.

El alumno mencionado realizó su Servicio Social en este Laboratorio durante el periodo comprendido del 01 de noviembre del 2019 al 30 de abril del 2020 participando en la parte experimental del proyecto titulado “Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de algunas furanonas hacia cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a fármacos, aisladas de pacientes pediátricos con fibrosis quística”, con número de registro **056/2019**, cubriendo un total de 480 horas.

Durante su estancia en el laboratorio, el alumno estandarizó la metodología para evaluar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a 15 furanonas y demostró la eficacia de los compuestos estudiados, lo que permitirá el desarrollo de nuevos fármacos contra cepas multirresistentes a los antibióticos.

Sin otro particular, quedo a usted

A t e n t a m e n t e



Dr. Alberto Ortega Vázquez
(No. Económico 35583)

Profesor Asociado de Tiempo Completo
Laboratorio de Genética Molecular



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA



METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe del servicio social:

“Evaluación de la actividad antimicrobiana de furanonas halogenadas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes pediátricos con Fibrosis Quística”

Por: Miguel Ángel González Ortiz

Matrícula: 2142032613

Asesores:

Dr. Alberto Ortega Vázquez No. eco. 35583

Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez Céd. Prof.1054088

DATOS PERSONALES

Nombre: Miguel Angel González Ortíz

Matrícula: 2142032613

Correo electrónico: miguel_angel_1001@hotmail.com

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

División: Ciencias Biológicas y de la Salud

Unidad: Xochimilco

Trimestre Lectivo: 20-O

Título del proyecto de servicio social: “Evaluación de la actividad antimicrobiana de furanonas halogenadas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes pediátricos con Fibrosis Quística”.

Asesor Interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez. Profesor Asociado de Tiempo Completo. Departamento de Sistemas Biológicos (DSB), Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Asesor Externo: Dr. Victor Rafael Coria Jiménez. Investigador en Ciencias Médicas “D”. Jefe del Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de Investigación “Joaquín Cravioto”, Instituto Nacional de Pediatría.

Lugar de Realización: Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de Investigación “Joaquín Cravioto”, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700, Letra C, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04530, CDMX. y Laboratorio de Genética Molecular (N-103). Departamento de Sistemas Biológicos. UAM-X.

Clave de Registro: 056/2019

ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	3
2. ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
3. ABREVIATURAS.....	7
4. GLOSARIO.....	8
5. INTRODUCCIÓN.....	16
6. ANTECEDENTES.....	17
6.1. Fibrosis Quística.....	17
6.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Fibrosis Quística.....	18
6.3. Terapia con antibióticos para la erradicación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
6.4. Mecanismos de resistencia y patogenicidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
6.5. Biopelículas.....	24
6.6. Patogenicidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
6.7. Quorum sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
6.8. Furanonas halogenadas contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
7. JUSTIFICACIÓN.....	34
8. HIPÓTESIS.....	34
9. OBJETIVOS.....	34
9.1. OBJETIVO GENERAL.....	34
9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
10. METODOLOGÍA.....	35
10.1. Muestras biológicas.....	35

10.2.	Principios activos.....	36
10.3.	Extracción de ADN de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
10.4.	Análisis cualitativo-cuantitativo del ADN genómico.....	37
10.5.	Identificación molecular de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
10.6.	Visualización de amplicones.....	39
10.7.	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	39
10.8.	Análisis estadístico.....	41
11.	ACTIVIDADES REALIZADAS.....	41
12.	OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS.....	42
13.	RESULTADOS.....	42
13.1.	Identificación molecular de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes pediátricos con FQ.....	42
13.2.	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	47
13.3.	Análisis estadístico.....	51
14.	CONCLUSIONES.....	56
15.	RECOMENDACIONES.....	56
16.	BIBLIOGRAFÍA.....	59

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Modificado de (Stover et al.2000).....	19
Figura 2. Mecanismo de acción de los principales antimicrobianos. Tomado de Brock 10° edición...	20
Figura 3. Representación esquemática de varios mecanismos de resistencia antibacteriana demostrados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Modificado de (Skariyachan et al., 2018).....	23
Figura 4. Componentes de la biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> . Modificado de (Rabin et al., 2015).....	25
Figura 5. Esquema que muestra las fases de desarrollo de la biopelícula por <i>P. aeruginosa</i> las cuales se caracterizan por iniciación, maduración y dispersión. Modificado de (Skariyachan et al., 2018)...	25
Figura 6. Sistemas de <i>Quorum sensing</i> de <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> (Abelyan et al., 2020).....	28
Figura 7. Estructuras químicas de furanonas- 2(3H), (ii) furanonas 2(5H), (iii) furanonas 3(2H). (Husain et al., 2019).....	29
Figura 8. Furanona – 2 (5H) como potencial antimicrobiano. Modificado de (Husain et al., 2019).....	32
Figura 9. Furanonas halogenadas efectivas contra <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> en modelos animales. (Husain et al., 2019).....	33
Figura 10. Diseño de la placa de micro pozos para ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.....	40
Figura 11. Absorbancia de cepas de referencia.....	44
Figura 12. Absorbancia de la cepa Pa03m.....	44
Figura 13. Absorbancia de la cepa Pa25r.....	45
Figura 14. Absorbancia de la cepa Pa77r.....	45
Figura 15. Absorbancias de las cepas control negativo.....	46
Figura 16. Integridad de las cepas empleadas.....	46
Figura 17. Productos de amplificación de la PCR.....	47

Figura 18. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana para la cepa Pa25r.....	48
Figura 19. Ensayo de susceptibilidad para la cepa Pa25r.....	49
Figura 20. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana para la cepa Pa03m.....	49
Figura 21. Ensayo de susceptibilidad para la cepa Pa03m.....	50
Figura 22. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana para la cepa Pa77r.....	50
Figura 23. Ensayo susceptibilidad para la cepa Pa77r.....	51
Figura 24. Compuesto 1. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	51
Figura 25. Compuesto 2. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	52
Figura 26. Compuesto 3. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	52
Figura 27. Compuesto 4. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	53
Figura 28. Compuesto 5. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	53
Figura 29. Compuesto 6. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	54
Figura 30. Compuesto 7. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vs absorbancia.....	54

3. ABREVIATURAS

ADN	Ácido 2'-desoxirribonucleico
ADPRT	ADP-ribosiltransferasa
AHLs	N-acil homoserina lactonas
Ais	Autoinductores
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infusión de cerebro corazón
BHL	N-butilhomoserina lactona o C4-HSL
BrEt	Bromuro de etidio
CBM	Concentración bactericida mínima
CFTR	Gen de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DR2	Resistente a dos familias de antibióticos
DR2	Resistente a dos grupos de fármacos
EGM	Elementos genéticos móviles
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FQ	Fibrosis quística
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GES	<i>Guanidium Thiocyanate</i> , EDTA y Sarkosyl
H ₂ O _{LN}	Agua libre de nucleasas
HSL	3-oxo-C12-homoserina lactona
IQS	2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (aeruginaldehído)
IQS	Inhibidores de <i>Quorum sensing</i>
LPS	Lipopolisacáridos
Mb	Mega bases
MDR	Resistente a múltiples fármacos
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PQS	2-heptyl-3-hidroxi-4-quinolona
PSA	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana
QS	<i>Quorum sensing</i>
rpm	Revoluciones por minuto
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
XDR	Extensamente resistente los fármacos

4. GLOSARIO

ADN. Ácido 2'-desoxirribonucleico. Polímero de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces 5'-3' fosfodiéster. Es uno de los dos ácidos nucleicos naturales conocidos y la molécula que almacena la información genética por excelencia en los seres vivos.

Adherencia. Proceso mediante el cual un agente patógeno se fija a la superficie de la célula hospedera. Es el paso inicial y el más importante del proceso infeccioso.

Agar. Polisacárido complejo extraído de ciertas algas marinas, el cual no es digerido por la mayor parte de las bacterias. Está constituido por un 70% de agarosa y 30% de agarpectina. Se funde a temperaturas mayores a 100°C y se gelifica a 40-50°C. Entre sus aplicaciones se encuentran la preparación de medios de cultivo sólidos, emulsiones y como medio de soporte para técnicas de inmunodifusión y electroforesis.

Agarosa. Es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. Es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales.

Agente infeccioso. Un organismo (virus, bacteria, hongo, protozoo, helminto) o proteína (prion) que tiene la capacidad de producir una infección o enfermedad infecciosa.

Temperatura de alineamiento. Segunda etapa de la PCR en la cual se baja la temperatura para permitir que los oligonucleótidos se unan a la región flanqueante del ADN.

Alga. Grupo polifilético de organismos con cloroplastos, unicelulares y pluricelulares, en forma de lámina o de filamento, sin tejidos vasculares. El término no tiene valor taxonómico. Incluye: algas verdiazules, dinoflagelados y otros alveolados, diatomeas, algas cafés, algas verdes, algas rojas.

Amplicón. Producto de una reacción de amplificación de ADN.

Amplificación de ADN. Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN tanto *in vivo*, en un plásmido, fago u otro vector, como *in vitro* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Antibióticos. Compuestos naturales o sintéticos que inhiben o destruyen de manera selectiva a microorganismos, generalmente a concentraciones bajas. Los antibióticos se utilizan en Medicina de manera generalizada para el control de bacterias patógenas, pero éstas por mutación pueden adquirir con rapidez resistencia a ciertos antibióticos.

Autoclave. Cámara cerrada que permite, mediante la aplicación de calor y vapor a presión, esterilizar distintos objetos y sustancias (material de laboratorio, líquidos, otros).

Bacterias. Organismos unicelulares procarióticos sin núcleo diferenciado, aunque presentan un nucleoide, una estructura que contiene una molécula circular de ADN; sin organelos con membrana; presentan varias formas y se pueden encontrar

prácticamente en cualquier ambiente (suelos, aguas, aire y como simbioses o patógenos del humano, otros animales y plantas).

Bactericida. Propiedad por la cual un biocida (agente físico o químico) puede matar bacterias, con o sin lisis de éstas.

Bacteriostático. Propiedad por la cual un biocida puede inhibir la multiplicación bacteriana, que se reanuda una vez se remueve el agente.

Cepa. En Microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen las mismas características genéticas.

Colonia. Grupo de organismos unicelulares que viven en asociación, a menudo derivado de una sola célula.

Concentración bactericida mínima (CBM). Concentración mínima de antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas).

Concentración inhibitoria mínima (CIM). Concentración más baja de un agente antimicrobiano que previene visiblemente el crecimiento de un microorganismo en una prueba de susceptibilidad en agar o dilución en caldo.

Desnaturalización (en PCR). Primera etapa en la PCR, en la cual se separan las dos hebras que constituyen el ADN por rompimiento de puentes de hidrógeno entre bases complementarias. El ADN se desnaturaliza a temperaturas mayores a los 90°C.

Electroforesis. Técnica de separación de sustancias, basada en su desplazamiento eléctrico debido a su carga neta. Se utiliza con frecuencia para separar iones, proteínas y ácidos nucleicos.

Extensión de la PCR. Tercera etapa de la PCR, donde la temperatura es elevada a 72 °C para permitir que la ADN polimerasa inicie la síntesis a partir de oligonucleótidos agregando *dNTPs* sobre la hebra que sirve de templado.

Fenotipo. Conjunto de todas las características observables de una célula u organismo, sean éstas hereditarias o no.

Furanona. Compuesto orgánico heterocíclico, clasificado como una lactona con propiedades antibacteriales, inhibidor de biopelículas y *Quorum sensing* (QS), entre otras.

Gen. Unión de secuencias genómicas que codifican para un conjunto coherente de productos potencialmente funcionales sobrelapados (RNA, proteínas).

Genoma. Es el contenido total de la información genética de un organismo. El contenido total son las secuencias codificantes, no codificantes y proteínas.

Genotipo. Constitución genética completa de una célula u organismo. También suele referirse a los alelos de uno o más *loci* específicos.

Gram-negativa. Es una clasificación para denominar a las bacterias gramnegativas (Gram-negativas) a aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue.

Hospedero. Organismo que provee de nutrientes y/o albergue a otro organismo en diversas asociaciones biológicas.

Infección. Invasión y multiplicación de un agente patógeno (bacterias, virus, etc.), en un organismo que puede manifestarse clínicamente o no.

Infección nosocomial. Infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de la salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del ingreso. Incluye también las enfermedades que se manifiestan después del alta hospitalaria y las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento.

Integrón. Unidades de captura génica que contienen los elementos necesarios para la recombinación sitio-específica y la expresión de ADN foráneo, pertenecientes a la clase o tipo 1, por su contribución en el ambiente clínico a la resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas.

Pares de bases. Unidad empleada para medir la longitud, en número de bases nitrogenadas, que tiene un fragmento de ADN. Cuando se habla de un fragmento de ADN de doble cadena, se habla de kilopares de bases. 1Kb = 1000 pares de bases.

Lipopolisacárido. Complejo exclusivo de la pared celular de algunas bacterias Gram negativas, responsable de muchas de las propiedades biológicas de estas bacterias; su porción polisacárida, la virulencia, en tanto que la porción lipídica, forma parte integral de la membrana (endotoxina).

Medio diferencial. Medio utilizado para diferenciar tipos de microorganismos, basándose en sus colores o formas coloniales.

Medio selectivo. Medios de cultivo que contienen sustancias inhibitorias o factores únicos de crecimiento para un organismo o un grupo de ellos. Permiten seleccionar los organismos elegidos.

Medio de soporte. Medio de cultivo que proporciona una nutrición adecuada para la mayoría de los microorganismos no fastidiosos y permite que crezcan normalmente sin conferir ninguna ventaja especial a un organismo sobre otro.

Morbilidad. Relación entre el número de afectados de una enfermedad determinada y la población total de una zona.

Mortalidad. Relación entre el número de muertos por todas las causas y la población total de una zona.

Oligonucleótidos. Moléculas de ADN o ARN formadas por cadenas simples de pocos nucleótidos (menos de 30). Se suelen usar como sondas para detectar ADN o ARN complementarios.

Patogenicidad. Los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales los microorganismos causan enfermedad.

Patógeno. Organismo que causa una enfermedad.

Patógeno oportunista. Organismo que en circunstancias habituales no causa daño, pero que en ciertas circunstancias produce enfermedad.

PCR. Acrónimo de *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa), método eficiente y sensible de clonación molecular, o clonación de moléculas de ácido nucleico, que permite amplificar el ADN o ARN (secuencia blanco) sin emplear células.

Pili o fimbria. Estructuras rígidas en la superficie de bacterias Gram negativas. Más cortos y delgados que los flagelos. Constituidas por subunidades proteicas. Existen diferentes clases: las que participan en la adherencia y la virulencia, y las sexuales, que unen a las células donadora y receptora en la conjugación, con transferencia de material genético.

Primer o iniciador o cebador (dentro del concepto de la reacción en cadena de la polimerasa). Es un oligonucleótido que se usa para iniciar una reacción de PCR. El *primer* se pega a la secuencia complementaria y eso permite que la polimerasa en la cadena de ADN comience la elongación o extensión de la molécula de ADN.

Sinergismo. Resultado de la acción de dos o más organismos o sustancias que, actuando en conjunto, provocan una respuesta mayor a la suma de los efectos que provocarían por separado.

Susceptible. Persona o animal que carece de resistencia contra un agente patógeno y que en consecuencia puede contraer la enfermedad si se expone a la infección por dicho agente.

Tolerancia. Capacidad de un organismo de soportar los efectos de condiciones ambientales como sequía, salinidad, pH, concentraciones altas de fármacos o herbicidas.

Transiluminador. Equipo de iluminación de geles que utiliza luz ultravioleta (UV) y un soporte, donde se coloca el gel de electroforesis previamente tratados con algún agente intercalante de ácidos nucleicos para detectarlos mediante reacciones luminiscentes gracias a la radiación emitida por la luz UV.

Unidad formadora de colonia (UFC). Célula bacteriana viva y aislada que en las condiciones adecuadas da lugar a la producción de una colonia de bacterias.

Vía de infección. El lugar de ingreso del agente infeccioso en el organismo del hospedero. Ejemplos: vía digestiva, cutánea, respiratoria.

5. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética que se hereda de forma autosómica recesiva (Garinis *et al.*, 2017; Ratjen *et al.*, 2017) caracterizada por infecciones pulmonares recurrentes principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), la cual es considerada el predictor principal de la morbilidad y mortalidad en esta patología (Ratjen *et al.*, 2017).

Los pacientes que son colonizados por esta bacteria tienen un riesgo elevado de hospitalización por síntomas respiratorios severos, asociados con un declive más rápido en la función pulmonar y muerte prematura (Kiedrowski & Bomberger, 2018; Ratjen *et al.*, 2017; Sommer *et al.*, 2016). Para prevenir resultados desfavorables en los pacientes se otorga una terapia temprana y agresiva con antibióticos convencionales tales como: aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas, polimixinas, entre otros (Pang *et al.*, 2019), sin embargo la detección de cepas resistentes a múltiples fármacos (*MDR*) ha imposibilitado la eficacia de la terapia, haciendo necesaria la implementación de nuevas terapias en FQ (Sommer *et al.*, 2016). En ese aspecto, las furanonas halogenadas derivadas de la alga marina australiana *Delisea pulchra* han demostrado tener efectos antimicrobianos sobre diferentes cepas de *P. aeruginosa* figurando como posibles compuestos a utilizar en la terapéutica de la FQ (Hentzer *et al.*, 2019).

6. ANTECEDENTES

6.1 Fibrosis quística

La FQ es una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva que afecta aproximadamente a 75,000 individuos alrededor del mundo (Rafeeq *et al.*, 2017), puede presentarse en ambos sexos aunque los pacientes varones poseen una expectativa de vida mayor (Villaverde-Hueso *et al.*, 2019). En población hispana de California, la prevalencia al nacimiento es de 1:9,259 recién nacidos (Ibarra González *et al.*, 2018). En México su incidencia es de 1 por cada 8500 nacidos vivos, de acuerdo con el boletín de la OMS; The molecular Genetic Epidemiology of CF (Lezana Fernández *et al.*, 2015; WHO, 2004) mientras que en el sureste de México, se estima que la prevalencia de nacimientos con FQ es de 1:13,724 recién nacidos (Ibarra González *et al.*, 2018).

Esta enfermedad es causada por variantes genéticas patogénicas en el gen de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística (*CFTR*) (Kiedrowski & Bomberger, 2018; Rommens *et al.*, 1989), que codifica para un transportador de aniones expresado normalmente en páncreas, hígado, tracto digestivo, piel, órganos reproductivos y pulmones (Bouvier, 2016). La secreción aniónica a través de los canales de *CFTR* es esencial para mantener un volumen adecuado de líquido periciliar necesario para un aclaramiento mucociliar efectivo (Maillé *et al.*, 2017), por lo que una *CFTR* disfuncional o ausente resulta en daños en diversos órganos (Villaverde-Hueso *et al.*, 2019) manifestándose por insuficiencia pancreática, infertilidad, osteoporosis, presión arterial baja, entre otras (Bodnár *et al.*, 2016; Rafeeq *et al.*, 2017), aunado al incremento en la concentración de electrolitos en el

sudor y vías aéreas líquidas (ASL) atrofiadas respecto a pH y deshidratación, aspectos que fomentan la acumulación de moco espeso y pegajoso en la superficie epitelial pulmonar (Bouvier, 2016; Kiedrowski & Bomberger, 2018; Moradali *et al.*, 2017; Parkinset *al.*, 2018), desestabilizando la función de péptidos antimicrobianos que repercuten en la efectividad del aclaramiento mucociliar en los pacientes con FQ (Kiedrowski & Bomberger, 2018). Lo anterior favorece la presencia de exacerbaciones pulmonares que pueden conducir a la muerte de pacientes que padecen esta enfermedad (Fajac & Boeck, 2016; Sommer *et al.*, 2016), por lo que un tratamiento temprano y agresivo con antibióticos es común para intentar erradicar a *P. aeruginosa* del hospedero (Ratjen *et al.*, 2017).

6.2 *Pseudomonas aeruginosa* y Fibrosis quística

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo móvil, oxidasa y catalasa positivo (Pestaña & del Pozo, 2018), considerado como un patógeno oportunista (Parkins *et al.*, 2018; Valentini *et al.*, 2018) que permanece consistentemente entre los patógenos catalogados como “super bacterias” (Joshiet *al.*, 2019).

La *P. aeruginosa* posee un genoma grande (>6 Mb) (Figura 1) que le permite desarrollar un gran número de factores asociados a su patogenicidad (Bassetiet *al.*, 2018; Stover *et al.*, 2000), dándole la capacidad de ocasionar diferentes problemas de salud como neumonía, choque séptico, neutropenia, infecciones del tracto urinario, infecciones estomacales, entre otras infecciones (Berubeet *al.*, 2016; Kariminik *et al.*, 2017) que suelen ser invasivas, toxígenas y MDR (Kariminik *et al.*, 2017), por lo que las infecciones causadas por este patógeno están asociadas con

un índice alto de morbilidad y mortalidad (Khodayary *et al.*, 2019; Schick & Kassen, 2018).

Esta bacteria coloniza principalmente a pacientes inmunosuprimidos, niños prematuros, quemados y/o pacientes con FQ (Joshi *et al.*, 2019; Tsakris *et al.*, 2000). En esta última patología, *P. aeruginosa* es el agente más importante y común causante de las frecuentes infecciones pulmonares que presentan esos pacientes (Chatterjee *et al.*, 2016; Cuevas Schacht *et al.*, 2001; Stover *et al.*, 2000).

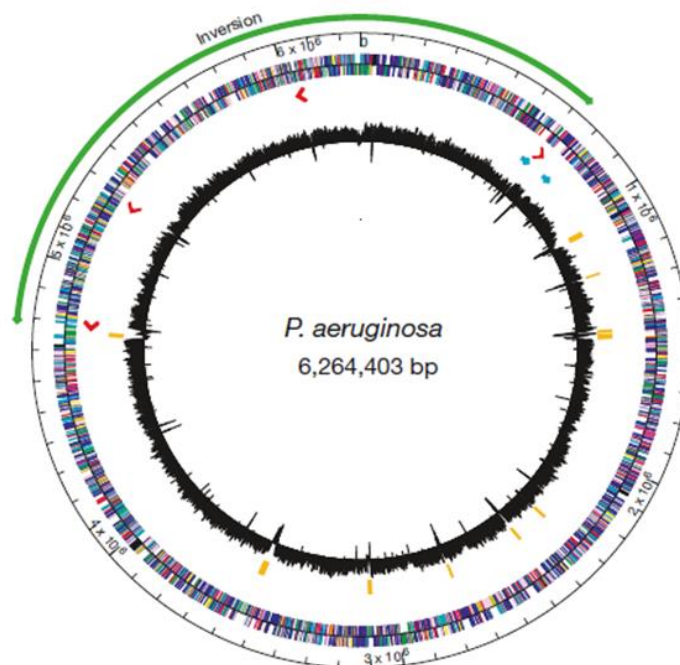


Figura 1. Genoma de *P. aeruginosa*. Modificado de (Stover *et al* 2000.)

6.3 Terapia con antibióticos para la erradicación de *Pseudomonas aeruginosa*

La terapia de erradicación de infecciones causadas por *P. aeruginosa* usualmente se basa en antibióticos que actúan como agentes bacteriostáticos o bactericidas

(Sommer *et al.*, 2016) donde los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, β -lactámicos y polimixinas figuran como los antibióticos más utilizados (Tabla 1) (Garinis *et al.*, 2017; Pang *et al.*, 2019; Sommer *et al.*, 2016).

Debido a que estos agentes tienen como objetivo primordial inhibir la síntesis de la pared celular, síntesis proteica y ácidos nucleicos, así como la interferencia con la membrana celular y el metabolismo bacteriano (Sommer *et al.*, 2016), deben penetrar la membrana celular para localizar sus dianas intracelulares (Pang *et al.*, 2019).

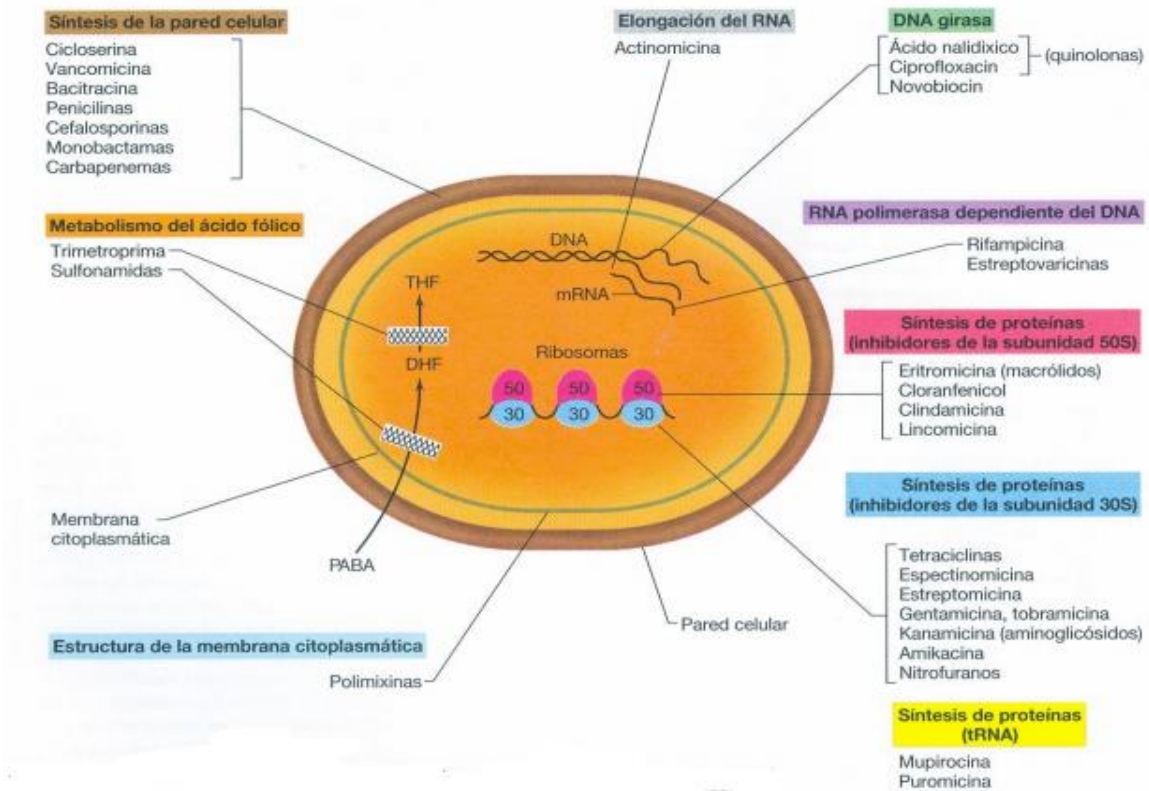
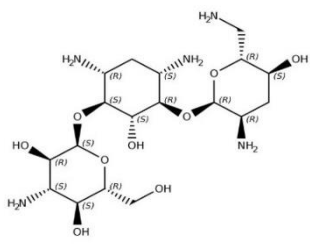
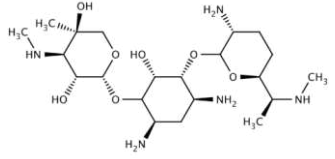
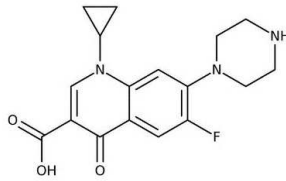
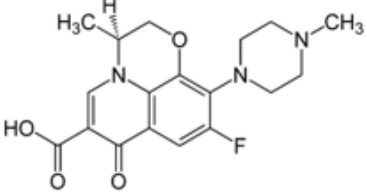
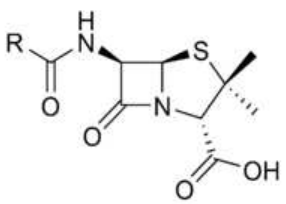
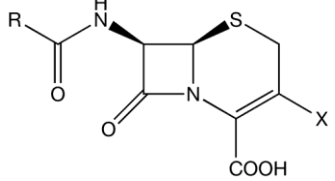
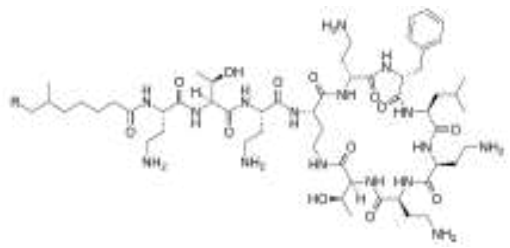
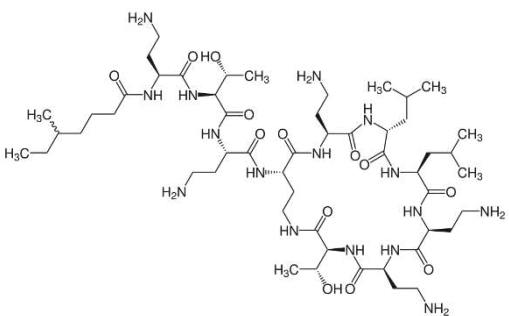


Figura 2. Mecanismo de acción de los principales antimicrobianos. Tomado de (Brock 10ª edición 2004).

Tabla 1. Ejemplos y estructuras químicas de los principales antibióticos empleados en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, Modificado de (Pang *et. al.*, 2019)

Antibióticos usados contra <i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	Ejemplos y estructuras químicas	
Aminoglucósidos	 <p data-bbox="651 526 805 555">Tobramicina</p>	 <p data-bbox="1197 515 1356 544">Gentamicina</p>
Quinolonas	 <p data-bbox="638 929 813 958">Ciprofloxacina</p>	 <p data-bbox="1189 929 1364 958">Levofloxacina</p>
β – lactámicos	 <p data-bbox="662 1288 790 1317">Penicilina</p>	 <p data-bbox="1189 1288 1364 1317">Cefalosporina</p>
Polimixinas	 <p data-bbox="646 1691 805 1720">Polimixina B</p>	 <p data-bbox="1197 1691 1356 1720">Polimixina E</p>

Sin embargo, la membrana externa de *P. aeruginosa* actúa como una barrera selectiva que previene la penetración de los antibióticos y está conformada por una bicapa asimétrica de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) incrustada con porinas que forman canales proteicos de tipo barril β (Pang *et al.*, 2019). Los β -lactámicos y las fluoroquinolonas penetran la membrana celular por medio de porinas para poder bloquear la síntesis de la pared celular, atacando a las proteínas de unión a la penicilina, enzimas involucradas en la síntesis de peptidoglicanos en el caso de los β -lactámicos, mientras las fluoroquinolonas interfieren directamente con la replicación del ADN mediante la inhibición de la enzima ADN girasa y la topoisomerasa IV (Pang *et al.*, 2019).

Por otro lado, los aminoglucósidos y las polimixinas promueven su propia captación para inhibir la síntesis de proteínas bacterianas mediante su unión a subunidades ribosomales 30S en el caso de las fluoroquinolonas, mientras las polimixinas inducen la muerte bacteriana a través de la generación de radicales libres e hidroxilos, asimismo se unen a los LPS de la membrana externa incrementando su permeabilidad y captación mejorada de antibióticos (Pang *et al.*, 2019).

El uso excesivo de antibióticos ha favorecido el desarrollo de cepas de *P. aeruginosa* MDR (Chatterjee *et al.*, 2016), ocasionando la ineficacia de la terapia convencional en contra de este patógeno (Pang *et al.*, 2019). A su vez, el aumento de infecciones por cepas MDR ha obstaculizado la selección de una terapia con antibióticos apropiada, aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad (Castón JJ *et al.*, 2017).

6.4 Mecanismos de resistencia y patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa tiene una gran capacidad intrínseca de soportar la terapia con antibióticos siendo inmune naturalmente a diversas sustancias antimicrobianas (Esani S et al., 2019). La bacteria presenta diversos factores que le permiten evadir la acción de antibióticos, tales como la disminución de la permeabilidad de la membrana, la expresión de sistemas de eflujo, la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos y modificaciones del objetivo (ADN girasa, topoisomerasa IV y la modificación de lipopolisacáridos) (Bassetti et al., 2018)

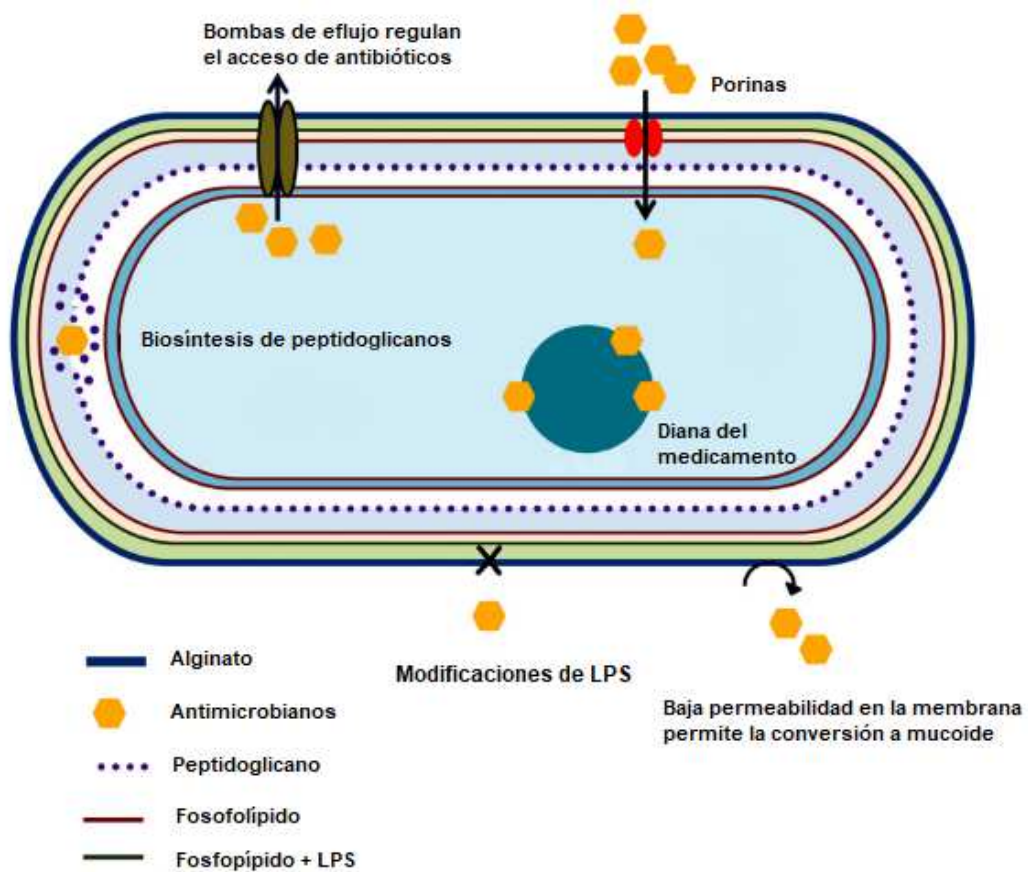


Figura 3. Representación esquemática de varios mecanismos de resistencia antibacteriana demostrados por *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de (Skariyachan et al., 2018).

Adicionalmente *P. aeruginosa* posee la capacidad de adquirir elementos genéticos móviles (EGM) como los plásmidos o transposones, que se mueven de una célula bacteriana a otra mediante un proceso denominado transferencia genética horizontal y que contienen elementos genéticos que le ayudan a sobrevivir en condiciones desfavorables, como la presencia de antibióticos letales, desinfectantes e incluso radiación UV (Subedi *et al.*, 2018).

Asimismo, este patógeno genera una gran cantidad de factores de virulencia como proteasas (elastasas, proteasa alcalina), Fenazinas (piocianina), toxinas (exotoxina A), rhamnolípidos y cianuro de hidrógeno, mismos que representan un daño tisular importante en el hospedero al promover la muerte celular (Moradali *et al.*, 2017). Entre otros factores de *P. aeruginosa* que le permiten adquirir resistencia a los antibióticos está su enorme capacidad de formar biopelículas (Skariyachan *et al.*, 2018).

6.5 Biopelículas

La *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar agregados microbianos (biopelículas) que se componen de células bacterianas, exopolisacáridos (EPS), rhamnolípidos, ADN extracelular (eADN) y diversas proteínas (Harrington *et al.*, 2019; Rabin *et al.*, 2015; Sommer *et al.*, 2016), que constituyen un modo de crecimiento protegido que le permiten sobrevivir en ambientes hostiles, proporcionándole resistencia contra antibióticos, el sistema inmune del hospedero, bacteriófagos y desinfectantes, entre otros (Figura 4) (Harrington *et al.*, 2019; Skariyachan *et al.*, 2018; Sommer *et al.*, 2016).

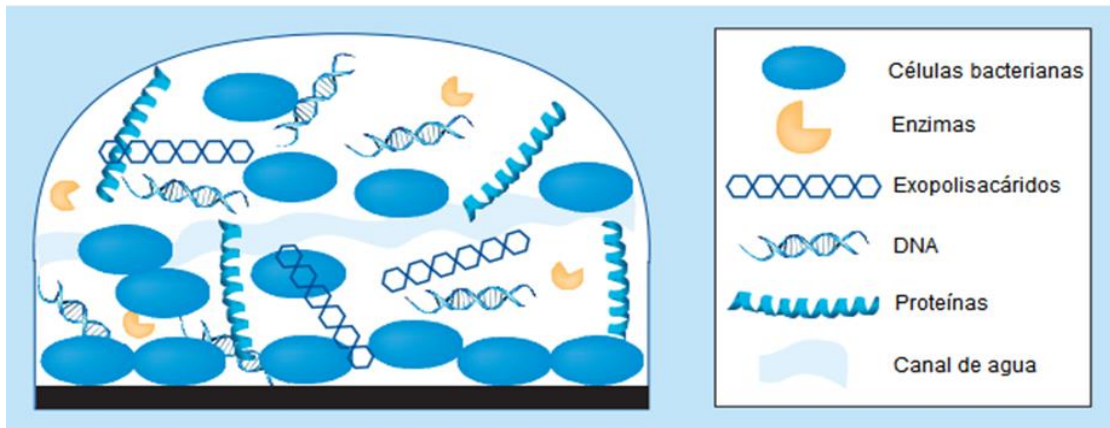


Figura 4. Componentes de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de (Rabin *et al* 2015).

Se han propuesto cinco fases en el desarrollo de la biopelícula de *P. aeruginosa* basadas en observaciones *in vitro* (Figura 5) (Skariyachan *et al.*, 2018)

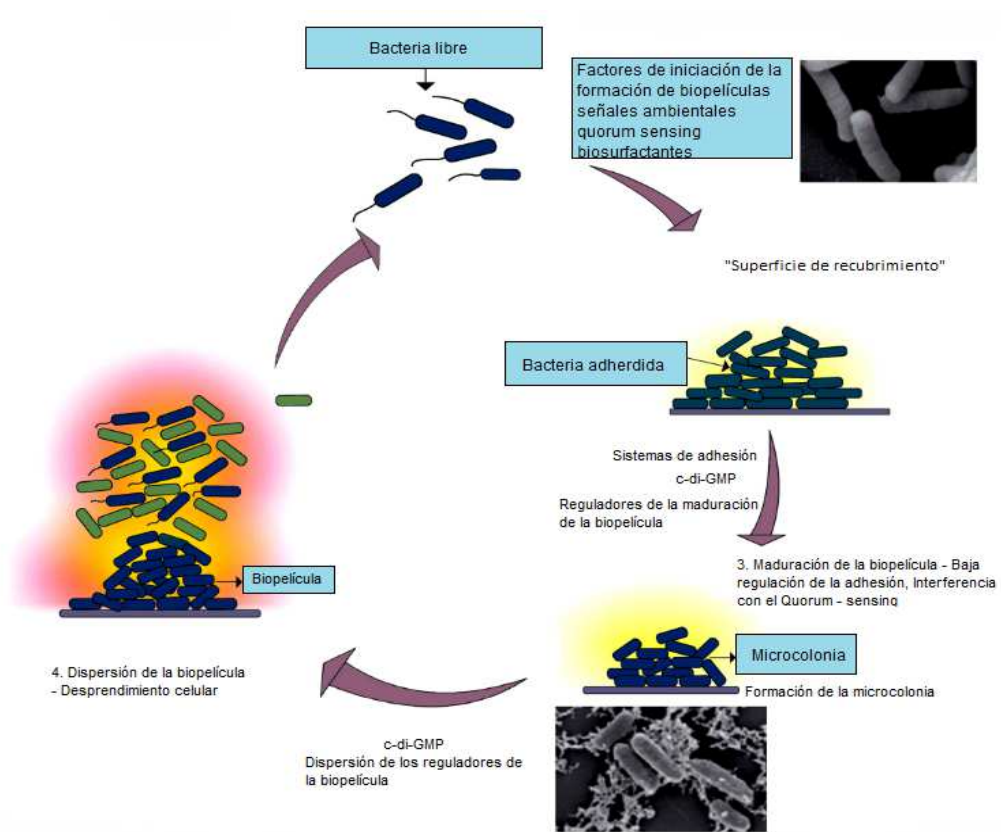


Figura 5. Esquema que muestra las fases de desarrollo de la biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* las cuales se caracterizan por iniciación, maduración y dispersión. Modificado de (Skariyachan *et al.*, 2018).

6.6 Patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*

La patogenicidad de *P. aeruginosa* es atribuida a la producción de diversos factores de virulencia incluyendo aquéllos implicados en la adherencia, captación de hierro, exoenzimas y exotoxinas (Khodayary *et al.*, 2019). Estos factores son diversos en estructura, función y localización, pero pueden ser agrupados de acuerdo a la etapa de infección en que participen (aguda o crónica) (Sommer *et al.*, 2016).

Entre la diversidad de las determinantes de virulencia, el sistema de secreción tipo III (T3SS) es considerado como el responsable de la secreción de al menos cuatro proteínas efectoras en *P. aeruginosa* incluyendo a la exoenzima S (Exo S), exoenzima T (Exo T), exoenzima Y (Exo Y) y exoenzima U (Exo U) (Berube *et al.*, 2016; Khodayary *et al.*, 2019; Winstanley *et al.*, 2016). Detalladamente, Exo S ha sido propuesta como el factor de virulencia principal requerido para la colonización, invasión y diseminación bacteriana en quemaduras e infecciones pulmonares, generando efectos complejos debido a las actividades de la proteína activadora de GTPasa (GAP) y ADP-ribosiltransferasa (ADPRT), involucradas en los mecanismos de evasión contra el sistema inmune del hospedero y la apoptosis de la célula (Khodayary *et al.*, 2019). Por otro lado, Exo T es homóloga a Exo S y realiza una actividad enzimática similar a la misma, donde la actividad de GAP impide la cicatrización de heridas, a su vez Exo U posee actividad similar a la fosfolipasa A2, resultando en la destrucción tisular y la modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero, contribuyendo enormemente en la patogénesis de cepas altamente virulentas y se asocia frecuentemente con la severidad de las infecciones por *P. aeruginosa* (Khodayary *et al.*, 2019).

Entonces, *P. aeruginosa* infecta al hospedero adhiriéndose mediante Pili tipo IV o proteínas unidas a carbohidratos (lectinas) a regiones con mecanismos de defensa débiles (Sommer *et al.*, 2016).

En muchas bacterias, la producción de factores de virulencia y la formación de biopelícula están regulados genéticamente a partir de mecanismos de comunicación bacteriana célula-célula, responsable de monitorizar la densidad poblacional y es conocido como *Quorum sensing* (QS) (Khodayary *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2016).

6.7 Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*

El QS de *P. aeruginosa* es uno de los sistemas más sofisticados de todas las especies bacterianas (Zhao *et al.*, 2016), siendo clave en la adaptación a cambios ambientales (Higgins *et al.*, 2018) y regula aproximadamente el 10% de su genoma (Kariminik *et al.*, 2017) para exhibir algunos comportamientos específicos como la resistencia a los antibióticos, formación de biopelículas, virulencia e interferencia con la respuesta inmune del hospedero (Kariminik *et al.*, 2017). Este sistema es complejo y está compuesto a su vez por cuatro sistemas de señalización interconectados, *las*, *rhl*, *pqs* e *iqs* (Figura 6) (Abelyan *et al.*, 2020). El sistema *las* es el más sobresaliente en la jerarquía de señalización, responsable de la producción de factores de virulencia como proteasas, elastasas, exotoxinas, biopelículas, entre otros (Joshi *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2004). Incluso puede regular la expresión de metabolitos secundarios como la piocianina, cianuro de hidrógeno y pioverdina, entre otros (Hentzer *et al.*, 2019).

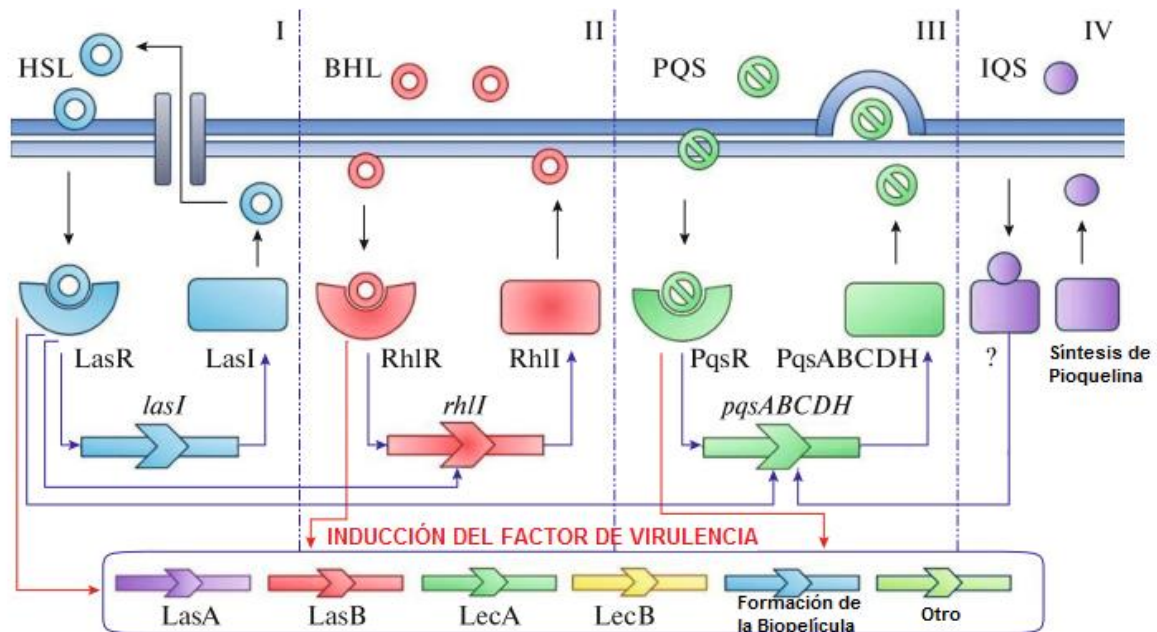


Figura 6. Sistemas de Quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa* (Abelyan et al., 2020)

P. aeruginosa utiliza moléculas llamadas autoinductores (Ais), entre las cuales se encuentran 3-oxo-C12-homoserina lactona (HSL), N-butirilhomoserina lactona o C4-HSL (BHL), 2-heptyl-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y 2-(2-hydroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (aeruginaldehído) (IQS) (Moradali et al., 2017). Estas moléculas generan la activación de rutas de señalización mediante la interacción con receptores específicos, lo que resulta en la activación de la transcripción de ciertos genes. Como consecuencia, los Ais mantienen una relación positiva con la población bacteriana y su crecimiento (Moradali et al., 2017).

6.8 Furanonas halogenadas contra *pseudomonas aeruginosa*

Las furanonas comprenden una clase interesante de compuestos heterocíclicos en química orgánica. El sistema de anillos de furanonas presente en diversos compuestos ha jugado un papel importante en el descubrimiento, diseño y

desarrollo de fracciones farmacológicamente activas. Se ha demostrado que una gran cantidad de compuestos naturales contienen este sistema de anillos y se ha reportado que exhiben diversas propiedades biológicas (Husain *et al.*, 2019). Todas derivan del furano y se han clasificado en tres categorías principales dependiendo de su estructura química: (i) furanonas 2(3H), (ii) furanonas 2(5H), (iii) furanonas 3(2H) (Figura 7) (Husain *et al.*, 2019).

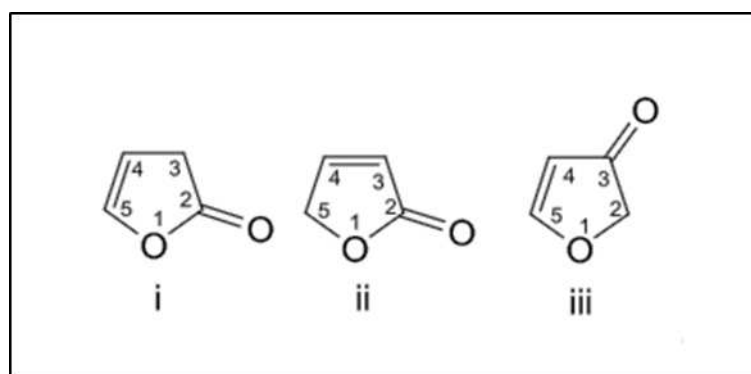
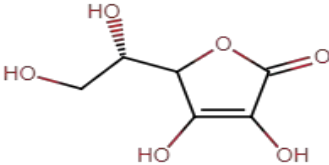
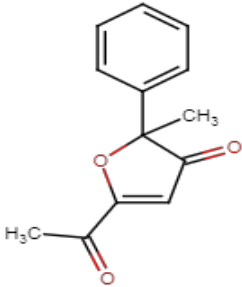
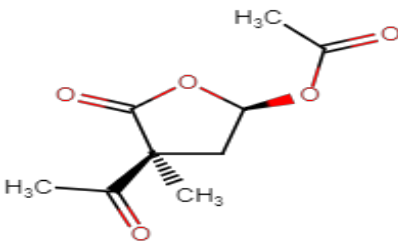
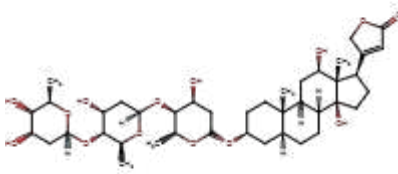
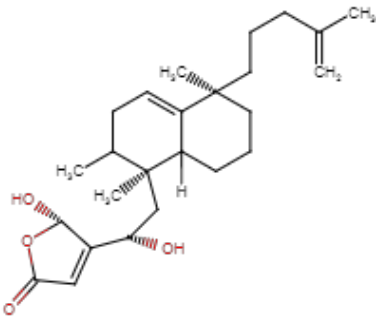
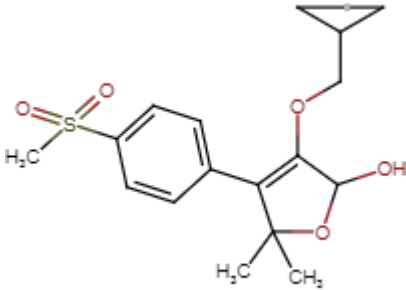
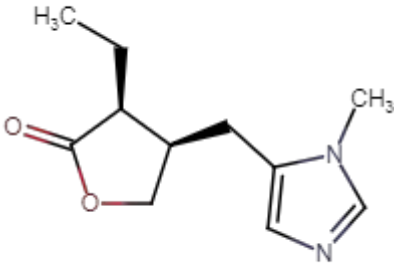
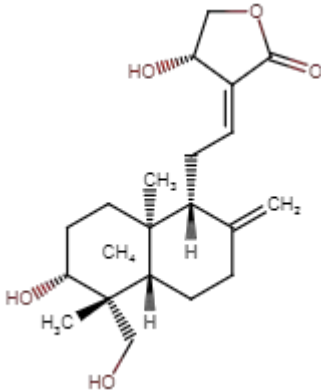


Figura 7. Estructuras químicas de furanonas -2(3H), (ii) furanonas 2(5H), (iii) furanonas 3 (2H). (Husain *et al.*, 2019).

Las furanonas han cubierto un amplio rango de actividades terapéuticas y muchos de sus derivados han sido sintetizados con el objetivo de desarrollar compuestos con actividades farmacológicas como: analgésicas, antiinflamatorias, antibacteriales, anticancerígenas, anticonvulsivas, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, antipsicóticas y antivirales, por mencionar algunas (Tabla 2) (Husain *et al.*, 2019).

Tabla 2. Furanonas y sus diferentes propiedades farmacológicas. Modificado de (Joshi et al.,2019)

Numero de compuesto	Fármaco	Estructura química	Clase terapéutica
I.	Ácido ascórbico		Antioxidante
II.	Acifrán		Agente hipoalergénico
III.	Acetomicina		Antibacterial
IV.	Digoxina		Insuficiencia cardiaca

V.	Disidiolida		Anticancerígeno
VI.	Firocoxib		Antiinflamatorio
VII.	Pilocarpina		Agente colinérgico
VIII.	Andrografólido		Antiartrítico

Las furanonas halogenadas derivadas del alga marina australiana *Delisea pulchra* han demostrado tener efectos sobre *P. aeruginosa*, incluyendo actividades antiincrustantes y antimicrobianas (Hentzer *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2004), donde la presencia de bromuro de vinil exocíclico (Figura 8) ha sido considerada una característica estructural esencial por mostrar una amplia gama de actividades biológicas (Husain *et al.*, 2019)

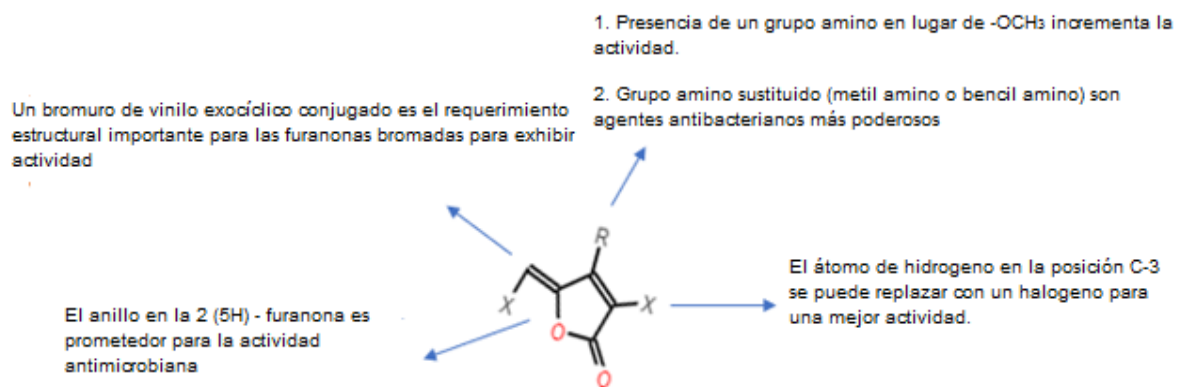


Figura 8. Furanona – 2 (5H) como potencial antimicrobiano (Husain *et al.*, 2019).

Existe evidencia de diversas furanonas de origen natural que han mostrado gran control sobre comportamientos multicelulares de cepas bacterianas (Husain *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2004), como es el caso de las furanonas 180 y 181 reportadas por Wu *et al.*, 2004, (Figura 9) que demostraron inhibir el QS de *P. aeruginosa*, consiguiendo un efecto terapéutico favorable en infecciones pulmonares de modelos animales. Se ha sugerido que su relación estructural con las N acil homoserina lactonas (AHLs) es importante para llevar a cabo ese tipo de funciones.



Figura 9. *Furanonas halogenadas* efectivas contra *Pseudomonas aeruginosa* en modelos animales (Husain *et al.*, 2019).

De igual forma (Chang *et al.*, 2019) demostró la efectividad de un compuesto derivado de furanonas halogenadas para inhibir factores de virulencia de *P. aeruginosa*, considerándose promisorio para combatir la resistencia bacteriana.

Por otra parte, (Christensen *et al.*, 2012) realizó un ensayo con ratones ,para medir el efecto sinérgico de la tobramicina y la furanona C 30, obteniendo resultados favorables en el aclaramiento de la *P. aeruginosa* demostrando el gran potencial de estos compuestos en modelos animales. (Wu *et al.*, 2004) probó la capacidad de dos furanonas sintéticas para atenuar la virulencia bacteriana en modelos de ratón con infección pulmonar con *P. aeruginosa*, en donde se demostró la inhibición del sistema *quórum* bacteriano y mostraron efectos terapéuticos favorables sobre la infección pulmonar por *P. aeruginosa*.

7. JUSTIFICACIÓN

En años recientes, microorganismos diversos han adquirido resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, donde *P. aeruginosa* figura como un patógeno oportunista y MDR de importancia que afecta principalmente las vías aéreas de pacientes con FQ, causando infecciones cada vez más difíciles de erradicar debido a la adquisición de resistencia incluso a fármacos de diseño reciente.

Es evidente la necesidad de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos que permitan combatir infecciones por *P. aeruginosa*, donde las furanonas halogenadas figuran como promisorias debido a que algunas de ellas han evidenciado inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*. Sin embargo, es necesario evaluar la concentración inhibitoria mínima de furanonas halogenadas de extracción reciente para seleccionar aquéllas con las mejores características antimicrobianas, antes de ser evaluadas en otros modelos *in vitro* e *in vivo*.

8. HIPOTESIS

Las furanonas halogenadas inhiben el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* impidiendo su proliferación.

9. OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de furanonas halogenadas contra *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con Fibrosis Quística.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de siete furanonas halogenadas contra cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ.

10. METODOLOGÍA

10.1 Muestras biológicas

De acuerdo a los estándares del Comité de Bioseguridad del Instituto Nacional de Pediatría para el proyecto con número de registro 056/2019, las muestras de secreciones respiratorias (esputo, lavado bronquioalveolar o expectoración) se obtuvieron de pacientes pediátricos con FQ atendidos en el Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Pediatría (SNCT-INP) y trasladados al Laboratorio de Bacteriología Experimental para el aislamiento, identificación y almacenamiento de cepas de *P. aeruginosa* de acuerdo al esquema de pruebas bioquímicas sugerido por la American Society for Microbiology (ASM) (CLSI *et al.*, 2017).

Debido a que la toma de secreciones respiratorias de pacientes con FQ constituye parte de su tratamiento habitual y que no son sometidos a ninguna maniobra adicional para los propósitos de este protocolo, no se requirieron cartas de consentimiento o de asentimiento.

10.2 Principios activos

Las siete furanonas halogenadas se obtuvieron del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM, mismos que fueron solubilizados con dimetilsulfóxido (DMSO) y/o H₂O/LN, y almacenados a -20°C hasta su uso, siguiendo las recomendaciones de los documentos (M07 y M100) para compuestos insolubles en agua del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de los Estados Unidos (CLSI) (CLSI et al., 2017).

10.3 Extracción de ADN de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Se extrajo ADN genómico de cada cepa de *P. aeruginosa* de acuerdo al método de GES (Fujimoto *et al.*, 2004; Riffian *et al.*, 2015), se inoculó una colonia aislada en 3 mL de caldo BHI y se incubó a 37° C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 1000 rpm durante 15 min y se resuspendió el sedimento en 100 µL de buffer TE y se agregaron 250 µL de solución GES y 2 µL de proteinasa K, seguido de su incubación a 65 °C durante 1 h, invirtiendo el tubo cada diez min para mezclar adecuadamente, después se mantuvo en baño de hielo durante 10 min.

A la mezcla se le agregaron 250 µL de acetato de amonio frío manteniendo la solución en hielo por 10 min. Posteriormente se colocaron 500 µL de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (a:b:c) y se centrifugó durante 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un microtubo nuevo, al cual se le añadieron 500 µl de cloroformo frío, se mezcló la solución por inversión seguido de su

centrifugación durante 10 min a 14000 rpm y la recuperación del sobrenadante en un microtubo nuevo.

La solución obtenida fue tratada con 500 μ L de isopropanol y mezclada por inversión, seguida de su centrifugación durante 1 min a 10000 rpm. El sedimento obtenido se lavó dos veces con 600 μ L de etanol y se centrifugó por lapsos de 1 min a 12000 rpm para recuperar el sedimento, mismo que fue secado a 37 °C durante 1 h para finalmente ser hidratado con 50 μ L de agua libre de nucleasas (H_2O_{LN}) y almacenado a -20 °C.

10.4 Análisis cualitativo-cuantitativo del ADN genómico

El ADN extraído fue cuantificado por El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría UV/Vis mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, siguiendo las recomendaciones del fabricante y aquellas suspensiones que cumplieron con los valores óptimos de pureza se utilizaron para evaluar la integridad del DNA obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) empleando como amortiguador una solución de Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1X, cargando en cada pozo del gel 5 μ L de ADN extraído de las cepas de trabajo y permitiendo un corrimiento a 90 V por 45 min para posteriormente visualizar la integridad mediante un Transiluminador de luz UV (UVP®, Ultra-Violet Products), determinando como muestras íntegras aquéllas con bandas de peso molecular elevado y sin evidencia de barrido en cada carril.

10.5 Identificación molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

La identificación molecular de las cepas de *P. aeruginosa* se realizó mediante PCR, utilizando un iniciador especie-específico para *P. aeruginosa*, para identificar el género y especie de cada cepa. Se utilizaron tres controles positivos (ATCC 27853, ATCC27855 o ATCC 15692) y tres controles negativos (*Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*), así como un control sin ADN. Cada mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix® (Taq + dNTPs + buffer + Mg), 0.25 µL de Forward primer (PA1 10 µM), 0.25 µL de Reverse primer (PA2 10 µM) y 11 µL de H₂O_{LN} y 50 µg/mL de ADN genómico y amplificado en un termociclador ARKTIK Thermal Cycler de Thermo Scientific® bajo las temperaturas señaladas en la Tabla 3.

Tabla3. Iniciador especie específico para *P. aeruginosa*

Blanco	Iniciador	Secuencia	Amplicón (pb)	Condiciones de amplificación	
				Ciclo	Condiciones de amplificación
16S-23S rDNA (Espacio de transcrito interno)	PA1	5- TCCAAACAATC GTCGAAAGC-3	181	1	Desnaturalización inicial: 95°C/ 5 min
				35	Desnaturalización: 94°C/ 45 seg Alineación: 58°C/ 45 seg Extensión: 72°C/ 5 min
	PA2	5- CCGAAAATTTCG CGCTTGAAC-3		1	Extensión final: 72°C/ 5 min

10.6 Visualización de amplicones

Se tomaron 5 µL de cada producto de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 1.5 % teñidos con EtBr, empleando como amortiguador una solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X y 1 µL del marcador de pesos molecular Gene Ruler 100 bp de Thermo Scientific® en el primer pozo del gel para verificar el peso molecular de los amplicones obtenidos de la PCR. El gel fue corrido a 90 V durante 30 min, para finalmente visualizar los amplicones en el Transiluminador y así verificar que las bandas presentaran el peso molecular esperado.

10.7 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* contra las furanonas 1-7, para determinar la actividad *in vitro* de las furanonas halogenadas como compuestos antimicrobianos, se siguió la metodología recomendada por el Instituto de Estándares Clínicos de los Estados Unidos (CLSI), empleando un sistema de placa de micro-pozos para la evaluación de nuevas moléculas con posible actividad antimicrobiana. Las pruebas se realizaron por triplicado, para realizar un análisis estadístico adecuado.

Las cepas de referencia (PAO1, 27853 y 27855) y las cepas de trabajo (Pa03m, Pa25r y Pa77r) fueron sembradas en caldo de Müller-Hinton (MHB, Becton Dickinson®) e incubadas a 36-37 °C en agitación hasta observar la turbidez equivalente al tubo 0.5 de acuerdo a los estándares de turbidez de la escala de McFarland (con una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 UFC/ mL.) y ajustada a una absorbancia de 0.08 con un espectrofotómetro BECKMAN DU® 640 a longitud de onda de 625 nm.

Posteriormente, las placas fueron preparadas con una concentración final de 5×10^5 UFC de *P. aeruginosa* en los 200 μL de volumen final de cada micropozo, como se indica en la Figura 10. Se prepararon las diluciones de cada furanona para determinar la CIM, y se usaron concentraciones de 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Asimismo, en cada microplaca se colocaron cuatro controles: control negativo (MHB), control positivo (MHB con cultivo), control negativo de crecimiento (MHB con DMSO) y control de crecimiento con DMSO (MHB con cultivo y DMSO).

		200 μL MHB	180 μL + 20 μL cultivo	198 μL MHB + 2 μL DMSO	178 μL MHB + 20 μL cultivo + 2 μL DMSO	178 μL MHB + 20 μL cultivo + 2 μL furanona								
Pa01	A													
27855	B													
27853	C													
	D													
Pao1	E													
27855	F													
27853	G													
	H													

Figura 10. Diseño de la placa de micro pozos para ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

Posteriormente se incubaron las placas a 37 °C durante 18-24 h. Pasado el tiempo de incubación se leyó la placa en un espectrofotómetro EL800 de BIO-TEK Instruments, Inc, a una longitud de onda de 630 nm con la finalidad de detectar la CIM a la que cada furanona inhibió el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa*.

Finalmente se realizó el sembrado masivo de cada cepa sobre placas de MHA para determinar el número de colonias aisladas, se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo de cada placa.

10.8 Análisis estadístico

Los datos de absorbancias correspondientes a la CIM de cada una de las furanonas fueron analizados con el paquete estadístico *JMP Statistical Discovery*TM versión 11, empleando la prueba de Tukey para la comparación de las medias de las CIM de las siete furanonas y determinar aquella con mejores propiedades antibacterianas contra *P. aeruginosa*.

11. ACTIVIDADES REALIZADAS

- Manejo de las cepas de *P. aeruginosa* en las distintas etapas del proyecto, desde el manejo del cepario, resembrado en diferentes medios de cultivo, pruebas bioquímicas y moleculares para su identificación, etc.
- Preparación de diferentes medios de cultivo siguiendo la metodología indicada, empleando el material adecuado y trabajando en áreas estériles para evitar cualquier forma de contaminación que afectara el proceso de identificación.
- Identificación de *P. aeruginosa* mediante pruebas moleculares, se realizaron técnicas como la extracción de ADN, PCR, electroforesis en gel de agarosa.
- Se llevó a cabo el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana por microdiluciones en placas de ELISA, empleando los diferentes compuestos halogenados y el caldo de cultivo adecuado con las cepas de *P. aeruginosa*.

- Manejo de sustancias RPBI que se obtuvieron durante todo el proyecto, desde su manipulación, hasta desecharlos correctamente, además del lavado y esterilización del material empleado.
- Se realizó el análisis de resultados empleando estadística descriptiva para interpretar de forma clara lo obtenido en la metodología del proyecto.

12. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Se demostró el efecto de las furanonas halogenadas sobre cepas de *P. aeruginosa*, evidenciando un efecto bacteriostático y/o bactericida en cada caso, a pesar de que no todas las furanonas demostraron ser eficaces, sí se puede decir con gran satisfacción que una furanona halogenada demostró potencial para futuras investigaciones, lo cual permite probar la hipótesis de este proyecto planteada al inicio. El diseño y estandarización de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana representó un reto ya que se diseñó desde cero siguiendo las recomendaciones del CLSI obteniendo resultados favorables para cada furanona halogenada permitiéndonos avanzar de forma satisfactoria en el desarrollo de la investigación.

13. RESULTADOS

13.1 Identificación molecular de cepas de *P.aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ.

Para la identificación molecular de *P. aeruginosa*, se trabajaron un total de nueve cepas bacterianas, categorizadas de la siguiente manera: tres cepas de referencia utilizadas como controles positivos para la prueba molecular, tres cepas de

Pseudomonas sin incluir a *P. aeruginosa* (*P. alcaligenes*, *B. cepacia* y *S. maltophilia*) empleadas como controles negativos y tres cepas de trabajo (Pa03m, Pa25r y Pa77r), con diferentes características de resistencia a los antibióticos (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas

Género y especie	Descripción	Resistencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepa Pa25r Resistente a múltiples fármacos (MDR)	Penicilinas Monobactámicos Carbapenémicos Fluoroquinolonas
	Cepa Pa03m Extensamente resistente a los fármacos (XDR)	Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactámicos Carbapenémicos Aminoglucósidos Fluoroquinolonas
	Cepa Pa77r Resistente a dos grupos de fármacos (DR2)	Aminoglucósidos Fluoroquinolonas

El ADN genómico de cada cepa bacteriana fue extraído por medio de solventes orgánicos, obteniendo ADN con valores de pureza (Figura 11) (Figura 12) (Figura 13) (Figura 14) y (Figura 15) e integridad (Figura 16) adecuados para la identificación molecular.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	PA01-1	INP	19/09/2018 08:31:14 a. m.	5283.1	ng/ul	105.662	50.545	2.09	2.03	DNA	50.00
3	27853-1	INP	19/09/2018 08:38:45 a. m.	7719.2	ng/ul	154.385	74.271	2.08	1.93	DNA	50.00
5	27855-1	INP	19/09/2018 08:41:24 a. m.	9753.3	ng/ul	195.086	91.144	2.14	2.26	DNA	50.00

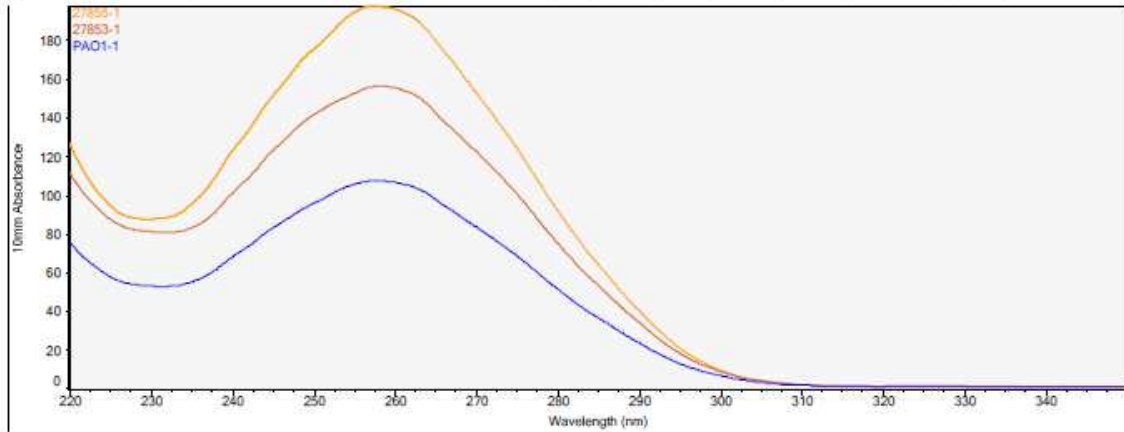


Figura 10. Absorbancia de cepas de referencia (se muestra el resultado de la cuantificación del ADN extraído de las cepas PA01-1, Pa27853-1 y Pa27855-1, las cuales cumplen con criterios de concentración, pureza e integridad).

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
3	20181012. Pa03m	INP	12/10/2018 12:26:22 p. m.	1523.6	ng/ul	30.473	14.391	2.12	2.39	DNA	50.00

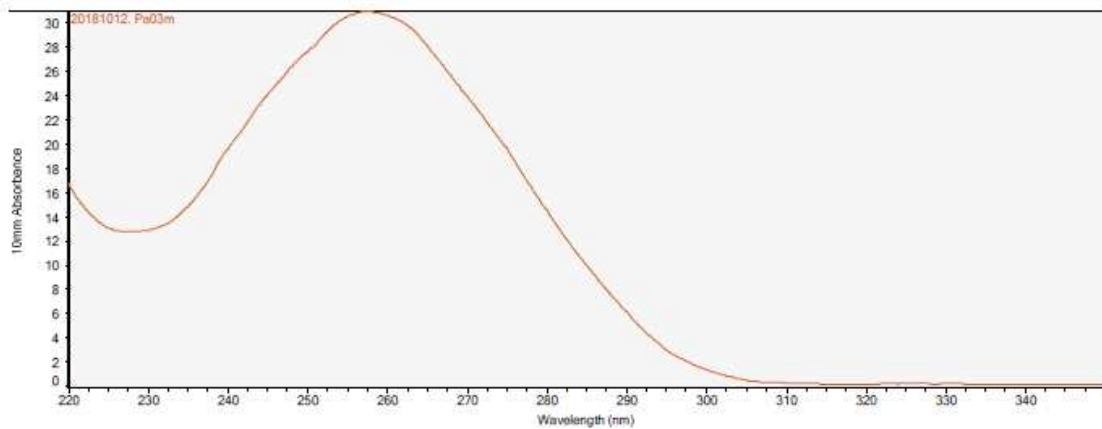


Figura 11. Absorbancia de la cepa Pa03m (se muestra el resultado de la cuantificación del ADN extraído de la cepa Pa03m, la cual cumple con los criterios de concentración, pureza e integridad).

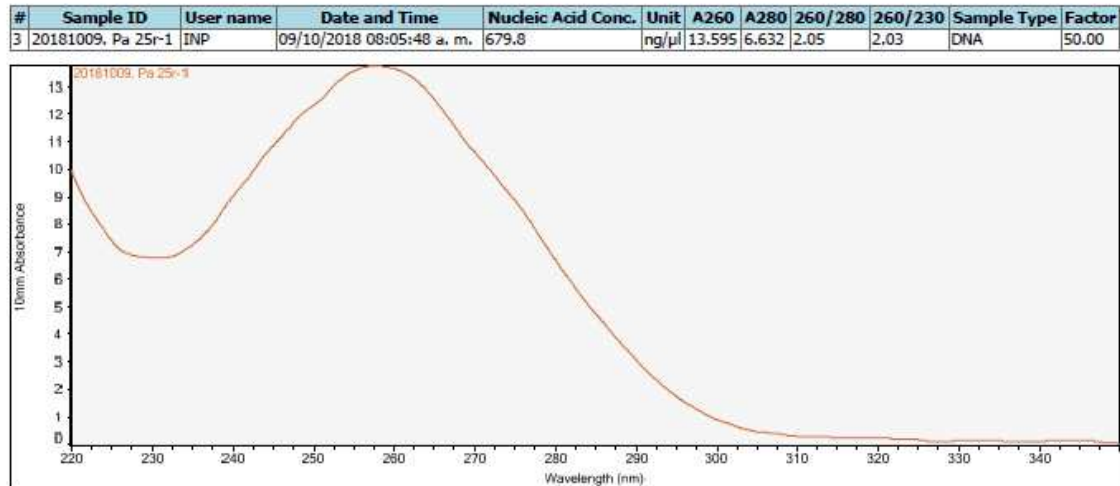


Figura 12. Absorbancia de la cepa Pa25r (se muestra el resultado de la cuantificación del ADN extraído de la cepa Pa25r, la cual cumple con los criterios de concentración, pureza e integridad).

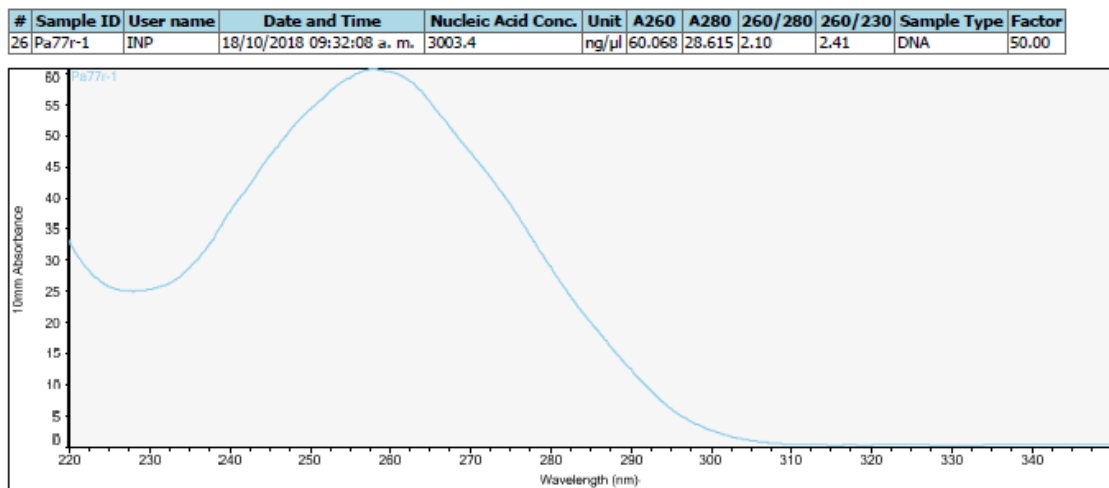


FIGURA 13. ABSORBANCIA DE LA CEPA PA77r (SE MUESTRA EL RESULTADO DE LA CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO DE LA CEPA PA77r, LA CUAL CUMPLE CON LOS CRITERIOS DE CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD).

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
2	S.maltophilia	INP	21/12/2018 01:52:05 p. m.	7135.7	ng/ul	142.715	64.365	2.22	2.25	DNA	50.00
3	P. alcaligenes	INP	21/12/2018 01:53:06 p. m.	4353.4	ng/ul	87.068	39.719	2.19	2.24	DNA	50.00
5	B.cepacia	INP	21/12/2018 01:54:48 p. m.	2907.6	ng/ul	58.153	26.785	2.17	2.19	DNA	50.00

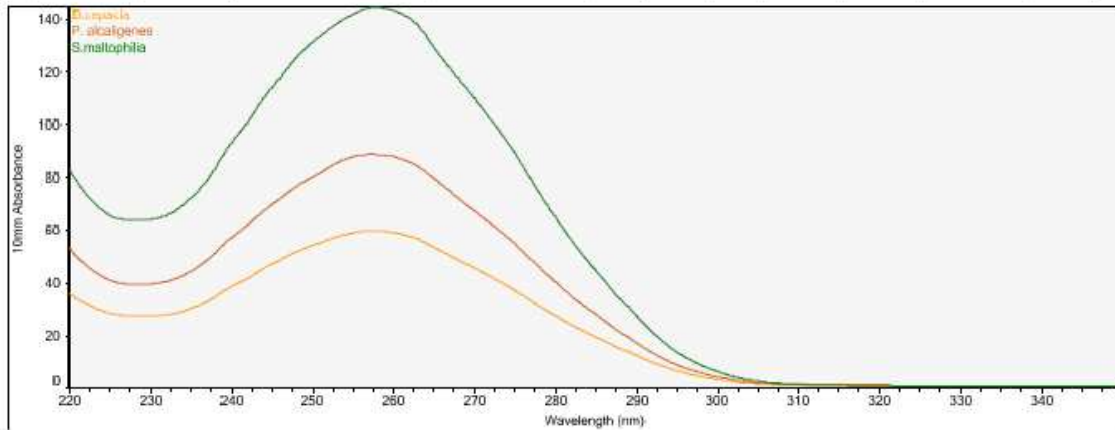


FIGURA 14. ABSORBANCIAS DE LAS CEPAS CONTROL NEGATIVO (SE MUESTRA EL RESULTADO DE LA CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO DE LAS CEPAS S. MALTOPHILIA, P. ALCALIGENES Y B. CEPACIA, LAS CUALES CUMPLEN CON LOS CRITERIOS DE CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD).

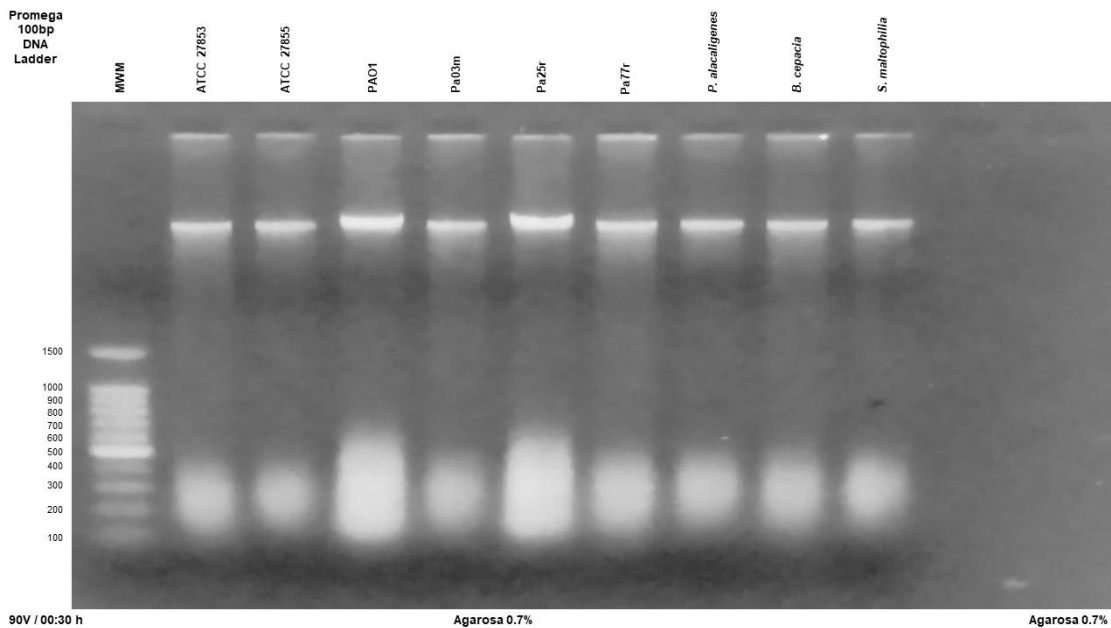


FIGURA 15. INTEGRIDAD DE LAS CEPAS EMPLEADAS (LA IMAGEN CORRESPONDE A UN GEL DE AGAROSA AL 0.7% EN EL CUAL SE APRECIA LA INTEGRIDAD DE CADA NUESTRA CORRESPONDIENTE A CADA CEPA EMPLEADA, NINGUNA CEPA MOSTRÓ DEGRADACIÓN EN EL GEL).

Respecto al PCR especie-específico, tanto las cepas de referencia como las cepas de trabajo mostraron amplicones de 181 pb mientras las cepas no-*P. aeruginosa*

carecieron de amplicones (Figura17), permitiendo asegurar el género y especie de las tres cepas de trabajo.

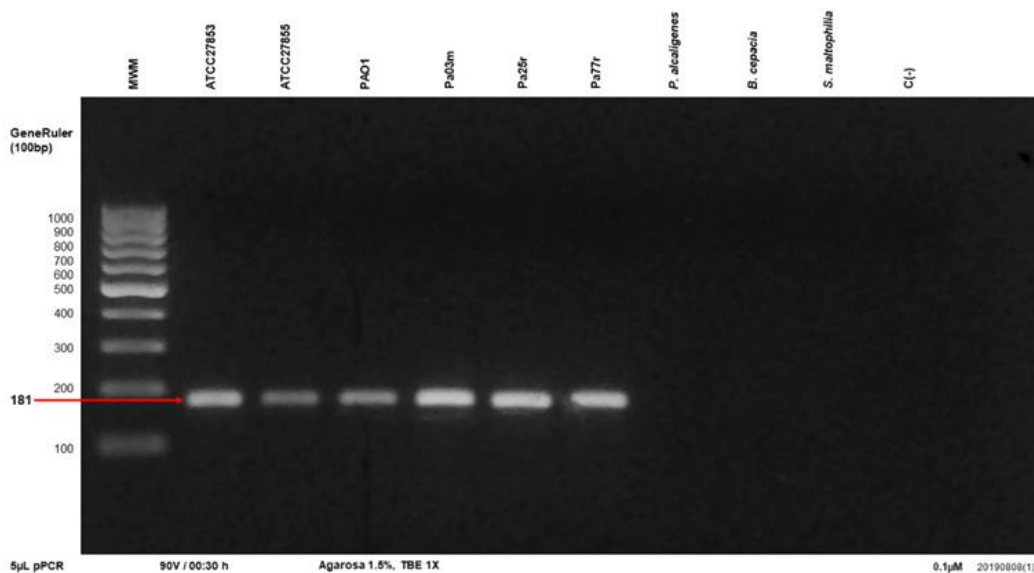


FIGURA 16. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR (SE MUESTRAN LAS DIFERENTES CEPAS DE *P. aeruginosa* EMPLEADAS, LOS FRAGMENTOS DE CADA CEPA SON DE 181 PB, LOS CONTROLES NEGATIVOS (*S. MALTOPHILIA*, *P. ALCALIGENES* Y *B. CEPACIA*) NO AMPLIFICARON EVIDENTEMENTE.)

13.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CIM de cada furanona fue evaluada como se describió anteriormente empleando concentraciones desde 192 µg/mL hasta 512 µg/mL.

Se encontró que la furanona 7 fue la que presentó la CIM menor, al demostrar tener la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas Pa25r (figura 18), Pa77r (figura 19) y Pa03m (figura 20). No se muestran los resultados a otras concentraciones de cada compuesto debido a que los valores de absorbancia eran mayores, demostrando que el efecto bacteriostático o bactericida ejercido por la furanona fue menor, absorbancias cercanas a 0 reflejan una población bacteriana escasa o nula,

mientras que una absorbancia mayor a 0 evidencia que la concentración de la furanona no logra controlar el crecimiento bacteriano, a concentraciones mayores de las furanonas, las absorbancias de las suspensiones bacterianas deben ser menores, por lo que se seleccionaron aquellas que exhibían mejores resultados (menores absorbancias) para el objetivo de este proyecto.

Posteriormente a conocer la CIM se determinó el efecto bactericida de cada cepa por sembrado masivo en placas de Petri en medio MHB, incubadas a 37 °C durante 24 h, se realizó el conteo de colonias aisladas por placa, encontrando ausencia de colonias de *P. aeruginosa* para las concentraciones 192 µg/mL y 256 µg/mL del compuesto 7.

Las concentraciones de furanona fueron colocadas de la siguiente manera:

Pa25r												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 1	
B	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 2	
C	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 3	
D	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 4	
E	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	341	341	341	341	426	426	426	426	Compuesto 5	
F	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 6	
G	200 µL MHB	180 µL + 20 µL cultivo	192	192	192	192	256	256	256	256	Compuesto 7	
H	Control Negativo	Control Positivo	µg/mL									

FIGURA 17. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA LA CEPA PA25r (SE MUESTRA EL DISEÑO DE LA PLACA, COLUMNA 1 Y 2 CORRESPONDEN A CONTROLES NEGATIVO Y POSITIVO, DE LA COLUMNA 3-10 LA CONCENTRACIÓN DE CADA COMPUESTO, Y LA COLUMNA 11 Y 12 QUEDARON LIBRES)

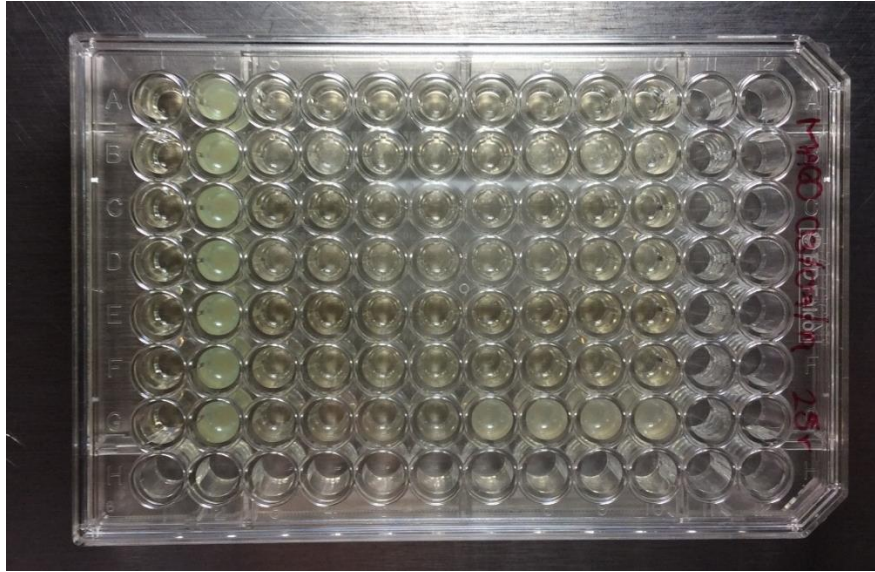


FIGURA 18. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD PARA LA CEPA PA25R (LA FIGURA MUESTRA UNA PLACA DE 96 POZOS EN LA CUAL SE PUEDE OBSERVAR CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA SEGUNDA COLUMNA (CONTROL POSITIVO), MIENTRAS QUE EN EL RESTO DE COLUMNAS (3-10) SE OBSERVA EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS FURANONAS SOBRE LA CEPA PA25R).

Pa03m

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 1	
B	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 2	
C	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 3	
D	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 4	
E	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	341	341	341	341	426	426	426	426	Compuesto 5	
F	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 6	
G	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	192	192	192	192	256	256	256	256	Compuesto 7	
H	Control Negativo	Control Positivo	μ g/mL									

FIGURA 19. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA LA CEPA PA03M (SE MUESTRA EL DISEÑO DE LA PLACA PARA EL ENSAYO, COLUMNA 1 Y 2 CORRESPONDEN A CONTROLES NEGATIVO Y POSITIVO, DE LA COLUMNA 3-10 LA CONCENTRACIÓN DE CADA COMPUESTO, Y LA COLUMNA 11 Y 12 QUEDARON LIBRES)

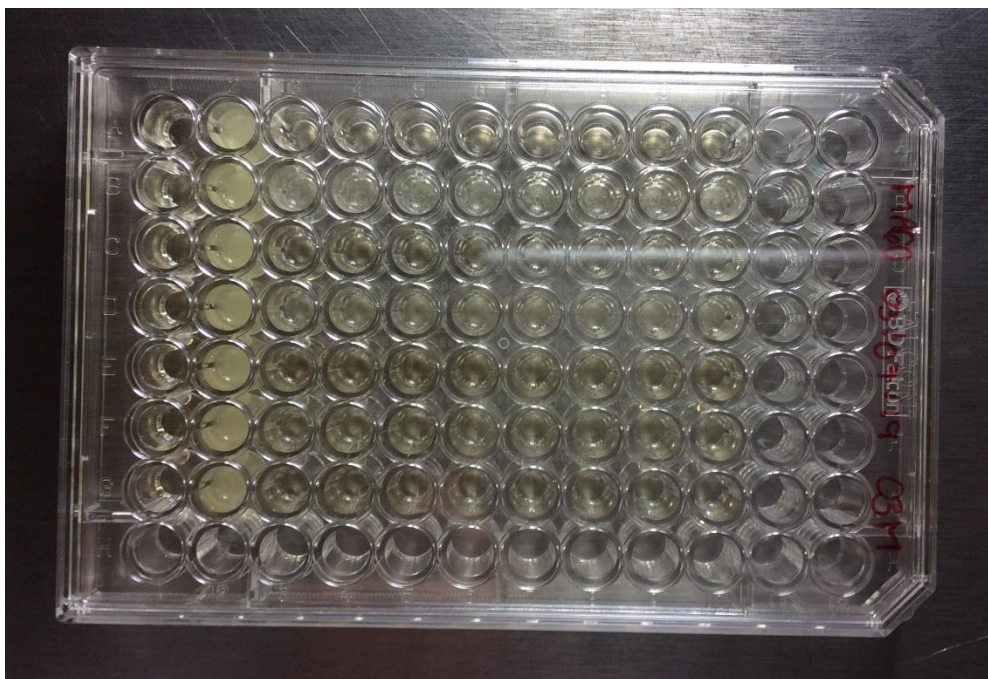


FIGURA 20. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD PARA LA CEPA PA03M (LA FIGURA MUESTRA UNA PLACA DE 96 POZOS EN LA CUAL SE PUEDE OBSERVAR CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA SEGUNDA COLUMNA (CONTROL POSITIVO), MIENTRAS QUE EN EL RESTO DE COLUMNAS (3-10) SE OBSERVA EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS FURANONAS SOBRE LA CEPA PA03M).

Pa77r													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 1		
B	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 2		
C	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 3		
D	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 4		
E	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	341	341	341	341	426	426	426	426	Compuesto 5		
F	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	426	426	426	426	512	512	512	512	Compuesto 6		
G	200 μ L MHB	180 μ L + 20 μ L cultivo	192	192	192	192	256	256	256	256	Compuesto 7		
H	Control Negativo	Control Positivo	μ g/mL										

FIGURA 21. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA LA CEPA PA77r (SE MUESTRA EL DISEÑO DE LA PLACA, COLUMNA 1 Y 2 CORRESPONDEN A CONTROLES NEGATIVO Y POSITIVO, DE LA COLUMNA 3-10 LA CONCENTRACIÓN DE CADA COMPUESTO, Y LA COLUMNA 11 Y 12 QUEDARON LIBRES).

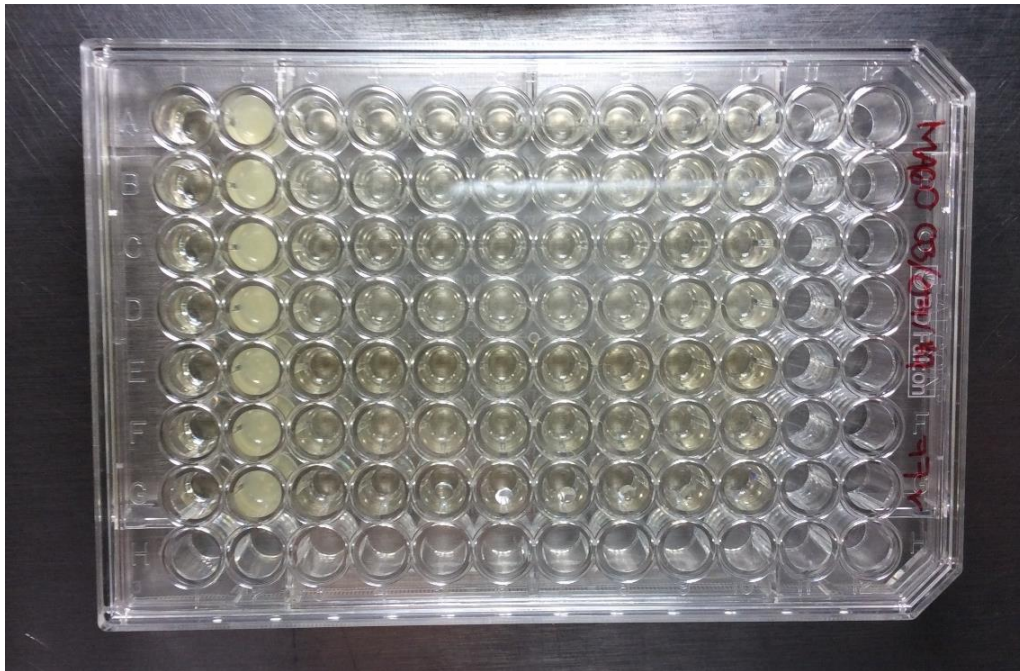


FIGURA 22. ENSAYO SUSCEPTIBILIDAD PARA LA CEPA PA77R (LA FIGURA MUESTRA UNA PLACA DE 96 POZOS EN LA CUAL SE PUEDE OBSERVAR CRECIMIENTO BACTERIANO EN LA SEGUNDA COLUMNA (CONTROL POSITIVO), MIENTRAS QUE EN EL RESTO DE COLUMNAS (3-10) SE OBSERVA EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS FURANONAS SOBRE LA CEPA PA77R).

13.3 Análisis estadístico

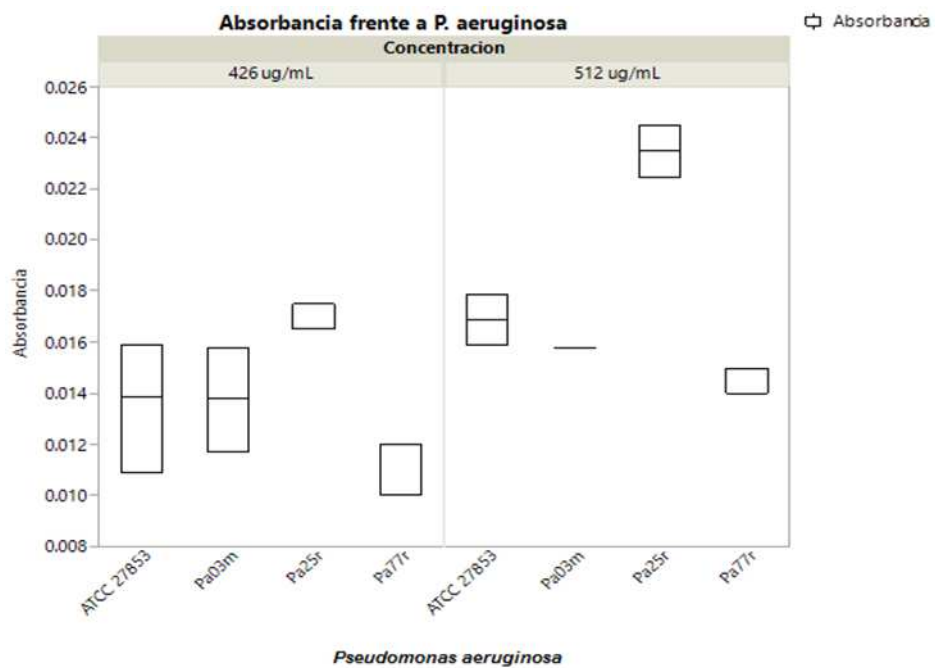


FIGURA 23. COMPUESTO 1. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIA (la figura muestra la absorbancia de cada cepa empleada a concentraciones de 426 µg/mL y 512 µg/mL).

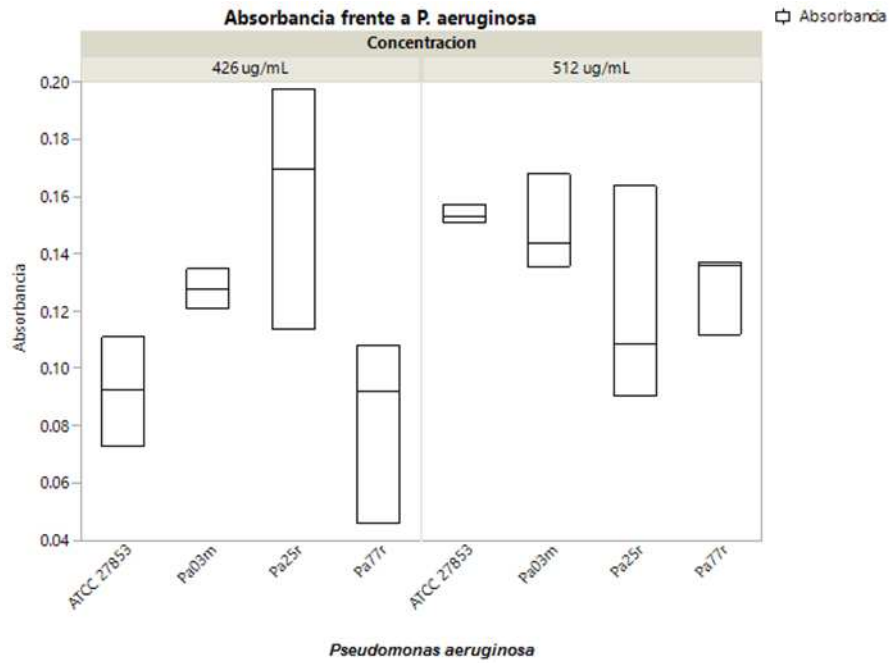


FIGURA 24. COMPUESTO 2. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIAS (LA FIGURA MUESTRA LA ABSORBANCIA DE CADA CEPA EMPLEADA A CONCENTRACIONES DE 426 µG/ML Y 512 µG/ML).

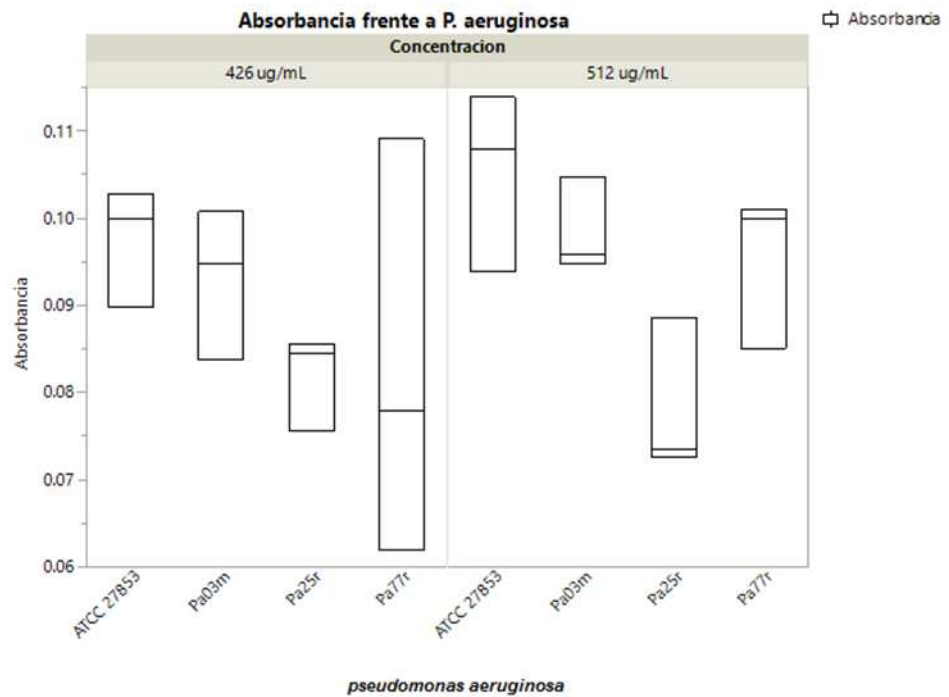


FIGURA 25. COMPUESTO 3. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIA (LA FIGURA MUESTRA LA ABSORBANCIA DE CADA CEPA EMPLEADA A CONCENTRACIONES DE 426 µG/ML Y 512 µG/ML).

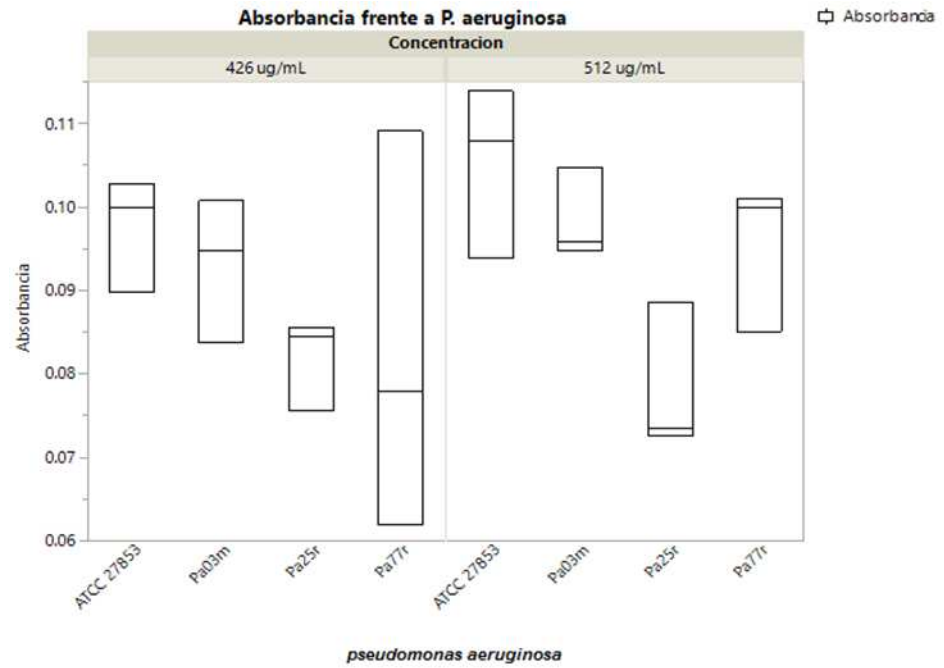


FIGURA 26. COMPUESTO 4. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIA (LA FIGURA MUESTRA LA ABSORBANCIA DE CADA EMPLEADA A CONCENTRACIONES DE 426 µG/ML Y 512 µG/ML).

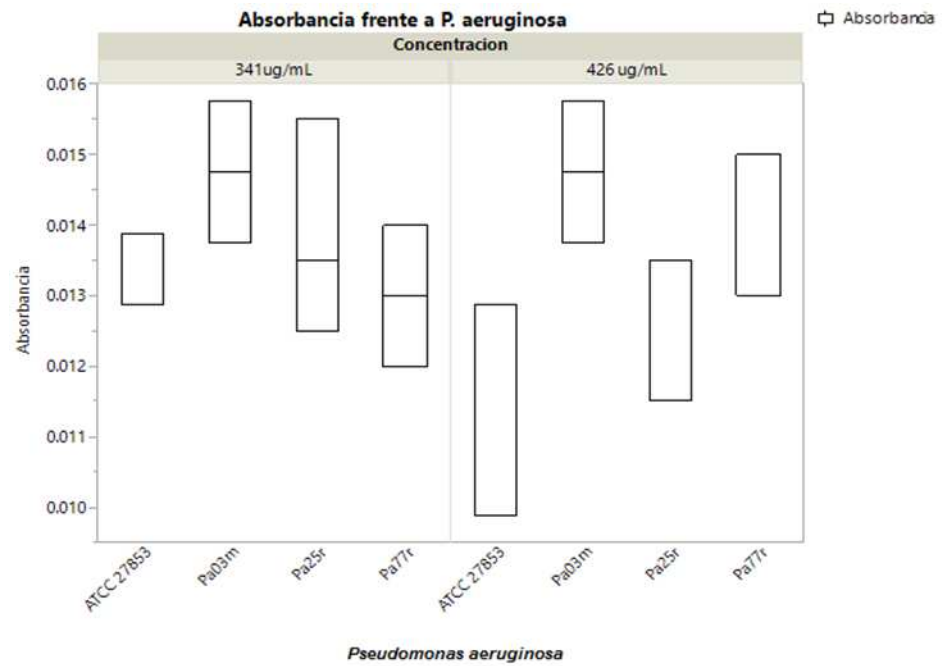


FIGURA 27. COMPUESTO 5. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIA (LA FIGURA MUESTRA LA ABSORBANCIA DE CADA CEPA EMPLEADA A CONCENTRACIONES DE 341 µG/ML Y 426 µG/ML).

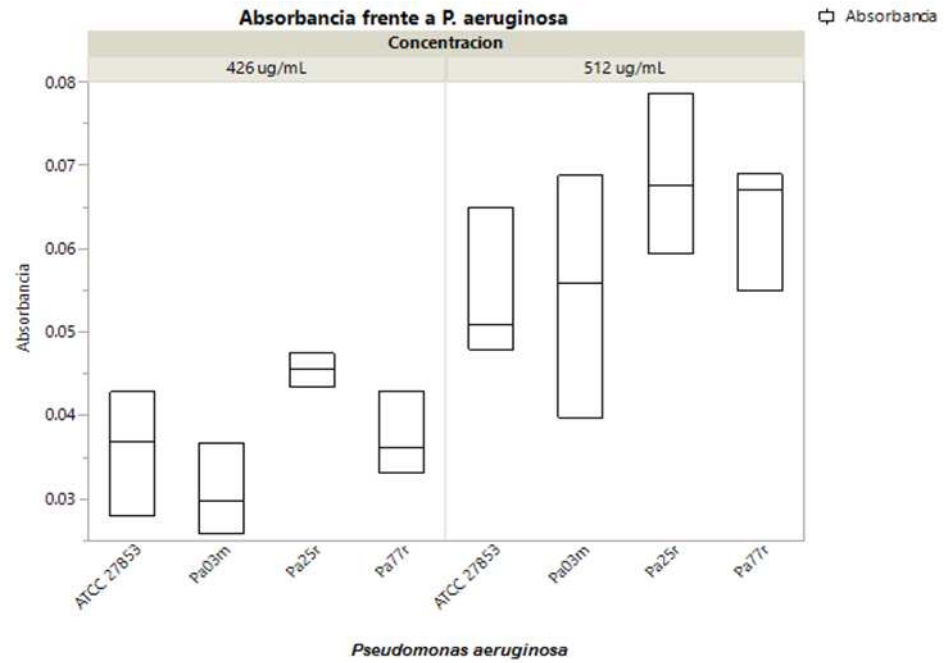


FIGURA 28. COMPUESTO 6. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIAS (LA FIGURA MUESTRA LA ABSORBANCIA DE CADA CEPA EMPLEADA A CONCENTRACIONES DE 426 µG/ML Y 512 µG/ML).

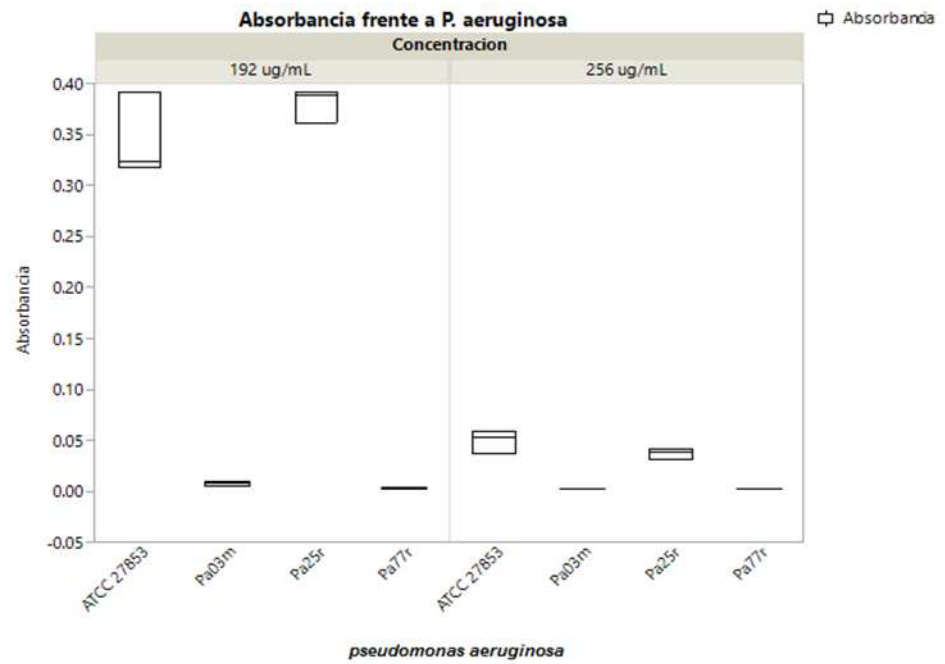


FIGURA 29. COMPUESTO 7. CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA VS ABSORBANCIA (LA FIGURA MUESTRA LA ABSORBANCIA DE CADA CEPA EMPLEADA A CONCENTRACIONES DE 192 µG/ML Y 256 µG/ML).

En el análisis estadístico se obtuvieron resultados variados, se esperaban valores de absorbancia menores a medida que la concentración del compuesto aumentaba, sin embargo no en todos los análisis se obtuvo este resultado, para el compuesto 1 (Figura 24) el efecto bacteriostático mayor se demostró a una concentración de 426 $\mu\text{g/mL}$, reflejado en una menor absorbancia, en comparación con la concentración de 512 $\mu\text{g/mL}$, para el compuesto 2 (Figura 25) se obtuvo el mismo resultado excepto para la cepa Pa25r en la cual la As a 426 $\mu\text{g/mL}$ fue mayor que a 512 $\mu\text{g/mL}$ estos resultados son similares a lo obtenido por (Chang et al., 2019), el cual obtuvo valores de CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$ hasta 1024 $\mu\text{g/mL}$, de igual forma para los cuatro compuestos consiguientes ;el compuesto 3 (figura 26) se obtuvo un efecto bacteriostático mayor a 512 $\mu\text{g/mL}$, en el compuesto 4 (figura 27) las As fueron ligeramente mayores a 512 $\mu\text{g/mL}$, excepto para la cepa Pa25r nuevamente, para el compuesto 5 (Figura 28) no se obtuvieron diferencias significativas entre concentraciones, para el compuesto 6 (Figura 29) las absorbancias fueron menores a 426 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con la concentración de 512 $\mu\text{g/mL}$ y finalmente el compuesto 7 (Figura 30) demostró menores absorbancias en todas las cepas, llegando valores muy cercanos a cero en las cepas Pa03m y Pa77r, este resultado se asemeja a lo reportado por (Chang et al., 2019) el cual reporta que para su compuesto más destacable obtuvo el efecto inhibitor sobre cepas de *P. aeruginosa* a 256 $\mu\text{g/mL}$ y 128 $\mu\text{g/mL}$ partiendo de la CIM inicial, obteniendo resultados favorables, mientras que para las cepas ATCC27853 y Pa25r fueron ligeramente mayores demostrando el mejor efecto bacteriostático de todos los compuestos.

14. CONCLUSIONES

El compuesto más destacable fue la furanona 7, mostrando CIM menor para las cepas de referencia y dos cepas de aislados clínicos: Pa03m (Extensamente resistente a los antibióticos) y Pa77r (Resistente a dos grupos de antibióticos). La cepa Pa25r (Resistente a múltiples antibióticos) con resistencia a todos los antibióticos recomendados por el CLSI para dos familias de antibióticos (Monobactámicos y carbapenémicos) requirió concentraciones mayores de furanonas para inhibir su crecimiento; se observaron resultados variados a diferentes concentraciones sugiriendo que los mecanismos de resistencia contra esos grupos de antibióticos, podrían estar relacionadas con la resistencia a los compuestos analizados.

La CIM del compuesto 7 fue de 192 µg/mL y 256 µg/mL, que es alta en comparación a los antibióticos empleados frecuentemente para tratar infecciones causadas por este patógeno, lo cual representa un problema debido a que podría generar problemas de toxicidad en los pacientes, por lo tanto, es importante desarrollar estudios adicionales para la búsqueda de nuevos compuestos que sirvan como una alternativa eficaz contra *P. aeruginosa*.

15. RECOMENDACIONES

Se requieren nuevos estudios con furanonas halogenadas para evaluar su posible efecto sobre la formación de biopelícula y algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa* para tener información más precisa y poder considerar emplear este tipo de compuestos como posible factor sinérgico de los antibióticos convencionales para evitar el crecimiento bacteriano y llegar a una terapia más eficaz, así como

llevar a cabo un análisis molecular para evaluar la carga genética de cada cepa y los mecanismos de resistencia heredada y adquirida por *P. aeruginosa*, con el fin de tener una investigación más robusta y completa que permita evaluar a las furanonas halogenadas en un conjunto de características de la bacteria y no solo interviniendo en su crecimiento.

VoBo

Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez

Dr. Alberto Ortega Vázquez

17. BIBLIOGRAFIA

- Abelyan, N., Grabski, H., & Tiratsuyan, S. (2020). In silico Screening of Flavones and its Derivatives as Potential Inhibitors of Quorum-Sensing Regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biology*, *54*(1), 134–143. <https://doi.org/10.1134/s0026893320010021>
- Basseti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, *7*, 1–18. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Berube, B. J., Rangel, S. M., & Hauser, A. R. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. *Current Genetics*, *62*(1), 109–113. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0522-x>
- Bodnár, R., Mészáros, Á., Oláh, M., & Ágh, T. (2016). Inhaled antibiotics for the treatment of chronic *pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients: Challenges to treatment adherence and strategies to improve outcomes. *Patient Preference and Adherence*, *10*, 183–193. <https://doi.org/10.2147/PPA.S53653>
- Bouvier, N. M. (2016). Cystic fibrosis and the war for iron at the host–pathogen battlefield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(6), 1480–1482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525101113>
- Chang, Y., Wang, P., Ma, H., Chen, S., Fu, Y., Liu, Y., ... Sun, P. (2019). European Journal of Pharmaceutical Sciences Design , synthesis and evaluation of halogenated furanone derivatives as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *140*(August), 105058. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105058>
- Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Anil Kumar, V., Gopi Mohan, C., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*, *306*(1), 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.004>

- Christensen, L. D., Gennip, M. Van, Jakobsen, T. H., Alhede, M., Hougen, H. P., Høiby, N., ... Givskov, M. (2012). infection mouse model, (February), 1198–1206. <https://doi.org/10.1093/jac/dks002>
- CLSI, Dolinsky, A. L., Ohiro, R. K., Fan, W., Xiao, C., & Wu, F. (2017). National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. *Journal of International Medical Research*, 46(September), 18. <https://doi.org/10.1108/08876049410065598>
- Cuevas Schacht, F., Banegas Matamoros, J., Sosa de Martínez, C., Coria Jiménez, V., Pérez Fernández, L., Gerónimo Gallegos, A., & Sotelo Reséndiz, M. (2001). Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes pediátricos con fibrosis quística. Cultivo de expectoración vs lavado broncoalveolar. *Acta Pediátrica de México*, 22(6), 419–423.
- Fajac, I., & Boeck, K. De. (2016). Pharmacology & Therapeutics New horizons for cystic fibrosis treatment. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.009>
- Fujimoto, S., Nakagami, Y., & Kojima, F. (2004). Optimal Bacterial DNA Isolation Method Using Bead-Beating Technique. *Of Medical Sch*, 3, 33–38.
- Garinis, A. C., Cross, C. P., Srikanth, P., Carroll, K., Feeney, M. P., Keefe, D. H., ... Steyger, P. S. (2017). The cumulative effects of intravenous antibiotic treatments on hearing in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.01.006>
- Harrington, N. E., Sweeney, E., & Harrison, F. (2019). Building a better biofilm - Formation of in vivo-like biofilm structures by *Pseudomonas aeruginosa* in a porcine model of cystic fibrosis lung infection. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/858597>
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., ... Givskov, M. (2019). *Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound*. *On: Mon* (Vol. 148). Retrieved from www.microbiologyresearch.org

- Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., & Cámara, M. (2018). Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUL), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>
- Husain, A., Khan, S. A., Iram, F., Iqbal, M. A., & Asif, M. (2019). Insights into the chemistry and therapeutic potential of furanones: A versatile pharmacophore. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.021>
- Ibarra González, I., Gutiérrez Morales, G., Vela Amieva, M., Castillo Mogel, J. A., Herrera Pérez, L. del A., Caamal Parra, G., ... García Flores, E. P. (2018). Retos y oportunidades en la implementación del tamiz neonatal para fibrosis quística. *Acta Pediátrica de México*, 39(6), 35. <https://doi.org/10.18233/apm39no6pp35s-46s1720>
- Joshi, C., Patel, P., Palep, H., & Kothari, V. (2019). Validation of the anti-infective potential of a polyherbal 'Panchvalkal' preparation, and elucidation of the molecular basis underlining its efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2428-5>
- Kariminik, A., Baseri-Salehi, M., & Kheirkhah, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunology Letters*, 190, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>
- Khodayary, R., Nikokar, I., Mobayen, M. R., Afrasiabi, F., Araghian, A., Elmi, A., & Moradzadeh, M. (2019). High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4071-0>
- Kiedrowski, M. R., & Bomberger, J. M. (2018). Viral-Bacterial Co-infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03067>

- Lezana Fernández, J. L., Bustamante Sáenz, A., Ovando Fonseca, J. E., Boites Velarde, R., & Ruiz Gutierrez, H. H. (2015). *Fibrosis Quística: Guía clínica*. Retrieved from <http://fibrosisquistica.org.mx/~h4u3f3d9/wp-content/uploads/2016/04/FibrosisQuistica-2016.pdf>
- Maillé, É., Ruffin, M., Adam, D., Messaoud, H., Lafayette, S. L., McKay, G., ... Brochiero, E. (2017). Quorum Sensing Down-Regulation Counteracts the Negative Impact of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR Channel Expression, Function and Rescue in Human Airway Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00470>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(February). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Parkins, M. D., Somayaji, R., & Waters, V. J. (2018). Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-18>
- Pestaña, M. Í., & del Pozo, J. L. (2018). Infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia*. *Medicine (Spain)*, 12(50), 2931–2940. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.010>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Rafeeq, M. M., Aly, H., & Murad, S. (2017). Cystic fibrosis : current therapeutic

targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9>

Ratjen, F., Stanojevic, S., Horton, E., Blanchard, A. C., Waters, V., & Taylor, L. (2017). Effectiveness of a stepwise *Pseudomonas aeruginosa* eradication protocol in children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 16(3), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.01.007>

Riffiani, R., Sulistinah, N., & Sunarko, B. (2015). Comparison of Three Dna Isolation and Purification Methods of Bacterial Dna. *KnE Life Sciences*, 2(1), 491. <https://doi.org/10.18502/kls.v2i1.199>

Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., ... Collins, F. S. (1989). The Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and. *Science*, 245(4922), 122(6), 1059–1065.

Saika Esani, a Tsute Chen, b Kai P. Leung, c T. A. V. L. (2019). crossm, (March), 1–2.

Schick, A., & Kassen, R. (2018). Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions, 115(42). <https://doi.org/10.1073/pnas.1721270115>

Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Challapilli, S. B. (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica*, 63(4), 413–432. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0585-4>

Sommer, R., Titz, A., Wagner, S., Hartmann, R. W., Empting, M., Lu, C., & Hinsberger, S. (2016). Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(13), 5929–5969. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964.

<https://doi.org/10.1038/35023079>

- Subedi, D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (2018). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clinical and Experimental Optometry*, *101*(2), 162–171. <https://doi.org/10.1111/cxo.12621>
- Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M. F. I., Babini, G. S., Douboyas, J., & Livermore, D. M. (2000). Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(3), 1290–1292.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*, *41*, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.006>
- Villaverde-Hueso, A., Sánchez-Díaz, G., Molina-Cabrero, F., Gallego, E., Posada de la Paz, M., & Alonso-Ferreira, V. (2019). Mortality Due to Cystic Fibrosis over a 36-Year Period in Spain: Time Trends and Geographic Variations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010119>
- WHO. (2004). The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis Report of a joint meeting of. *World Health Organization*, 1–24.
- Winstanley, C., O'Brien, S., & Brockhurst, M. A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology*, *24*(5), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Molin, S., Givskov, M., & Høiby, N. (2004). Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh223>
- Zhao, J., Yu, X., Zhu, M., Kang, H., Ma, J., Wu, M., ... Liang, H. (2016). Structural and Molecular Mechanism of CdpR Involved in Quorum-Sensing and Bacterial Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Biology*, *14*(4), 1–25.