



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFFECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE LA
EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Pseudomonas*
aeruginosa y *Salmonella* Typhimurium

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

MICHELLE GUADALUPE SALGADO REBOLLAR

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. JESSICA NAVA GALEANA

CO-DIRECTOR:

DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN

CUERNAVACA, MORELOS

Octubre, 2022

Agradecimientos

Esta tesis va en especial dedicatoria a mis padres, que, a pesar de casi no estar de acuerdo en muchas cosas, en lo que siempre concordaban es que estaban seguros que yo lograría lo que me propusiera, les agradezco el apoyo incondicional hacia mi, a mi hermano, el cual siempre se alegra de que cumpla mis metas y verme crecer académicamente, y también se la dedico a toda mi familia, a mis abuelos los cuales amo y agradezco su fe en mi.

Por otra parte, quiero agradecerle a mi grupo de laboratorio, por siempre brindarme su ayuda en todo momento y estar dispuestos a enseñarme con paciencia y amabilidad, al doctor Victor Bustamante por aceptarme en su laboratorio.

Por último, quiero hacer una gran mención hacia una de las personas que estoy segura que sin ella yo no podría haber sacado una tesis de este nivel, esa persona es mi querida directora que siempre y en todo momento estuvo ahí enseñándome y procurando que entendiera las cosas con tanta paciencia y siempre dispuesta a hacerlo las veces que fuera necesario, gracias aceptarme como tu primera tesista y por convertirte en mi amiga.

Este estudio fue financiado con el donativo CONACYT - Problemas Nacionales no. 2017-01-5182

ÍNDICE

I. Introducción	7
II. Marco teórico.....	9
2.1 Descubrimiento de antibióticos.....	9
2.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos	9
2.1.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos	10
2.2 Factores que contribuyen a la resistencia de los antibióticos.....	12
2.3 Problemática	13
2.4 Compuestos naturales antimicrobianos	15
2.4.1 Metabolitos secundarios de plantas.....	16
2.4.1.1 Canela	16
2.4.1.2 Cítricos.....	16
2.4.1.3 Eucalipto	16
2.4.1.4 Citronela	17
2.4.1.5 Gobernadora.....	17
2.4.2 Compuestos anti-virulencia como alternativa a los antibióticos	18
2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.5.1 Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	19
2.5.1.1 Sistema de secreción tipo III (SST3).....	19
2.5.1.2 Biopelícula y sus fases de desarrollo.....	20
2.5.1.3 Quorum sensing (QS)	21
2.6 <i>Salmonella Typhimurium</i>	23
2.6.1 Isla de patogenicidad 1 (SPI-1).....	23
2.6.2 Isla de patogenicidad 2 (SPI-2).....	25
2.7 Antecedentes directos.....	25
III. Justificación	27
IV. Hipótesis.....	28
V. Objetivos.....	29
5.1 Objetivo general	29
5.1.1 Objetivos particulares.....	29

VI. Metodología.....	30
6.1 Medios de cultivo.....	30
6.2 Extractos o compuestos a evaluar	31
6.3 Ensayo de crecimiento en microplaca.....	31
6.4 Determinación de la actividad β -galactosidasa y luciferasa	32
6.5 Extracción de DNA genómico y plasmídico.....	32
6.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	33
6.7 Construcción de la fusión transcripcional <i>rpsL-lacZ</i> _{s.tm}	33
6.8. Análisis estadístico.....	34
VII. Resultados	36
7.1 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de <i>invF-lacZ</i>	36
7.1.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de <i>invF-lacZ</i>	36
7.1.2 Efecto del cinnacAr sobre la expresión de <i>invF-lacZ</i>	38
7.1.3 Efecto de la citronela sobre la expresión de <i>invF-lacZ</i>	39
7.1.4 Efecto del Mega sobre la expresión de <i>invF-lacZ</i>	41
7.1.5 Efecto del eucalipto sobre la expresión de <i>invF-lacZ</i>	42
7.2 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de <i>ssaG-lacZ</i>	44
7.2.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de <i>ssaG-lacZ</i>	44
7.2.3 Efecto de la citronela sobre la expresión de <i>ssaG-lacZ</i>	47
7.2.4 Efecto del eucalipto sobre la expresión de <i>ssaG-lacZ</i>	49
7.3 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de <i>exsA-lux</i>	50
7.3.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de <i>exsA-lux</i>	50
7.3.2 Efecto de la citronela sobre la expresión de <i>exsA-lux</i>	51
7.3.3 Efecto del Mega sobre la expresión de <i>exsA-lux</i>	52
7.3.4 Efecto del eucalipto sobre la expresión de <i>exsA-lux</i>	53
7.3.5 Efecto del Citrobio sobre la expresión de <i>exsA-lux</i>	54
7.4 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de <i>rhIR-lux</i>	55
7.4.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de <i>rhIR-lux</i>	55
7.4.2 Efecto de la citronela sobre la expresión de <i>rhIR-lux</i>	56
7.4.3 Efecto del Mega sobre la expresión de <i>rhIR-lux</i>	57
7.4.4 Efecto del eucalipto sobre la expresión de <i>rhIR-lux</i>	58
7.4.5 Efecto del Citrobio sobre la expresión de <i>rhIR-lux</i>	59

VIII. Discusión	61
IX. Conclusión	67
X. Perspectivas	68
XII. Literatura citada	69

Índice de tablas

Tabla 1.- Principales familias de antibióticos y su mecanismo de acción	10
Tabla 2.- Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y sub-inhibitorias (SIC) de los diferentes extractos o compuestos sobre <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Typhimurium</i>	26
Tabla 3.- Cepas y vectores utilizadas en este estudio	30
Tabla 4.- Extractos comerciales de plantas que se usaron en este proyecto	31
Tabla 5.- Componentes de la mezcla de reacción de PCR.	34

Índice de figuras

Figura 1.- Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	11
Figura 2.- Mecanismos de transferencia horizontal de genes: transducción, transformación y conjugación.	12
Figura 3.- Selección y transmisión de bacterias resistentes a antibióticos.	13
Figura 4.- Muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos por año.....	14
Figura 5.- Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.....	15
Figura 6.- Esquema de los genes del SST3 en <i>P. aeruginosa</i>	20
Figura 7.- Biopelícula.....	21
Figura 8.- Sistemas de detección de quórum en <i>Pseudomonas</i>	22
Figura 9.- Representación esquemática de los genes de SPI-1	24
Figura 10.- Cascada de regulación de los genes de SPI-1	24
Figura 11.- Representación esquemática de los genes de SPI-2.....	25
Figura 12.- El cinamaldehído disminuye la expresión de <i>invF</i>	36
Figura 13.- El cinamaldehído disminuye la expresión de <i>rpsL</i>	37
Figura 14.- El CinnacAr disminuye la expresión de <i>invF</i>	38
Figura 15.- El CinnacAr no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	39
Figura 16.- La citronela disminuye la expresión de <i>invF</i>	40
Figura 17.- La citronela no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	40
Figura 18.- El Mega incrementa la expresión de <i>invF</i>	41
Figura 19.- El Mega incrementa la expresión de <i>rpsL</i>	42

Figura 20.- El eucalipto no afecta la expresión de <i>invF</i>	43
Figura 21.- El eucalipto no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	43
Figura 22.- El cinamaldehído disminuye la expresión de <i>ssaG</i>	44
Figura 23.- El cinamaldehído no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	45
Figura 24.- El CinnacAr disminuye la expresión de <i>ssaG</i>	46
Figura 25.- El CinnacAr no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	47
Figura 26.- La citronela no afecta la expresión de <i>ssaG</i>	48
Figura 27.- La citronela no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	48
Figura 28.- El eucalipto no afecta la expresión de <i>ssaG</i>	49
Figura 29.- El eucalipto no afecta la expresión de <i>rpsL</i>	50
Figura 30.- El cinamaldehído no afecta la expresión de <i>exsA</i>	51
Figura 31.- La citronela no afecta la expresión de <i>exsA</i>	52
Figura 32.- El Mega no afecta la expresión de <i>exsA</i>	53
Figura 33.- El eucalipto no afecta la expresión de <i>exsA</i>	54
Figura 34.- El citrobio no afecta la expresión de <i>exsA</i>	55
Figura 35.- El cinamaldehído disminuye la expresión de <i>rhIR</i>	56
Figura 36.- La citronela disminuye la expresión de <i>rhIR</i>	57
Figura 37.- El Mega disminuye la expresión de <i>rhIR</i>	58
Figura 38.- El eucalipto disminuye la expresión de <i>rhIR</i>	59
Figura 39.- El Citrobio disminuye la expresión de <i>rhIR</i>	60
Figura 40.- Compuestos con actividad anti-virulencia sobre reguladores específicos de virulencia en <i>S. Typhimurium</i>	65
Figura 41.- Compuestos o extractos con actividad anti-virulencia sobre reguladores específicos de quorum sensing de <i>P. aeruginosa</i>	66

I. Introducción

El uso indiscriminado de antibióticos ha generado una gran problemática, ya que se han encontrado bacterias que presentan resistencia a un gran número de antibióticos presentes en el mercado. De acuerdo con un comunicado de la OMS en el 2017, se estableció una lista de prioridades para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos contra bacterias de importancia clínica. Muchos de los antibióticos actuales tienen un efecto sobre procesos esenciales en las bacterias metabólicamente activas, por ello, las bacterias pueden fácilmente generar resistencia contra estos medicamentos. Además, los antibióticos actuales también tienen un efecto adverso sobre las bacterias que forman parte de la microbiota del hospedero. Por ello, los compuestos anti-virulencia representan una alternativa para combatir infecciones bacterianas. Como su nombre lo indica, los compuestos anti-virulencia afectan específicamente la virulencia de las bacterias sin afectar su viabilidad; estos compuestos pueden inhibir la expresión de genes de virulencia en una bacteria. Debido a que los compuestos anti-virulencia no afectan procesos celulares esenciales para el crecimiento bacteriano, probablemente estas bacterias no generarían una resistencia hacia ellos. Una de las alternativas para la búsqueda de los compuestos anti-virulencia son las plantas, ya que, por su naturaleza sésil y su metabolismo secundario, producen compuestos que utilizan para defenderse contra infecciones causadas por agentes patógenos. Aunado a esto, las plantas se han utilizado en la medicina tradicional para combatir infecciones bacterianas y actualmente se está estudiando el efecto de extractos de plantas como posibles agentes antimicrobianos, principalmente sobre bacterias que presentan multi-resistencia a los antibióticos.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria metabólicamente versátil que causa infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Esta bacteria puede sobrevivir en superficies de los hospitales ya que establece comunidades bacterianas denominadas biopelículas. Entre los genes de virulencia de *P. aeruginosa* se encuentran los que permiten la formación de biopelículas, los que codifican para un sistema de secreción tipo 3 (SST3) y sus proteínas efectoras, y genes que codifican para fimbrias. *Salmonella Typhimurium* es el agente causal de infecciones gastrointestinales en humanos y en animales de importancia en industria avícola y ganadera; además, actualmente se han encontrado cepas de *S. Typhimurium* en pacientes que presentan infecciones sistémicas. Los genes de virulencia en *S. Typhimurium* generalmente se encuentran en regiones del genoma denominadas islas de patogenicidad. Los genes de la isla 1 (SPI-1) codifican para reguladores transcripcionales, un SST3 y sus proteínas efectoras, las cuales son importantes para la invasión de la bacteria a células intestinales. Por otro lado, los genes de la isla 2 (SPI-2) codifican para reguladores transcripcionales, otro SST3 y proteínas efectoras, las cuales son importantes durante la sobrevivencia y replicación de la bacteria dentro de las células intestinales y dentro de macrófagos; la

sobrevivencia de *Salmonella* dentro de macrófagos es esencial para establecer infecciones sistémicas.

Así, con base a los antecedentes anteriormente descritos, en este proyecto nos plantemos estudiar el posible efecto anti-virulencia de diferentes extractos de plantas. Específicamente, buscaremos extractos de plantas que inhiban la expresión de genes de virulencia de *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*. Con nuestro proyecto esperamos contribuir a la solución de la problemática de salud ocasionada por bacterias patógenas resistentes a los antibióticos disponibles en la actualidad.

II. Marco teórico

2.1 Descubrimiento de antibióticos

La era de los antibióticos comienza en 1928, con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming a partir de un hongo del género *Penicillium*. Este compuesto fue aislado y empleado para tratar infecciones en humanos, lo cual marcó un gran avance para la medicina, puesto que se pudieron tratar enfermedades que en ese entonces presentaban tasas altas de mortalidad. En los años posteriores, se fueron descubriendo nuevos antibióticos, impactando en mayor medida el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas. Sin embargo, pocos años después del descubrimiento de la penicilina, se encontraron cepas resistentes a este antibiótico, pero también a la amplia gama de antibióticos que salían al mercado, lo cual representó una preocupación clínica significativa, pues la resistencia se encontraba inmediatamente después de que el antibiótico saliera al mercado. Con el paso del tiempo, no se podía mantener el ritmo de descubrimientos de nuevos antibióticos, ya que se encontraba resistencia incluso antes de que el antibiótico saliera al mercado y actualmente el desarrollo de los antibióticos disminuyó. La crisis actual de la resistencia a los antibióticos es debido a que se han encontrado bacterias que presentan multi-resistencias a ellos, limitando las opciones terapéuticas contra estas infecciones bacterianas (Aslam *et al.*, 2018).

2.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos

Existen diversos tipos de antibióticos, los cuales tienen diferentes mecanismos de acción sobre funciones fisiológicas o metabólicas esenciales de la célula bacteriana, tal como la inhibición de la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), de ácido ribonucleico (ARN), de proteínas y de la pared celular; también actúan sobre el metabolismo (Tabla 1) (Zaman *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a que los antibióticos tienen un efecto sobre estos procesos celulares esenciales, la presencia de estos ejerce una presión de selección que puede favorecer la aparición de bacterias resistentes a antibióticos. La resistencia se puede adquirir a través de mutaciones en el genoma de las bacterias y mediante la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal. Los antibióticos se han utilizado en grandes cantidades en el tratamiento de enfermedades en humanos y en animales, así como promotores de crecimiento en animales y como profilácticos en animales y en cultivos agrícolas, lo cual ha seleccionado la proliferación de cepas resistentes a antibióticos en todo el medio ambiente (Levy & Marshall, 2004).

Mecanismos de acción	Familias de antibióticos
Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas; cefalosporinas; carbapenémicos; daptomicina; monobactámicos; glucopéptidos
Inhibición de la síntesis de proteínas	Tetraciclinas; aminoglucósidos; oxazolidononas; estreptograminas; cetólidos; macrólidos; lincosamidas
Inhibición de la síntesis de ADN	Fluoroquinolonas
Inhibición competitiva de la síntesis de ácido fólico	Sulfonamidas; trimetoprima
Inhibición de la síntesis de ARN	Rifampicina
Otro	Metronidazol

Tabla 1.- Principales familias de antibióticos y su mecanismo de acción (Modificado de Levy & Marshall, 2004).

2.1.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Se ha descrito que existe una correlación entre el uso inadecuado de los antibióticos con la creciente generación de cepas resistentes a ellos. Estas cepas bacterianas son capaces de sobrevivir en presencia de los antibióticos, a diferencia de aquellas bacterias que no han sido expuestas a dichos compuestos. Sin embargo, también existen mecanismos de resistencia intrínseca como la presencia de bombas de flujo, cuya función es expulsar los compuestos tóxicos fuera de la bacteria, tal como los antibióticos. También existen otros mecanismos de resistencia, tal como la presencia de enzimas que degradan o modifican a los antibióticos, y la modificación de los sitios blanco (Figura 1). Estos mecanismos pueden ser generados por mutaciones en el cromosoma bacteriano o por la adquisición de genes por transferencia horizontal (Aslam *et al.*, 2018).

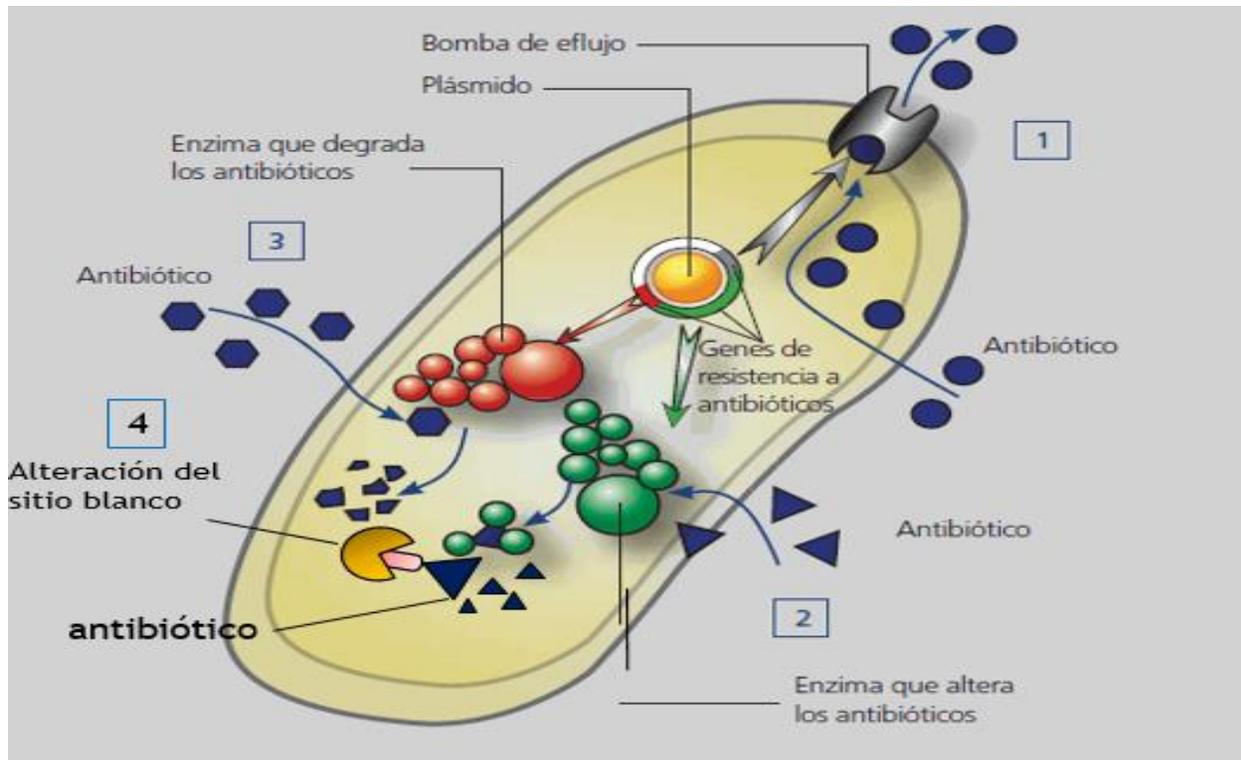


Figura 1.- Mecanismos de resistencia a los antibióticos. En la bacteria pueden encontrarse genes de resistencia en el cromosoma; sin embargo, la presencia de genes de resistencia en los plásmidos puede favorecer la generación de diversas cepas multi-resistentes a los antibióticos. Entre los mecanismos de resistencia a los antibióticos se encuentran las bombas de flujo, que le permiten aumentar el flujo activo de salida de los antibióticos (1), la participación de una enzima que permite alterar (2) o degradar (3) a los antibióticos, o bien, la modificación del sitio blanco del antibiótico (4) (Modificada de Montero, 2012).

La transferencia horizontal de genes ha sido trascendental durante la evolución de las bacterias; sin embargo, este proceso también ha permitido la generación de bacterias resistentes a los antibióticos. Existen tres mecanismos de transferencia horizontal de genes: transformación, transducción y conjugación (Figura 2). La transferencia de genes por medio de la conjugación es el único tipo que involucra contacto directo entre las dos bacterias. Durante la conjugación, el paso del material genético de una bacteria a otra se realiza por medio de un contacto físico establecido por una estructura denominada Pili. Este funciona como un puente de conexión, por donde ocurre el intercambio. La transformación involucra la adquisición de una molécula de ADN que se encuentra en el ambiente cercano a una bacteria receptora. Este fragmento de ADN proviene de otra bacteria. Finalmente, el mecanismo de transducción ocurre por medio de un fago (virus) que lleva ADN desde una bacteria donadora a una receptora (Aslam *et al.*, 2018).

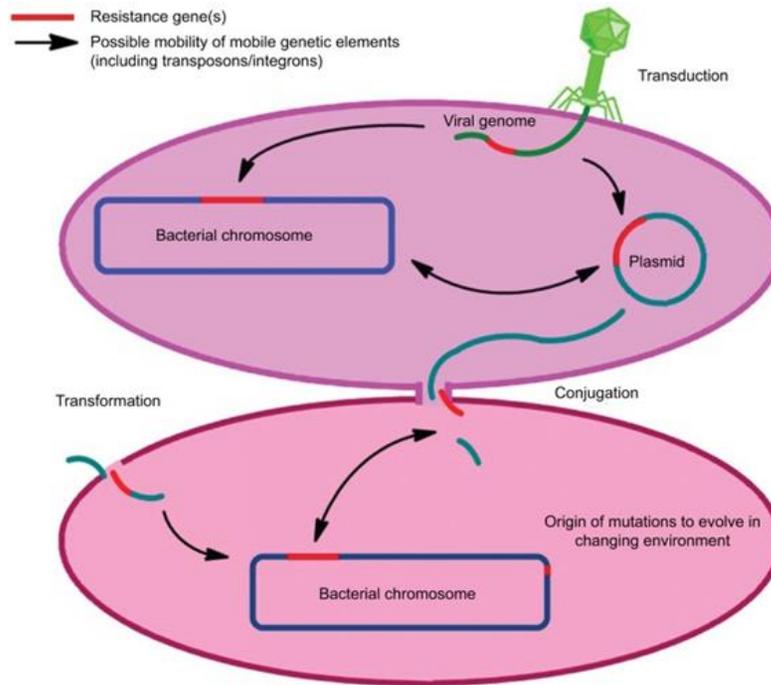


Figura 2.- Mecanismos de transferencia horizontal de genes: transducción, transformación y conjugación (Aslam et al., 2018).

2.2 Factores que contribuyen a la resistencia de los antibióticos

Aunque la resistencia a los antibióticos se puede dar de manera natural en las bacterias, el uso incontrolado de los antibióticos ha seleccionado a las bacterias resistentes a ellos; por ejemplo, la inadecuada prescripción de antibióticos contra infecciones por virus. Asimismo, el mal manejo de los antibióticos como promotores de crecimiento en los animales de granja está relacionado con la propagación de bacterias resistentes en los humanos a través de los productos de consumo derivados de animales. Además, los desechos de los animales que contienen bacterias resistentes pueden llegar a las plantas cuando estos desechos se utilizan como abono, o también a través del riego de los cultivos con aguas contaminadas con estas bacterias (Figura 3) (Aslam *et al.*, 2018).

Se conoce que los factores antes mencionados no son los únicos que atribuyen al descontrol de este problema, sino también el mal manejo de áreas en los entornos de saneamiento, falta de control en los estándares de manejo de infecciones, los sistemas de higiene del agua, la calidad de los medicamentos y la migración (Holmes *et al.*, 2016). Adicionalmente, muchos compuestos antimicrobianos son utilizados en productos de higiene diaria, lo que puede participar en la generación de la resistencia. Debido a esto, se han hallado bacterias resistentes a antibióticos en diferentes lugares, como en hospitales, en animales de consumo, en cultivos, en ríos y en el aire, lo que tiene un impacto en la transmisión de bacterias resistentes hacia los humanos, animales, plantas y el medio ambiente en general (Figura 3) (Pérez & Bustamante, 2018). Por ello, se ha

desarrollado el concepto de “una salud”, el cual busca enfatizar que la salud humana, animal y del medio ambiente están relacionadas (Holmes *et al.*, 2016).

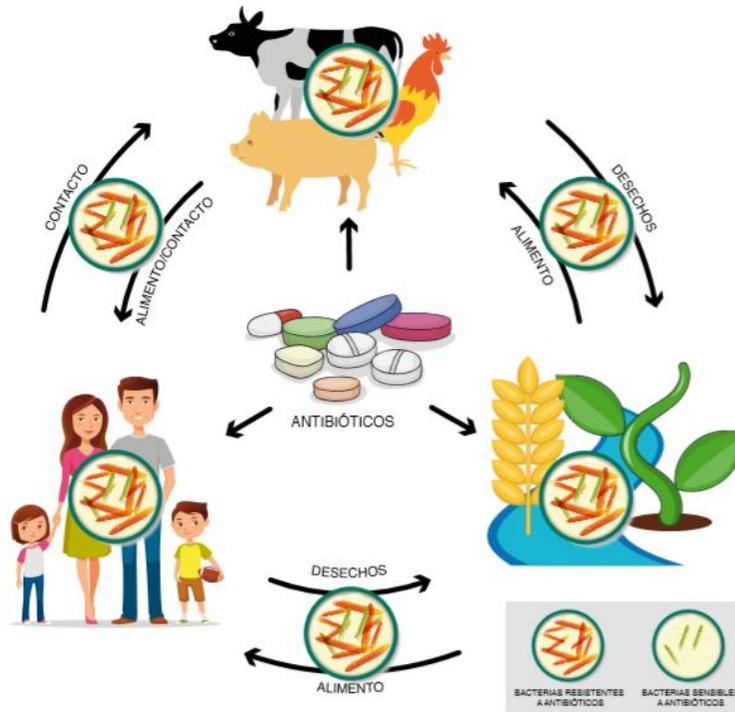


Figura 3.- Selección y transmisión de bacterias resistentes a antibióticos. El uso excesivo e inadecuado de antibióticos ha seleccionado bacterias resistentes a antibióticos, las cuales pueden transmitirse entre humanos, animales y medio ambiente a través de múltiples vías (Pérez & Bustamante, 2018).

2.3 Problemática

En el año 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobó un plan de acción para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos con el compromiso de los estados miembros de elaborar y aplicar planes nacionales apegados a este plan mundial. En esencia, este plan propone la divulgación y concientización del problema, la vigilancia y la investigación, la higiene y saneamiento como medidas de prevención, el uso adecuado de los antibióticos actuales y la inversión en el desarrollo de nuevos medicamentos, de herramientas de diagnóstico y de vacunas (WHO, 2015).

La propagación de la resistencia a los antibióticos ha ido en aumento. Si en el presente no se hace nada para desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos para contrarrestar a las bacterias resistentes a los antibióticos podríamos regresar a una era pre-antibiótica, donde las infecciones que ya se habían controlado, volverán a ser mortales. De hecho, se calcula que para el año 2050 habrá 10 millones de muertes al año por infecciones por bacterias resistentes, un número mayor a las muertes que ocasionan otras enfermedades

que actualmente tienen altas tasas de mortalidad, como el cáncer (Figura 4) (O'Neil, 2014).

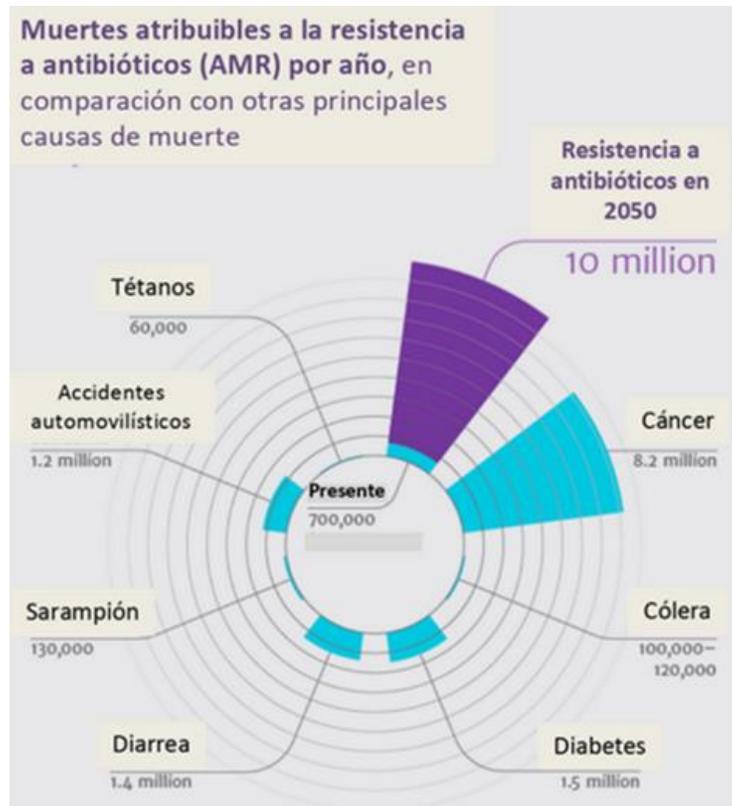


Figura 4.- Muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos por año. Comparación de las muertes ocasionadas actualmente por la resistencia a los antibióticos contra otras principales causas de muerte. En morado se muestra la predicción para el 2050 de las muertes ocasionadas por la resistencia a los antibióticos (Modificada de O'Neil, 2014).

En respuesta a la problemática actual de la resistencia a los antibióticos, la OMS creó una lista global de patógenos prioritarios, con el fin de coadyuvar a la investigación y el desarrollo de antibióticos nuevos, así como buscar soluciones a las infecciones por estas bacterias que ya presentan resistencia a los antibióticos existentes. La lista se divide en tres prioridades: crítica, alta y media, las cuales fueron divididas a través de distintos indicadores como: mortalidad, prevalencia, transmisibilidad, prevención y tratamiento, entre otras (Figura 5) (WHO, 2017).

A través del plan de acción de la OMS y de la participación de los países miembros de esta organización, se pretende frenar la generación y la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos. El desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos es esencial para contrarrestar las infecciones causadas por bacterias patógenas multi-resistentes a los antibióticos.

Priority 1: CRITICAL[#]

Acinetobacter baumannii, carbapenem-resistant

Pseudomonas aeruginosa, carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae^{*}, carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant

Priority 2: HIGH

Enterococcus faecium, vancomycin-resistant

Staphylococcus aureus, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant

Helicobacter pylori, clarithromycin-resistant

Campylobacter, fluoroquinolone-resistant

Salmonella spp., fluoroquinolone-resistant

Neisseria gonorrhoeae, 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

Priority 3: MEDIUM

Streptococcus pneumoniae, penicillin-non-susceptible

Haemophilus influenzae, ampicillin-resistant

Shigella spp., fluoroquinolone-resistant

[#] *Mycobacteria* (including *Mycobacterium tuberculosis*, the cause of human tuberculosis), was not subjected to review for inclusion in this prioritization exercise as it is already a globally established priority for which innovative new treatments are urgently needed.

^{*} *Enterobacteriaceae* include: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, and *Providencia spp.*, *Morganella spp.*

Figura 5.- Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (WHO, 2017).

2.4 Compuestos naturales antimicrobianos

La mayoría de los antibióticos actuales han sido aislados a partir de microorganismos del suelo y, después, modificados químicamente a partir de ellos; sin embargo, actualmente la cantidad de antibióticos aislados de estos ambientes es menor y se requieren explorar otras fuentes potenciales de antibióticos.

Se ha enfocado la atención a las plantas como potencial fuente de nuevos antimicrobianos, debido a que, por su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado un metabolismo secundario que les permite interactuar con el ambiente, pero, sobre todo, protegerse de bacterias patógenas (Muro *et al.*, 2018). Entre estos metabolitos se encuentran taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides; muchos de ellos han sido utilizados como fuente de otros medicamentos en la industria farmacéutica (Cowan, 1999). En la medicina alternativa se utilizan plantas medicinales para tratar infecciones;

esto debido a la capacidad antimicrobiana que contienen los metabolitos secundarios contra distintos microorganismos, tales como hongos, bacterias, protozoarios y virus

2.4.1 Metabolitos secundarios de plantas

2.4.1.1 Canela

La canela se extrae de la corteza de la raíz, de la hoja y la corteza externa de los árboles del género *Cinnamomum*, esta suele emplearse comúnmente en el área culinaria; sin embargo, se tiene reportado que además cuenta con propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias, y actividad antimicrobiana contra una variedad de cepas bacterianas como *Acinetobacter baumannii*, *A. Iwoffii*, *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Brucella melitensis*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium smegmatis*, *M. tuberculosis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *S. Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Así mismo, se conoce que tiene un efecto anti-fúngico y anti-viral (Ranasinghe *et al.*, 2013). Mediante análisis de HPLC se conoce que la planta está constituida por tres principales compuestos como el eugenol, que forma un 46.5% total de la planta, seguido por el cinamaldehído, que se encuentra en un 32.7% y el tercer compuesto es el linalol, con un 3.3% (Chericoni *et al.*, 2005; Gruenwald *et al.*, 2010).

2.4.1.2 Cítricos

El género de los cítricos pertenece a la familia de las Rutaceae y es conocido por sus efectos beneficiosos para la salud desde hace siglos. Son empleados en la industria alimentaria, de la perfumería, farmacéuticos, cosméticos y actualmente también se emplea como plaguicida en la agricultura convencional (González-Mas *et al.*, 2019). Este género contiene muchos nutrientes beneficiosos y compuestos bioactivos con actividades anticancerígenas, antidiabéticas, antiinflamatorias y antimicrobianas contra distintas especies de bacterias como *S. aureus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a estas propiedades, se han investigado sus contenidos fitoquímicos de los miembros del género, dentro de los cuales podemos encontrar a los flavonoides, terpenoides, limonoides y cumarinas; además, cuentan con una gran diversidad de vitaminas como A, B1, B2, B3, C y E (Khan *et al.*, 2021; Torres-Alvarez *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2018).

2.4.1.3 Eucalipto

El eucalipto es un género de árboles o arbustos que pueden llegar a medir hasta 100 m de altura, que pertenecen a la familia Myrtaceae. *Eucalyptus globulus* es el principal suministrador de aceites esenciales. Los componentes principales son el 1,8-cineol

(eucaliptol), limoneno, α -pineno, γ -terpineno y α -terpineol. El aceite esencial utilizado para fines medicinales contiene al menos un 70% de 1,8-cineol (Bachir & Benali, 2012; Wińska *et al.*, 2019). Estos aceites esenciales se suelen encontrar aplicados en anestésicos, astringentes, antisépticos, desodorantes, desinfectantes, en productos para la higiene bucal, como Listerine Cleanmint (Pfizer), entre otros. Por otro lado, también se emplea como remedios populares para tratar abscesos, artritis, asma, bronquitis, fiebre, gripa, entre otros. Se conoce que también tiene una gran demanda de uso en industrias del jabón y los cosméticos (Bachir & Benali, 2012). Además, al eucalipto se le atribuyen también diversas propiedades como antibacterianas, al aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática a través de deterioro funcional; también, tiene propiedades antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Seol & Kim., 2016; Mekonnen *et al.*, 2016). Por otro parte, en estudios *in vitro* y en animales se presentó una baja toxicidad y en humanos ha presentado una baja alergenicidad (Sagar *et al.*, 2020; Wińska *et al.*, 2019).

2.4.1.4 Citronela

Citronela o *Cymbopogon nardus* es una de las especies de *Cymbopogon*, de la cual se puede obtener un extracto que se emplea en muchos productos como jabones, productos para el cuidado corporal, perfumería, repelente de moscos, bebidas, alimentos y productos farmacéuticos. Dentro de los componentes se pueden encontrar monoterpenos como el geraniol (33,88%), que constituyen el mayor porcentaje del aceite esencial extraído de las hojas de la planta, el citronelal (27,55%) y citronelol (14,40%); estos componentes son considerados antisépticos. Se ha reportado que el geraniol parece tener el papel principal en la actividad antimicrobiana. Muchos estudios han informado sobre las propiedades antimicóticas contra *Aspergillus niger* y antimicrobianas probadas contra cepas como *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *A. baumannii*, teniendo además un efecto antibiopelícula (Pontes *et al.*, 2019; Wei & Wee, 2013; Torres., 2021).

2.4.1.5 Gobernadora

La planta gobernadora (*Larrea tridentata*), es una planta arbustiva perteneciente a la familia Zygophyllacea, se puede encontrar en zonas del desierto de Chihuahua y es muy empleada en la medicina tradicional por la población nativa de México. La planta gobernadora posee diversas propiedades las cuales son aplicadas en áreas farmacológicas como antioxidante, antifúngico, antiinflamatorio, antibacteriano, antiviral y anticancerígeno. Tiene propiedades antibacterianas contra cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Por otra parte, el metabolito más abundante y estudiado es el ácido nordihidroguaiarético, además, también se encuentran lignanos, flavonoides, fenoles, terpenoides, saponinas y vinilcetonas olorosas; la concentración y el tipo de fitoquímicos encontrados pueden

presentar variación en la misma planta dependiendo de factores como la altura, la edad, el lugar de cultivo, entre otros (Skouta *et al.*, 2018; Favela-Hernández *et al.*, 2012). De los flavonoides se han descrito diversas actividades como la inhibición de ácidos nucleicos, de la función de la membrana citoplasmática, del metabolismo energético, la alteración de la permeabilidad de membrana, así como la inhibición de la adhesión, la formación de la biopelícula y la atenuación de la patogenicidad (Xie *et al.*, 2015).

2.4.2 Compuestos anti-virulencia como alternativa a los antibióticos

El problema que representa la resistencia a los antibióticos existentes ha incitado la búsqueda de metabolitos secundarios de plantas con potencial antibacteriano (Muro *et al.*, 2018). Sin embargo, en los últimos años también se ha puesto en la mira otro tipo de compuestos antimicrobianos, como los anti-virulencia, los cuales afectan directamente a los factores de virulencia de bacterias patógenas (Dickey *et al.*, 2017). Por esta razón, las plantas podrían ser una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos, como los compuestos anti-virulencia, para ser usados contra bacterias patógenas que presentan multi-resistencia.

La búsqueda de compuestos anti-virulencia como estrategia contra la resistencia a los antibióticos ha ido en aumento en los últimos años (Dickey *et al.*, 2017). Este tipo de compuestos tienen varias ventajas sobre los antibióticos, debido a que, como estos no están dirigidos a los procesos esenciales en la bacteria y no afectan el crecimiento, se piensa que los compuestos anti-virulencia no ejercerán una presión de selección que vuelva a las bacterias resistentes a ellos. Además, estarán dirigidos únicamente a los factores de virulencia de las bacterias patógenas y no afectarán a otras bacterias de la microbiota, como sucede con los antibióticos de amplio espectro.

Actualmente son reconocidos diversos factores y mecanismos moleculares que propician la virulencia de las bacterias. En general, las bacterias patógenas tienen diversos factores de virulencia particulares, aunque algunos pueden ser compartidos entre ellas. Entre los factores de virulencia se encuentran las toxinas, las cuales dañan el tejido de los organismos infectados; también se encuentran las fimbrias y adhesinas, cuya función es permitir a las bacterias adherirse a las células hospederas o a superficies inanimadas. Asimismo, algunas bacterias son capaces de producir sistemas de secreción tipo 3 (SST3), los cuales son complejos proteicos que se asemejan a una jeringa molecular, cuya función es inyectar proteínas efectoras a las células de sus hospederos y, de esta manera, establecer una infección. Otro mecanismo de virulencia es la formación de biopelículas o tapetes de bacterias sobre las células de sus hospederos o sobre material médico (Brannon & Hadjifrangiskou, 2016).

La activación de estos procesos está altamente regulada por sistemas de regulación que reconocen señales ambientales. Entre ellos, el “quorum sensing” (detección del quórum)

es un sistema de comunicación celular compuesto por una proteína que produce moléculas señal, también llamados autoinductores, que se liberan al exterior de las células, así como una proteína que reconoce estas señales y que generalmente actúa como un factor de transcripción que activa la expresión de genes, como aquellos involucrados en la formación de biopelículas u otros involucrados en virulencia (Ahmed & Salih, 2019).

El entendimiento de los factores de virulencia de una bacteria permite el desarrollo de compuestos anti-virulencia, cuyo propósito sería inhibir la actividad o la producción de los factores de virulencia. Como consecuencia, la bacteria patógena quedaría expuesta y podría ser eliminada por el sistema inmune o por bacterias de la microbiota. Los compuestos anti-virulencia incluso pueden utilizarse en conjunto con antibióticos para asegurar la erradicación de la infección (Ibarra & Bustamante, 2018).

2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa presente en diferentes ambientes como en el suelo o ambientes acuosos. Debido a su gran versatilidad metabólica puede encontrarse en humanos, animales o plantas, e incluso en ambientes inanimados como aquellos encontrados en hospitales. Es una bacteria patógena oportunista que suele causar enfermedades graves que se relacionan a menudo con infecciones nosocomiales o adquiridas en el hospital, en particular afectan a los pacientes que se encuentran en unidades de cuidados intensivos (Gellatly & Hancock, 2013). Se ha descrito que *P. aeruginosa* puede causar infecciones agudas en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica o infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística; sin embargo, esta bacteria también puede causar infecciones del torrente sanguíneo, infecciones relacionadas al catéter urinario, infecciones quirúrgicas, infecciones durante trasplantes y en quemaduras graves (Gellatly & Hancock, 2013).

2.5.1 Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Entre los genes de virulencia de *P. aeruginosa*, se encuentran aquellos que codifican para un sistema de secreción tipo III (SST3) y sus proteínas efectoras, los cuales participan en el establecimiento de infecciones agudas; así como los genes involucrados en la formación de biopelículas que le confieren a *P. aeruginosa* la capacidad de producir fenotipos persistentes durante las infecciones crónicas (Moradali *et al.*, 2017).

2.5.1.1 Sistema de secreción tipo III (SST3)

El SST3 de *P. aeruginosa* está compuesto por un apéndice en forma de aguja, el cual le permite la translocación de las proteínas efectoras de la bacteria a la célula hospedera por medio de un poro formado en la membrana de la célula huésped. La expresión y regulación del SST3, así como de las proteínas efectoras y sus chaperonas, está dada

por las proteínas codificadas por 36 genes localizados en 5 operones, que se encuentran dispersas en el cromosoma de la bacteria (Hauser, 2009). Las proteínas efectoras que se han identificado son ExoA ExoY, ExoS, ExoT y ExoU, estas se van a expresar de forma variable en diferentes cepas. Generalmente todas las cepas expresan una de las dos principales exotoxinas ExoU o ExoS, las cuales son capaces de causar la muerte rápida de las células hospederas (Figura 6) (Hauser, 2009; Gellatly & Hancock, 2013).

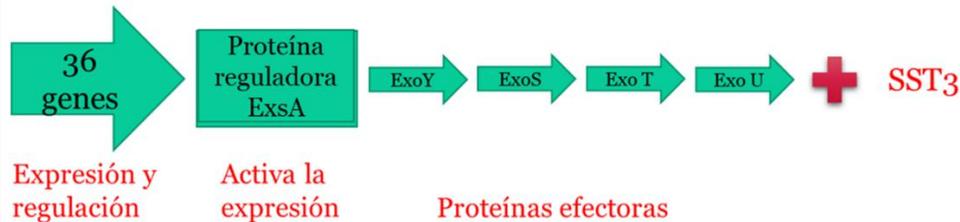


Figura 6.- Esquema de los genes del SST3 en *P. aeruginosa*. El regulador central ExsA, regula la expresión de los genes que codifican para el sistema de secreción tipo III, así como de sus proteínas efectoras (Hauser, 2009).

El regulador transcripcional ExsA, parte de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, es el encargado de activar la expresión del SST3 y de las proteínas efectoras (Williams *et al.*, 2019). El sitio de unión de ExsA es aproximadamente 45 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, lo que le permite interactuar con el factor σ^{70} y reclutar a la RNA polimerasa a la región promotora de sus genes blanco (Diaz *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2019). A través ExsA, y de otros reguladores que controlan su actividad, el SST3 se expresa de manera basal hasta que a través del contacto directo con la célula huésped se induce la máxima expresión del SST3. También, se han descrito condiciones *in vitro* que inducen la expresión de estos genes, tal como las bajas concentraciones de Ca^{2+} o la presencia de suero en el medio (Hauser, 2009; Diaz *et al.*, 2011).

2.5.1.2 Biopelícula y sus fases de desarrollo

P. aeruginosa se caracteriza por formar biopelícula, la cual se define como una comunidad de bacterias embebidas en una matriz extracelular formada por polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos extracelulares provenientes de la lisis bacteriana, los cuales proveen la estructura típica de la biopelícula y le confieren resistencia mecánica. En forma de biopelícula, esta bacteria puede encontrarse tanto en superficies bióticas, dentro de sus hospederos, como en superficies abióticas, sobre material médico dentro de los hospitales (Azam & Khan, 2019). El desarrollo de la biopelícula está conformado por cuatro etapas: la adhesión inicial, el desarrollo temprano, la maduración y el desprendimiento de las bacterias de la biopelícula (Figura 7) (Koo *et al.*, 2017).

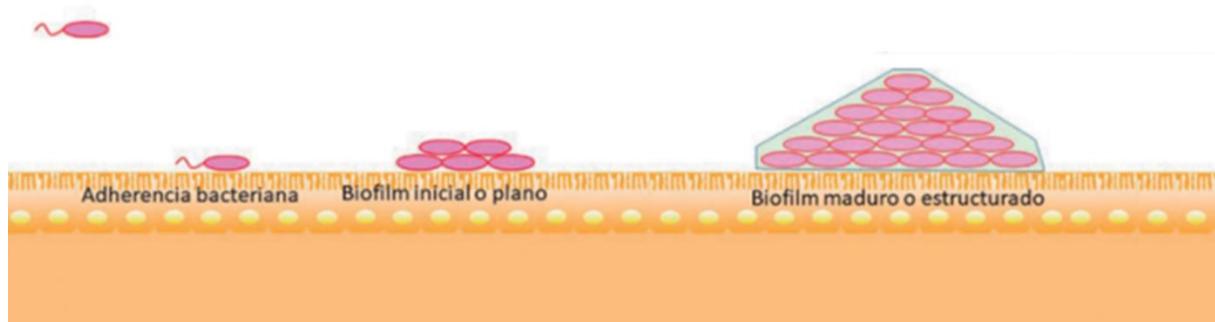


Figura 7.- Biopelícula. La formación de la biopelícula ayuda en el proceso de adherencia y colonización de *P. aeruginosa*; además también es una barrera de resistencia a los antibióticos, ya que estos penetran de manera lenta e incompleta (Modificado de Paz-Zarza et al., 2019).

En la etapa inicial se establece un contacto con la superficie mediante la expresión de adhesinas y del pili tipo IV. Durante el desarrollo temprano se da la formación de la monocapa que incluye la producción de los exopolisacáridos Pel y Psl, así como de alginato. En la maduración se da la formación de la estructura 3D de la biopelícula, dando una matriz protectora a las bacterias embebidas en ella, además, se establecen microambientes donde las bacterias coexisten a través de la comunicación celular y se generan células persistentes al estrés del ambiente o a los antibióticos. Durante la fase de desprendimiento, las células pueden dispersarse en forma de agregados o de células planctónicas para llegar a otras zonas. El proceso de formación de biopelículas está relacionado con la detección del quórum (Lee & Yoon, 2017; Paz-Zarza et al., 2019).

A pesar de que *P. aeruginosa* contiene mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos, el fenotipo de persistencia que genera a través de la formación de biopelícula puede favorecer un nicho donde se seleccionan cepas multi-resistentes debido a que los antibióticos llegan en bajas concentraciones a la biopelícula. De hecho, actualmente se han reportado aislados clínicos resistentes a casi toda clase de antibióticos empleados contra las infecciones causadas por esta bacteria, como los aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos.

2.5.1.3 Quorum sensing (QS)

Se trata de un mecanismo basado en la comunicación de célula a célula que permite que las poblaciones bacterianas se adapten a los cambios del ambiente (Paz-Zarza *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* expresa más de 300 genes controlados por QS (Azam & Khan, 2019). Las señales en los sistemas QS de *P. aeruginosa* son mediadas a través de autoinductores de tipo N-Acil homoserin lactonas (AHL) y quinolonas, las cuales son dependientes de la densidad celular (quórum) y son reconocidas por un regulador transcripcional que induce la expresión de genes de virulencia. En *P. aeruginosa* existen

al menos 4 sistemas QS, los dos más estudiados son Las y Rhl (Figura 8) (Moradali *et al.*, 2017).

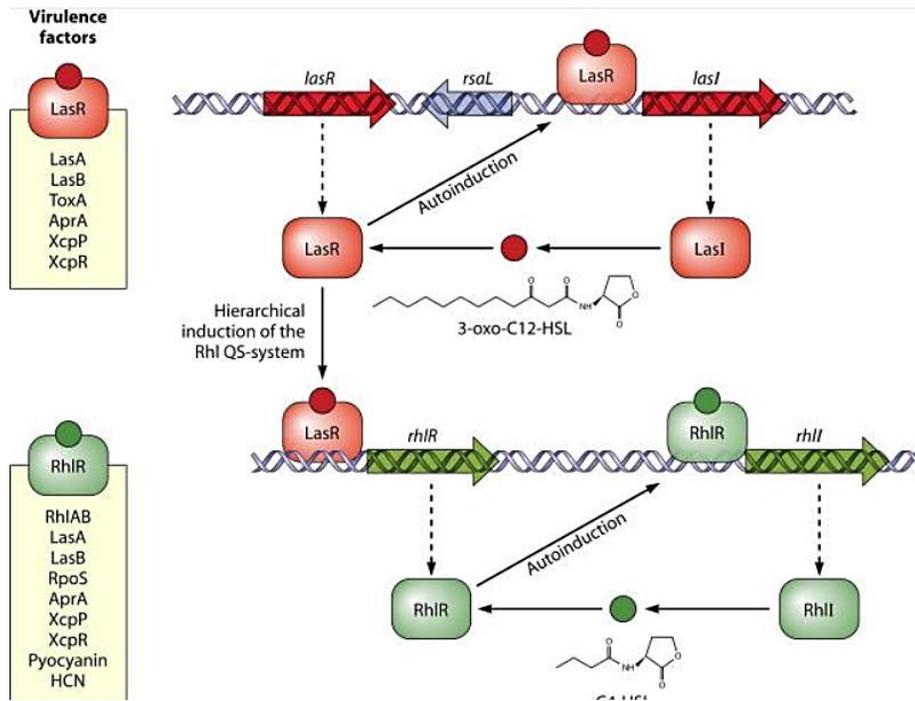


Figura 8.- Sistemas de detección de quórum en *Pseudomonas*. Los dos sistemas más estudiados de QS son Las y Rhl, cuyos reguladores transcripcionales son LasR y RhIR, respectivamente. Estos sistemas son controlados por medio de señales bacterianas de tipo AHL, las cuales son dependientes de la densidad celular. Estos dos sistemas se encargan de expresar distintos genes de virulencia (Jiménez *et al.*, 2012).

El sistema Las responde a la N-3-oxo-dodecanoil homoserin lactona (3-oxo-C12-HSL), producida por la enzima LasI sintasa; esta molécula es reconocida por el regulador transcripcional LasR, el cual controla la producción de las elastasas LasA y LasB, la exotoxina A y la proteasa alcalina; además, LasR induce la expresión de *rhIR*. El sistema Rhl responde a la N-butanoil homoserin lactona (C4-HSL), producida por la RhII sintasa; esta molécula es detectada por el regulador transcripcional RhIR, el cual induce la producción de los ramnolípidos, de las elastasas LasA y LasB y la plocianina, mientras que reprime la expresión de SST3 (Jiménez *et al.*, 2012).

Las elastasas LasA y LasB son enzimas que tienen la capacidad de degradar múltiples proteínas del hospedero, mientras los ramnolípidos que tienen propiedades biosurfactantes, neutralizan a los neutrófilos. La exotoxina A (ToxA) inhibe la síntesis de proteínas del hospedero. Por otra parte, la producción de plocianina, un pigmento azul-verdoso, es característica de *P. aeruginosa*, causa estrés oxidativo a las células del hospedero a través de la producción de radicales libres interrumpiendo la cadena de transporte de electrones. La producción de estos factores de virulencia de *P. aeruginosa* controlados por QS dañan a los tejidos e inactivan al sistema inmune, promoviendo la

muerte celular de las células de sus hospederos (Jimenez et al., 2012; Gellatly & Hancock, 2013; Moradali et al., 2017).

2.6 *Salmonella* Typhimurium

Salmonella es un género de bacterias Gram-negativas que se dividen en dos especies: *bongori* y *enterica*. A su vez, *S. enterica* se divide en 6 subespecies, de las cuales la subespecie *enterica* se subdivide a su vez en más de 2500 serovariedades, de acuerdo con los antígenos de superficie del flagelo (H) y del lipopolisacárido (O). La subespecie *enterica* es la de mayor importancia médica ya que es capaz de causar infecciones sistémicas y gastrointestinales. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es el agente causal de infecciones gastrointestinales en humanos, pero también causa infecciones sistémicas en niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas; asimismo, esta bacteria tiene la capacidad de producir ambos tipos de infecciones en animales de importancia de la industria avícola y ganadera (Fàbrega & Vila, 2013).

Las infecciones por *Salmonella* comienzan cuando la bacteria se ingiere en altas densidades a partir de alimentos o agua contaminados. Una vez que *Salmonella* llega al intestino, se adhiere al epitelio intestinal donde la infección comienza. A través de la expresión de sus genes de virulencia, especialmente de un SST3, *Salmonella* inyecta proteínas efectoras que modifican las vías de señalización de la célula hospedera. Esto permite la formación de ondulaciones en la membrana de la célula hospedera y favorece la entrada de la bacteria a estas células en forma de vacuolas, donde la bacteria puede sobrevivir y replicarse; de esta manera, *Salmonella* produce una infección gastrointestinal. Posteriormente, la bacteria puede ser fagocitada por macrófagos y, de esta manera, llegar a otros órganos, produciendo así una infección sistémica (Haraga et al., 2008).

La patogenicidad de esta bacteria es mediada a través de la expresión de sus genes de virulencia que generalmente se encuentran agrupados en regiones del genoma denominadas islas de patogenicidad (SPI, "*Salmonella* Pathogenicity Island"). Se ha descrito que las SPIs fueron adquiridas a través de eventos de transferencia horizontal debido a que su porcentaje de GC difiere del resto del genoma bacteriano. Aunque se han descrito la presencia de un gran número de SPIs presentes en el género *Salmonella*, la isla 1 y 2 son las que han sido mayormente estudiadas (Dos Santos et al., 2019).

2.6.1 Isla de patogenicidad 1 (SPI-1)

La isla 1 (SPI-1) contiene alrededor de 39 genes que codifican para un sistema de secreción tipo III (SST3-1), proteínas efectoras y sus chaperonas, así como de reguladores transcripciones (Figura 9) (Fàbrega & Vila, 2013).

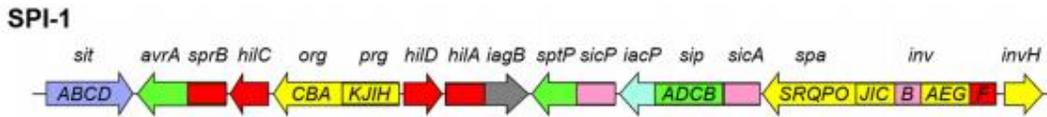


Figura 9.- Representación esquemática de los genes de SPI-1 (Fábrega & Vila, 2013).

Una vez que *Salmonella* llega al intestino, el regulador transcripcional HilD, codificado en SPI-1, induce la expresión de los genes de esta isla, y de genes relacionados fuera de ella (Figura 10). Esta expresión se lleva a cabo en forma de una cascada de regulación donde HilD, activa la expresión del regulador HilA, el cual induce la expresión de los operones *prg/org* e *inv/spa* que codifican para el sistema de secreción tipo III, así como del regulador InvF, el cual, junto con HilA, controlan la expresión de los operones *sic/sip* que codifican para las proteínas efectoras secretadas del SST3-1 (Figuras 9 y 10) (Fábrega & Vila, 2013). El ensamblaje del SST3-1 a partir de las proteínas codificadas en SPI-1, le permite a *Salmonella* la inyección de proteínas efectoras desde el citoplasma de la bacteria al citoplasma de las células intestinales, las cuales modifican las rutas de transducción de señales, causando re-arreglos del citoesqueleto de actina en las célula hospedera, favoreciendo la introducción de *Salmonella* a estas células en forma de vacuolas y, a su vez, la producción de diarrea (Fábrega & Vila, 2013; Figueroa & Verdugo, 2005).

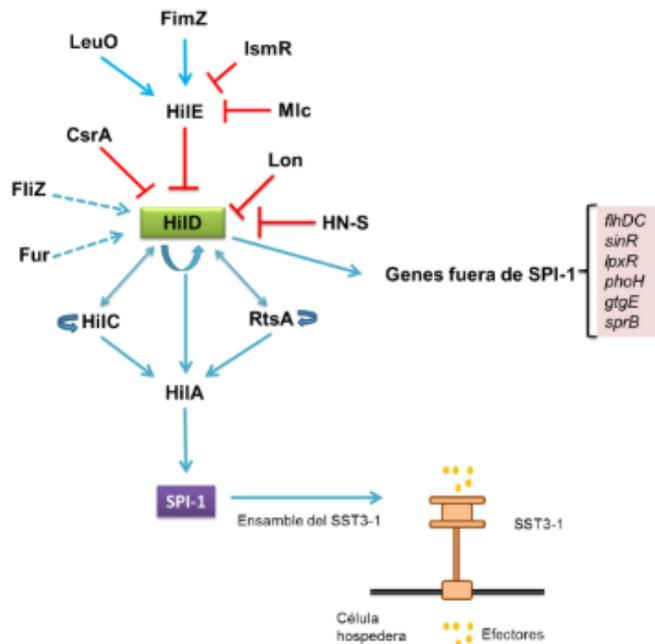


Figura 10.- Cascada de regulación de los genes de SPI-1. Representación de la activación (flechas azules) y represión (flechas rojas) de los diferentes genes que forman parte de la isla 1 (Paredes, 2019).

2.6.2 Isla de patogenicidad 2 (SPI-2)

La isla 2 (SPI-2) contiene 44 genes que codifican para otro SST3 (SST3-2), para diferentes proteínas efectoras y sus chaperonas, así como para reguladores transcripcionales (Figura 11). El sistema de dos componentes SsrA/B, que está formado por la proteína sensora histidina cinasa SsrA y el regulador de respuesta SsrB, codificados dentro de SPI-2, se encargan de inducir la expresión de los operones *ssa*, *sse* y *ssc*, los cuales codifican para el SST3-2, sus proteínas efectoras y chaperonas (Figura 11) (Figuroa & Verdugo, 2005).

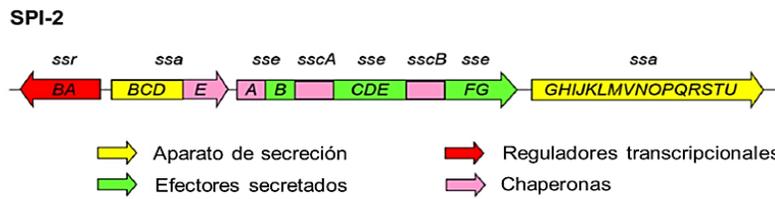


Figura 11.- Representación esquemática de los genes de SPI-2. (Modificado de Fábrega & Vila, 2013).

Estos genes se expresan en el interior de las vacuolas-contenedoras de *Salmonella* (SCV, “*Salmonella*-containing vacuole”), por lo que son importantes durante la sobrevivencia y replicación de *Salmonella* dentro de macrófagos, para su posterior diseminación hacia diferentes órganos de sus hospederos, produciendo así una infección sistémica (Fábrega & Vila, 2013; Figuroa & Verdugo, 2005). No obstante, la expresión de los genes de SPI-2 se induce de manera *in vitro* cuando la bacteria se crece en medios mínimos que cuentan con concentraciones bajas de fosfato y magnesio (Pérez-Morales, 2017; Figuroa & Verdugo, 2005).

Debido a la importancia médica y económica de las infecciones provocadas por *S. enterica*, así como la detección de cepas multi-resistentes a los antibióticos, es de vital importancia la búsqueda de compuestos antimicrobianos contra infecciones por esta bacteria, y, de particular importancia para este proyecto, la búsqueda alternativa de compuestos con capacidad anti-virulencia.

2.7 Antecedentes directos

En nuestro grupo se ha determinado que algunos extractos de plantas tales como el de canela, gobernadora, eucalipto, citronela y de cítricos, así como el compuesto cinamaldehído, tienen efecto bactericida sobre *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*, de los cuales se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias (“Minimal Inhibitory Concentration”, MIC) y las concentraciones sub-inhedoras (“Sub-Inhibitory Concentration”, SIC) (Tabla 2) (Torres, 2021; Téllez, 2020). La MIC se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un

microorganismo (Andrews, 2001), mientras que la SIC es la concentración del antimicrobiano que no afecta el crecimiento bacteriano (Davies et al., 2006).

Extractos o compuestos	Origen	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		MIC (dilución) ^a	SIC (dilución) ^a	MIC (dilución) ^a	SIC (dilución) ^a
Eucalipto	Extracto de hojas de árbol eucalipto (<i>Eucalyptus spp.</i>).	1/30	1/150	ND	ND
Citronela	Extracto de planta citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>).	1/100	1/400	ND	ND
Mega	Extracto de planta gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>). Ultraquimia.	1/70	1/500	ND	ND
Citrobio	Extracto de cítricos Ultraquimia.	1/2,500	1/14,000	1/10,000	1/20,000
CinnAcar	Extracto de canela (<i>Cinnamomum zeylanium</i>). Ultraquimia.	1/100 (1.52 g/L) ^a	1/400 (0.38 g/L) ^a	1/200 (0.76 g/L) ^a	1/400 (0.38 g/L) ^a
Cinamaldehído	Sigma.	1/1,000 (7.54 mM) ^a	1/3,500 (2.15 mM) ^a	1/2,000 (3.77 mM) ^a	1/8,000 (0.94 mM) ^a

Tabla 2.- Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y sub-inhibitorias (SIC) de los diferentes extractos o compuestos sobre *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*. ^a Además de las diluciones utilizadas, se indican las concentraciones correspondientes en g/L o mM. ND indica “no determinado” (Torres, 2021; Téllez, 2020).

Estos resultados sugieren que estos extractos pueden utilizarse como agentes antibacterianos y que podrían tener un efecto bactericida sobre aislados multi-resistentes de *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, los extractos de plantas podrían también tener un efecto negativo sobre la expresión de genes de virulencia (Ahmed & Salih, 2019). En este proyecto nos surgió la pregunta: ¿estos extractos de plantas tienen un efecto anti-virulencia? Para abordar esta pregunta, analizamos la expresión de algunos de los genes de virulencia de *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa* en presencia de concentraciones sub-inhibitorias de estos extractos o compuestos de plantas.

III. Justificación

La resistencia bacteriana representa un grave problema de salud mundial ya que actualmente las infecciones por estas bacterias causan miles de muertes en el mundo. Es por ello que se requieren generar nuevas estrategias para contender contra las infecciones ocasionadas por estas bacterias. Los metabolitos secundarios de las plantas representan una fuente potencial en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, tal como los compuestos anti-virulencia, los cuales tienen un efecto sobre los factores de virulencia de bacterias patógenas sin tener ningún efecto sobre bacterias de la microbiota. Al no afectar procesos celulares esenciales, los compuestos anti-virulencia tienen una menor presión de selección para la generación de resistencia, representando una alternativa prometedora en el tratamiento de infecciones por bacterias que presentan multi-resistencia.

IV. Hipótesis

Los extractos de canela, gobernadora, eucalipto, citronela y cítricos son capaces de inhibir la expresión de genes de virulencia de *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa*, por lo que pueden ser usados como agentes anti-virulencia contra infecciones provocadas por bacterias multi-resistentes a los antibióticos.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de extractos de diferentes plantas en la expresión de genes de virulencia de *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*.

5.1.1 Objetivos particulares

Determinar el efecto de extractos de canela, gobernadora, eucalipto, citronela y de cítricos sobre la expresión de los genes de virulencia *invF* y *ssaG* de *S. Typhimurium*.

Determinar el efecto de extractos de canela, gobernadora, eucalipto, citronela y de cítricos sobre la expresión de los genes virulencia *rhIR* y *exsA* de *P. aeruginosa*.

VI. Metodología

Las cepas bacterianas y vectores empleados en este estudio se enlistan en la tabla 3.

PLÁSMIDO O CEPA	DESCRIPCIÓN ¹	REFERENCIA O FUENTE
Cepas		
S. Typhimurium	WT SL1344, Stp ^R	Hoiseth & Stocker, 1981
P. aeruginosa	WT PAO1, Amp ^R	Dra. Soberón ²
P. aeruginosa	Derivada de PAO1; <i>rhlR-lux</i>	Dra. Soberón ²
P. aeruginosa	Derivada de PAO1; <i>exsA-lux</i>	Dra. Soberón ²
E. coli	DH10β, Stp ^R	Invitrogen
Plásmidos		
pKLO11	Vector derivado de pKK232-8, que contiene al gen <i>lacZ</i> sin promotor para construir fusiones transcripcionales, Amp ^R	Pérez-Morales et al., datos no publicados
pinvF-lacZ	Plásmido derivado de pKLO11 que contiene la fusión transcripcional <i>invF-lacZ</i> desde los nucleótidos -306 a +213	Nava-Galeana et al., datos no publicados
pssaG-lacZ	Plásmido derivado de pKLO11 que contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-lacZ</i> desde los nucleótidos -232 a +361	Pérez-Morales et al., datos no publicados
prpsL-lacZ	Plásmido derivado de pKLO11 que contiene la fusión transcripcional <i>rpsL-lacZ</i> desde los nucleótidos -34 a +287	Este estudio

Tabla 3.- Cepas y vectores utilizadas en este estudio. ¹ Las posiciones mencionadas en las fusiones transcripcionales son con respecto al sitio de inicio de la transcripción reportado para cada gen. ² Estas cepas fueron donadas por el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chavéz del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

6.1 Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB (“Lysogeny Broth”) el cual contiene triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%, pH 7.4. Cuando fue necesario, el medio fue suplementado con los siguientes antibióticos: estreptomicina (100 µg/ml) y ampicilina (200 µg/ml). El medio LB sólido fue preparado con los componentes del LB líquido y bacto agar al 1.5%. El medio mínimo MM-N contiene KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7.5 mM, K₂SO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM, MgCl₂ 10 µM, glicerol al 0.5% y casaminoácidos al 0.1%.

6.2 Extractos o compuestos a evaluar

La colección de estos extractos o compuestos utilizados en este trabajo se enlistan en la Tabla 4.

CinnacAr 	Extracto de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) 151.8 g de ingrediente activo/L
Mega 	Extracto de planta gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>)
Eucalipto	Extracto de planta de eucalipto (<i>Eucalyptus</i> spp.)
Citronela	Extracto de planta Citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>)
Citrobio 	Extracto de cítricos
Cinnamaldehído	Compuesto extraído de la canela 7.54 M

Tabla 4.- Extractos comerciales de plantas que se usaron en este proyecto

El CinnacAr, el Mega y el Citrobio son extractos comerciales que obtuvimos mediante una colaboración que se tiene con el Dr. Odon Vite de la empresa Ultraquimia. Los extractos de eucalipto y citronela fueron donados por un grupo de personas de la región de Cuautla Morelos, mientras que el compuesto cinnamaldehído fue adquirido de la marca Sigma Aldrich.

6.3 Ensayo de crecimiento en microplaca

Las cepas de *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa* que contienen las fusiones transcripcionales a evaluar (Tabla 3), se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. A partir de este pre-inóculo, se realizó una dilución 1:50 en medio LB para las cepas de *S. Typhimurium* y 1:100 para las cepas de *P. aeruginosa*. Para el crecimiento de *S. Typhimurium* en MM-N, se tomaron 1.5 ml del pre-inóculo de toda la noche y se centrifugaron 2 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con 1 ml de MM-N, se centrifugó 2 min a 13,000 rpm y se resuspendió en 400 µl de MM-N. Este volumen se inoculó en 20 ml de MM-N (dilución 1:50). Se transfirieron 150 µl

de estas diluciones a microplacas de 96 pozos estériles (Costar) por triplicado; para *P. aeruginosa*, se utilizaron microplacas de 96 pozos blancas (Costar). Como blanco se utilizó 150 μ l de medio LB o MM-N. Posteriormente, se agregaron 10 μ l de las diluciones de los extractos o compuestos a evaluar en medio LB o MM-N. Entonces, las microplacas se incubaron a 37°C en un lector de microplacas tipo Epoch2 (BioTek) o de tipo GloMax (Promega); se midió la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) cada hora durante 7 o 16 h, agitando durante 5 a 10 s de manera orbital antes de cada lectura.

6.4 Determinación de la actividad β -galactosidasa y luciferasa

Se midió la actividad β -galactosidasa en la microplaca de *S. Typhimurium* después de 16 o 24 h de crecimiento en medio LB o MM-N, respectivamente. Para esto, se agregaron a cada pozo 12 μ l de lisozima 6 mg/ml (resuspendida en buffer Tris 10 mM pH 8). La microplaca se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Entonces, se agregaron 50 μ l de ONPG 2 mg/ml (o-Nitrofenil β -D-galactopiranosido; Sigma) resuspendido en buffer Z 1X (Na_2HPO_4 0.06M, NaH_2PO_4 0.046M, KCl 0.01M, $MgSO_4$ 0.002M, pH 7). La actividad β -galactosidasa se calculó inmediatamente después de añadir del ONPG, utilizando el lector de microplacas tipo Epoch2 posicionado en modo cinética, a 405 nm, cada 15 segundos durante 5 minutos. Los valores de actividad obtenidos de cada muestra se interpolaron en una curva estándar de actividad β -galactosidasa (de 0 a 5400 U), previamente almacenada en el programa Gen5. Finalmente, la “actividad específica β -galactosidasa (U/ OD_{600})” se obtuvo al restar el valor del blanco y después dividir entre la OD_{600} a las 16 o 24 h.

Por otra parte, se determinó la bioluminiscencia producida por las cepas de *P. aeruginosa* después de 7 h de crecimiento. La bioluminiscencia se midió con el luminómetro GloMax (Promega). Las “Unidades Relativas de Bioluminiscencia” se obtuvieron dividiendo los valores de bioluminiscencia obtenida entre la OD_{600} a las 7 h.

6.5 Extracción de DNA genómico y plasmídico

Para la extracción de DNA genómico (DNAg) se utilizó el protocolo modificado de Miller *et al.* (1988). A partir de un cultivo de bacterias de toda la noche se tomaron 1.5 ml de cultivo y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se suspendió la pastilla de bacterias en 570 μ l de buffer Tris-HCl 10 mM pH 8. Después se agregó 30 μ l de SDS al 20%, se mezcló durante 30 s y se incubó a 80°C durante 5 min. Después de ese tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se agregó 5 μ l de RNasa a 10 mg/ml. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 15 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En seguida, se agregó 200 μ l de NaCl 5 M, se mezcló durante 30 s y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. A continuación, se le agregó 800 μ l de isopropanol, se mezcló durante 30 s y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se

descartó el sobrenadante, y se lavó la pastilla de DNA con 1 ml de etanol al 70 % frío y se mezcló durante 30 s. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se repitió el paso de lavado anterior. Se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla de DNA con calor en un “Concentrator Centrifuge SpeedVac SC100” (Savant) durante 10 min. Para eluir el DNA, se agregó 80 µl de agua Mili Q estéril.

Para la extracción de plásmidos, se utilizó el protocolo del kit “Zyppy Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante, pero el paso final de elución fue en agua Mili Q estéril.

6.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para el análisis del DNAG, plásmidos y productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris base 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8). Antes de cargar las muestras en el gel, se mezclaron con buffer de carga de DNA 5X (azul de bromofenol 3.73 mM, xileno cianol FF 4.64 mM y glicerol al 50 %) y se utilizó como marcador de peso molecular el “Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder” (Thermo Scientific). Los geles se corrieron en buffer TAE 0.5X a 110 V durante 50 min aproximadamente. Posteriormente, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y se analizaron en un transiluminador de luz UV “ChemiDoc XRS+ System” (Biorad).

6.7 Construcción de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*_S.tm

Para la construcción del plásmido prpsL-lacZ, se amplificó por PCR la región intergénica, así como unos nucleótidos después del ATG de *rpsL* a partir de DNAG de *S. Typhimurium* SL1344, con los oligonucleótidos rpsL-FwEcoRI (5'- CTT GAA TTC CAG ACA GTG TCG TCA GGG TTG-3') y rpsL-RvHindIII (5'- CTT AAG CTT GTA GTA TAT ACA CGA GTA CAT AC-3'). Para ello, se hicieron mezclas de reacción con los componentes de la Tabla 5. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 5min; 30 ciclos de: 95°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; 1 ciclo de 72°C durante 5 min.

Componentes	Concentración final
DNA templado	1-2 µl/reacción de 100 µl
Buffer de PCR 10X	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM	0.2 mM
Solución de MgCl₂ 50 mM	1 mM
Oligonucleótido sentido 25 µM	0.5 µM

Oligonucleótido antisentido 25 μM	0.5 μ M
Taq polimerasa	1 μ l/reacción de 100 μ l
Agua Mili Q estéril	Variable

Tabla 5.- Componentes de la mezcla de reacción de PCR.

Entonces, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit “DNA Clean & Concentrator” (Zymo Research), y se eluyeron en 35 μ l de agua MQ estéril. Se analizó el DNA en geles de agarosa al 1% y se cuantificó mediante un “Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer” (Thermo Scientific). Por otra parte, también purificó el plásmido pKLO11, se analizó en gel y se cuantificó de la misma manera. Posteriormente, se realizó una reacción de digestión doble con las enzimas EcoRI y HindIII (Thermo Scientific), a 37°C durante 4 h en un volumen de reacción de 80 μ l. Para esto, se agregaron 8 μ l de Buffer R (10X), 1 μ l de enzima EcoRI y HindIII, 1 μ g de DNA o vector y se aforó a 80 μ l con agua MQ estéril. Después, se purificaron los fragmentos de DNA digeridos con el kit de Zymo, se analizaron en un gel de agarosa y se cuantificó por nanodrop. Se realizó una reacción de ligación en un volumen total de 20 μ l, en el cual se utilizó una concentración de DNA:vector de 3:1 molar, 2 μ l de buffer 10X T4 DNA ligasa, 1 μ l de T4 DNA ligasa y se aforó con agua MQ estéril; entonces, la reacción de ligación se incubó a 16°C durante toda la noche. Después de este tiempo, se inactivó a la enzima por calor a 65°C durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 3 μ l de la reacción de ligación a 50 μ l de células electrocompetentes de *E. coli* DH10 β en una celda de electroporar de 0.2 cm (Biorad) y se transformó mediante electroporación en un MicroPulser (Biorad) a un voltaje de 2.5 kV durante 4-5 ms. Las células se recuperaron en 1 ml de medio SOC (Bacto triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y Glucosa al 0.36%), a 37°C en agitación a 200 rpm durante 1 h. Se plaquearon 100 μ l en cajas con medio LB con los antibióticos correspondientes y 50 μ g/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido; Sigma) resuspendido en DMF (N, N-dimetilformamida; Sigma). La caja se incubó a 37°C durante toda la noche. Para confirmar que las colonias obtenidas tuvieran el plásmido que contiene el inserto, se realizó una reacción de PCR en colonia con los oligonucleótidos rpsL-FwEcoRI y lacZ-rev11 (5'- GGC GAT TAA GTT GGG TAA CGC-3'); también se analizó mediante secuenciación. Entonces, se transformó este plásmido en células electrocompetentes de *S. Typhimurium*.

6.8. Análisis estadístico

Los resultados de la expresión de las fusiones transcripcionales fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Dunnett para comparar con el control de elución, usando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad

Software, Inc., San Diego, USA). Se consideró un cambio significativo, cuando el valor de $p \leq 0.05$ y la relación tratamiento/control incrementara o disminuyera en al menos 1.5 veces.

VII. Resultados

7.1 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de *invF-lacZ*

7.1.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de *invF-lacZ*

Para determinar si el cinamaldehído tiene un efecto sobre la expresión de los genes de SPI-1, evaluamos la expresión de *invF*, el cual codifica para el regulador transcripcional InvF (Fàbrega & Vila, 2013). Para esto, analizamos la expresión de la fusión transcripcional *invF-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia o presencia de concentraciones sub-inhedoras de cinamaldehído. Para confirmar que las concentraciones utilizadas no afectaran el crecimiento, se monitoreó el crecimiento de *S. Typhimurium* en microplacas con LB a 37°C durante 16 h, en presencia de diferentes concentraciones de este compuesto (Figura 12).

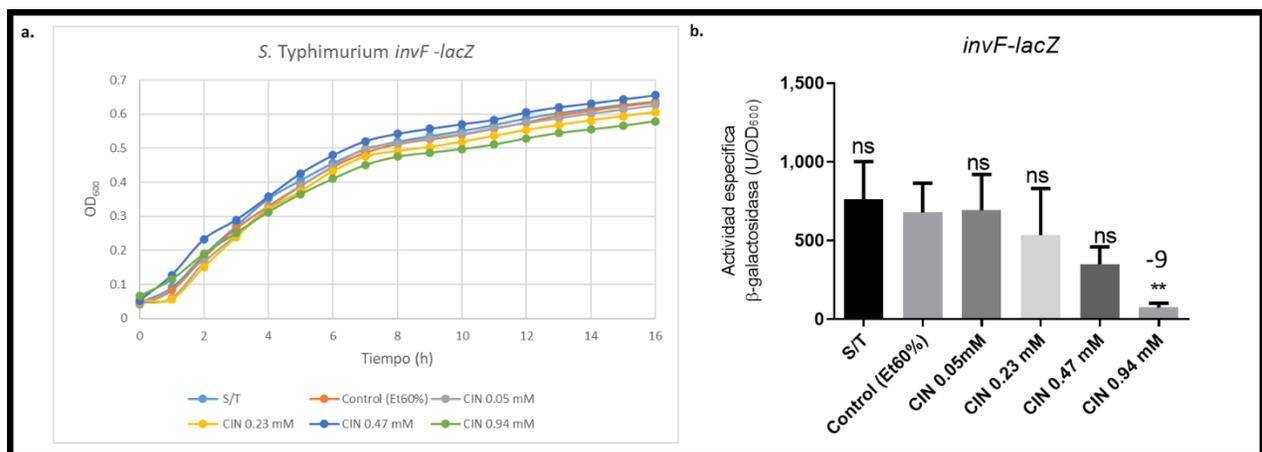


Figura 12.- El cinamaldehído disminuye la expresión de *invF*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *invF-lacZ*, contenida en el plásmido *pinvF-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.05 mM, 0.23 mM, 0.47 mM y 0.94 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *invF-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.05 mM, 0.23 mM, 0.47 mM y 0.94 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. **, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.01$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

El crecimiento de las cepas que fueron tratadas con cinamaldehído a una concentración de 0.05 mM, 0.23 mM, 0.47 mM y 0.94 mM, fue similar entre las cepas tratadas con el control de elución (Etanol al 60%) o sin tratamiento después de 16 h de crecimiento, las cuales alcanzaron una OD₆₀₀ aproximada de 0.6 (Figura 12A). Entonces, evaluamos la expresión de *invF-lacZ* después de 16 h de crecimiento en placa en presencia de cinamaldehído a estas mismas concentraciones (Figura 12B).

La expresión de *invF-lacZ* disminuyó 9 veces en la cepa tratada con cinamaldehído 0.94 mM, en comparación con la cepa tratada con el control de elución (Figura 12B); sin embargo, en las cepas tratadas con cinamaldehído 0.05 mM, 0.23 mM y 0.47 mM, la expresión de *invF-lacZ* fue similar a la cepa tratada con el control de elución (Figura 12B). Estos resultados indican que la presencia de cinamaldehído a una concentración de 0.94 mM disminuye la expresión de *invF*.

Para determinar si el efecto del cinamaldehído es solamente sobre la expresión de genes de virulencia como *invF*, evaluamos la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* (*rpsL* codifica para la proteína ribosomal S12 de la subunidad 30S). El crecimiento de la cepa de *S. Typhimurium* fue similar entre los tratamientos con cinamaldehído 0.05 mM, 0.23 mM y 0.47 mM, el control de elución y la cepa sin tratar, llegando a una OD₆₀₀ entre 0.4 y 0.5 al final de la cinética (Figura 13A). La expresión de *rpsL-lacZ* fue similar entre los tratamientos con cinamaldehído 0.05 mM y 0.23 mM, la cepa sin tratamiento y con el control de elución (Figura 13B); sin embargo, en la concentración de cinamaldehído 0.47 mM, la expresión de *invF-lacZ* disminuyó 1.9 veces, con respecto al control de elución (Figura 13B). Estos resultados indican que el cinamaldehído, a una concentración de 0.47 mM, disminuye la expresión de *rpsL*.

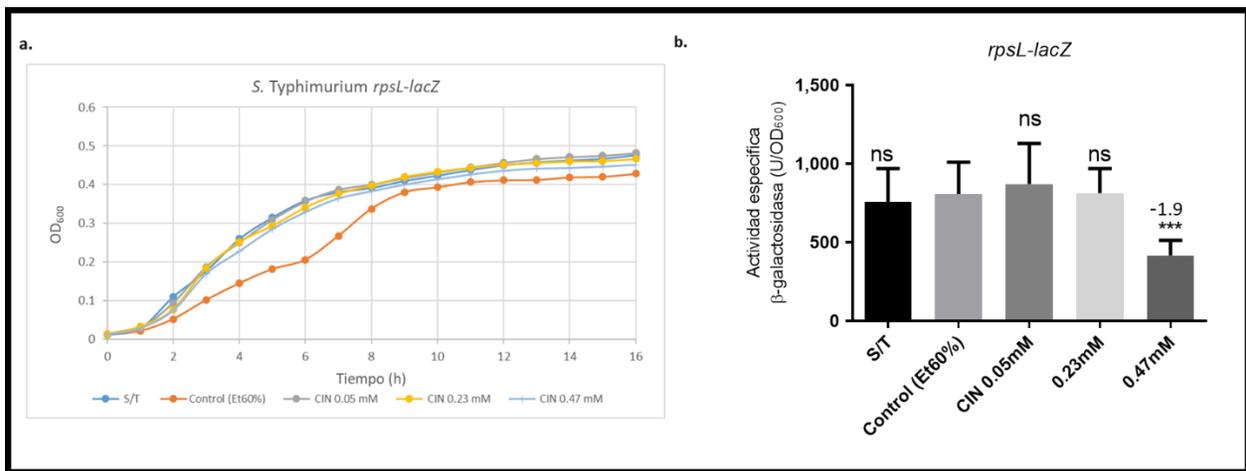


Figura 13.- El cinamaldehído disminuye la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.05 mM, 0.23 mM y 0.47 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.05 mM, 0.23 mM y 0.47 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.1.2 Efecto del cinnacAr sobre la expresión de *invF-lacZ*

Para determinar si el extracto de canela (cinnacAr) tiene algún efecto sobre la expresión de *invF*, primero evaluamos que las concentraciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *S. Typhimurium* en microplacas con LB a 37°C durante 16 h, en presencia de diferentes concentraciones de este extracto (Figura 14).

Las cepas que fueron tratadas con CinnacAr a las concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, crecieron de manera similar a la cepa sin tratamiento o con el control de elución (agua), llegando a una OD₆₀₀ de 0.6 al final de la cinética, a las 16 h (Figura 14A). La expresión de *invF-lacZ* disminuyó en 1.5 veces en presencia de cinnacAr a la concentración de 47.43 mg/L, con respecto al control de elución (Figura 14B). Estos resultados indican que la presencia de cinnacAr a 47.43 mg/L, disminuye la expresión de *invF*.

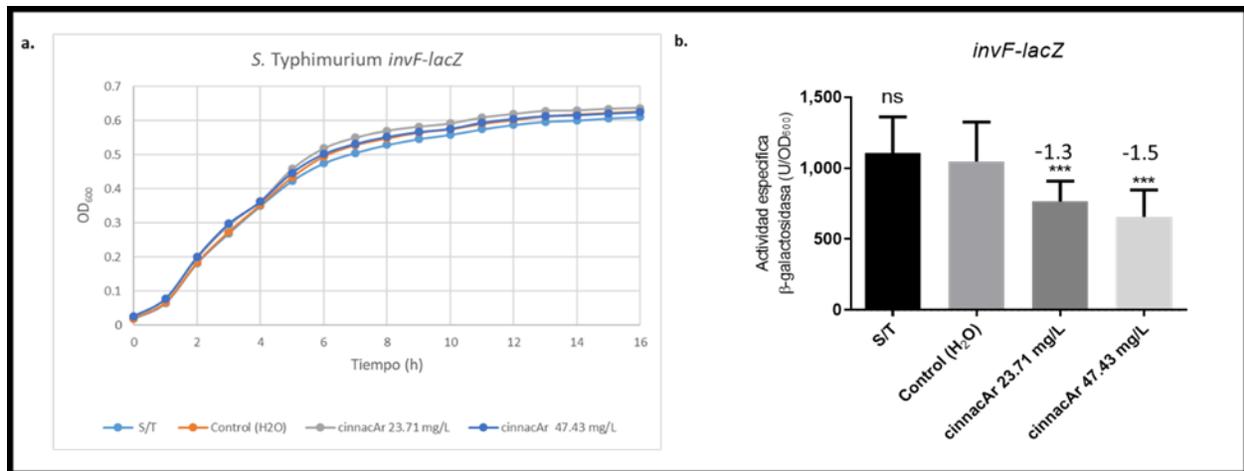


Figura 14.- El CinnacAr disminuye la expresión de *invF*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *invF-lacZ*, contenida en el plásmido *pinvF-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, Agua. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *invF-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, Agua. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

También, evaluamos el crecimiento y la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* en presencia de cinnacAr en concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L (Figura 15). Al final de la cinética, a las 16 h, el crecimiento de las cepas tratadas con cinnacAr 23.71 mg/L y 47.43 mg/L fue similar a la cepa sin tratamiento o la cepa con el control de elución (OD₆₀₀ de 0.5 aproximadamente) (Figura 15A). La expresión de *rpsL-lacZ* fue similar en todos los tratamientos con cinnacAr y el control de

elución (agua) (Figura 15B). Estos resultados indican que el cinnAcar, a las concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, no afecta la expresión de *rpsL*.

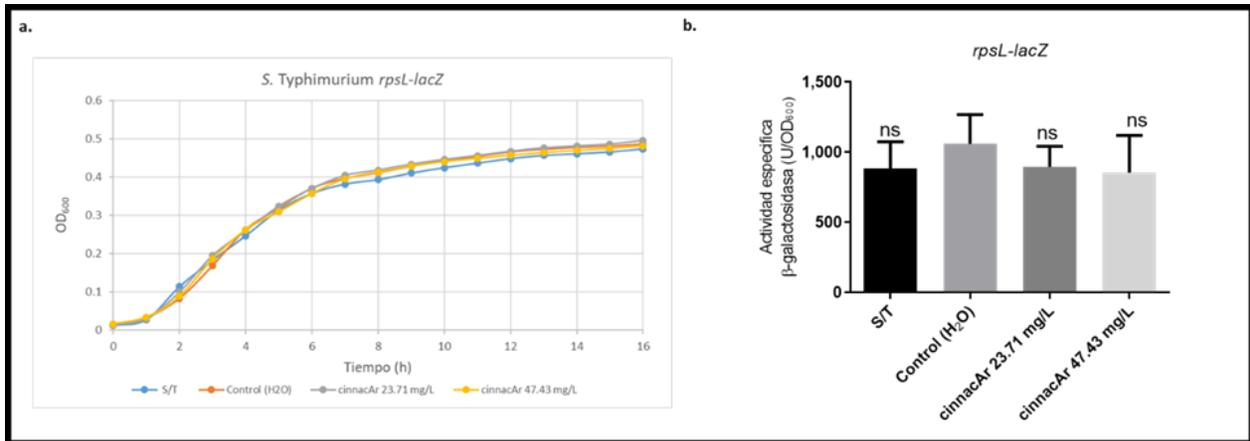


Figura 15.- El CinnacAr no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, Agua. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, Agua. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns; no significativo.

7.1.3 Efecto de la citronela sobre la expresión de *invF-lacZ*

Para determinar si el extracto de citronela tiene algún efecto sobre la expresión de *invF*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *S. Typhimurium* en microplacas con LB a 37°C durante 16 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 16). Las cepas que fueron tratadas con citronela a las diluciones 1/1,200, 1/800 y 1/600, crecieron de manera similar a la cepa sin tratamiento o a la cepa con el control de elución (LB) (Figura 16A). La expresión de *invF-lacZ* disminuyó 1.5 veces en presencia del extracto de citronela 1/600, en comparación con la cepa que fue tratada con el control de elución (Figura 16B). Nuestros resultados indican que el extracto de citronela, a la dilución de 1/600, disminuye la expresión de *invF*.

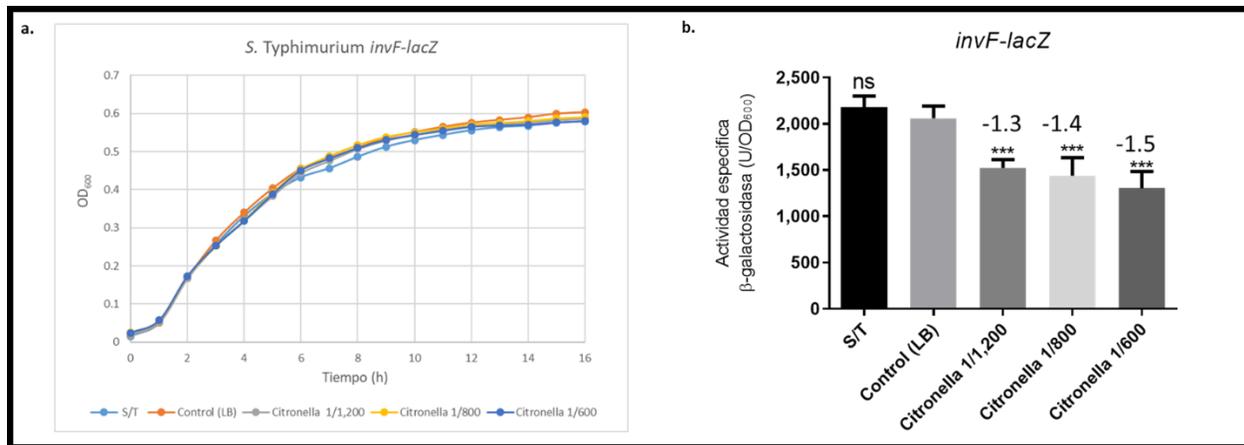


Figura 16.- La citronela disminuye la expresión de *invF*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *invF-lacZ*, contenida en el plásmido *pinvF-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800 y 1/600, así como en presencia del control de elución de la citronela, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *invF-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800 y 1/600, así como en presencia del control de elución de la citronela, LB. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

También, evaluamos el crecimiento y la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800 y 1/600 (Figura 17). El crecimiento de las cepas tratadas con las diferentes diluciones de citronela fue similar al de la cepa sin tratamiento o la cepa con el control de elución (LB) (Figura 17A), mientras que la expresión de *rpsL-lacZ* fue similar en todos los tratamientos con citronela y el control de elución (LB) (Figura 17B). Estos resultados indican que el extracto de citronela a las diluciones de 1/1,200, 1/800 y 1/600, no afecta la expresión de *rpsL*.

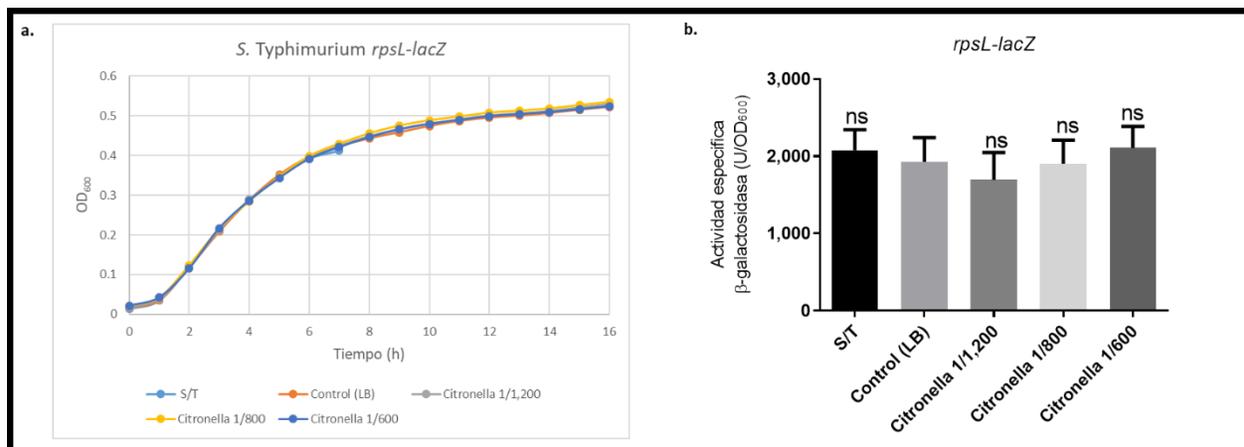


Figura 17.- La citronela no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800 y 1/600, así como en presencia del control de elución de la citronela, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB

en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800 y 1/600, así como en presencia del control de elución de la citronela, LB. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns; no significativo.

7.1.4 Efecto del Mega sobre la expresión de *invF-lacZ*

Para determinar si el extracto de planta gobernadora (Mega) tiene algún efecto sobre la expresión de *invF*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *S. Typhimurium* en microplacas con LB a 37°C durante 16 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 18). Las cepas que fueron tratadas con Mega a las diluciones 1/1,000, 1/800 y 1/500, presentaron un crecimiento similar a la cepa con el control de elución (LB), llegando a una OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.6 (Figura 18A). La expresión de *invF-lacZ* se incrementó 1.7 veces en presencia de la dilución 1/500 de Mega (Figura 18B). Nuestros resultados indican que el Mega a la dilución de 1/500, incrementa la expresión de *invF*.

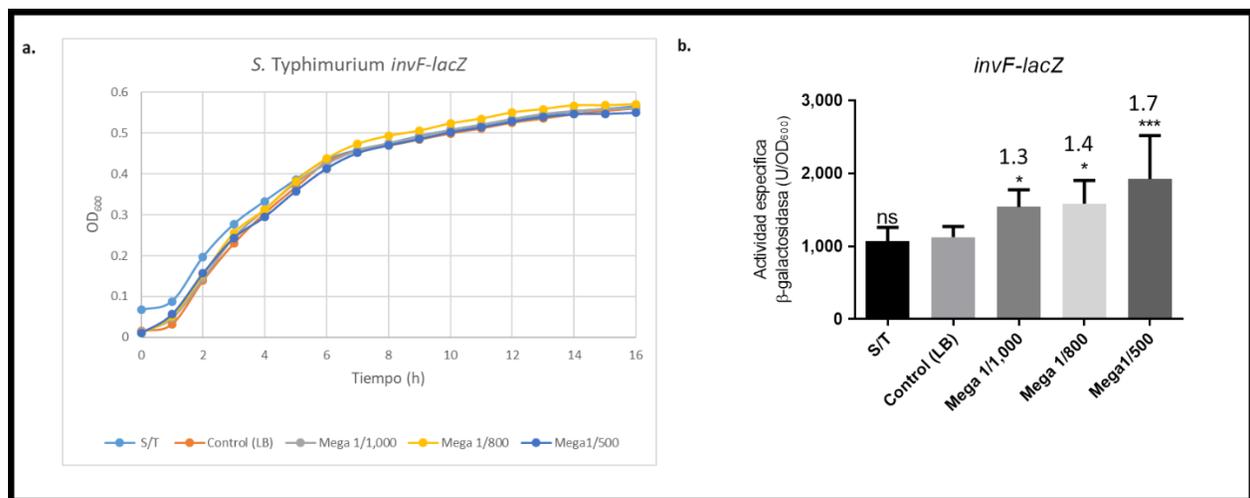


Figura 18.- El Mega incrementa la expresión de *invF*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *invF-lacZ*, contenida en el plásmido *pinvF-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500, así como en presencia del control de elución de Mega, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *invF-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500 así como en presencia del control de elución del Mega, LB. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. * y ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

También, evaluamos el crecimiento y la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800, y 1/500 (Figura 19). El crecimiento de las cepas tratadas con Mega a las diluciones 1/1,000, 1/800 y 1/500, fue similar al de la cepa sin tratamiento o la cepa con el control de elución (LB), llegando a una OD₆₀₀ aproximada de 0.45 (Figura 19A). En la cepa

tratada con Mega a la dilución 1/500 se incrementó 2.6 veces la expresión de *rpsL-lacZ*, en comparación con el control de elución (Figura 19B). Nuestros resultados indican que el Mega a la dilución de 1/500, incrementa la expresión de *rpsL*.

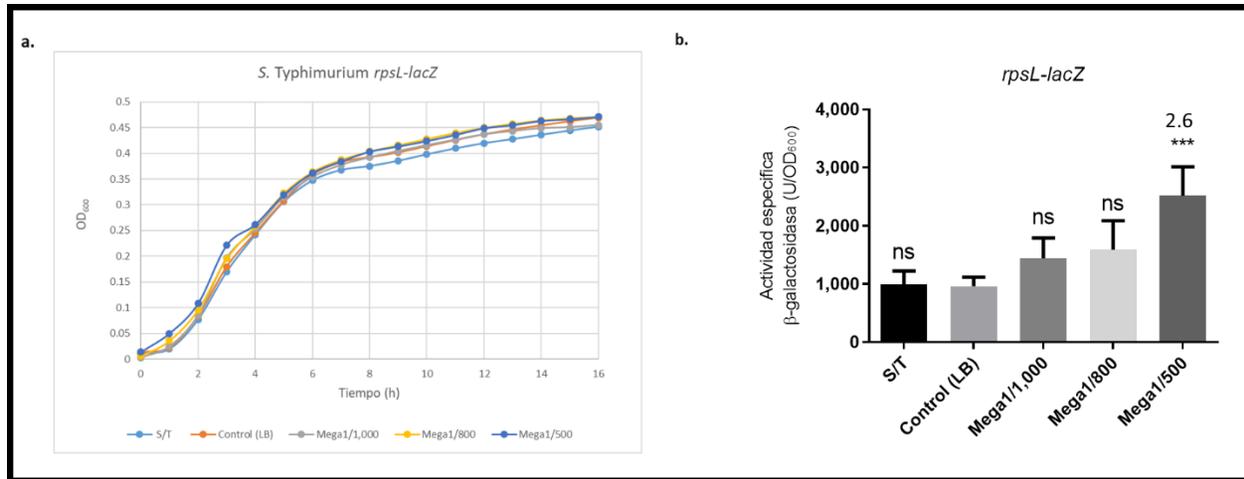


Figura 19.- El Mega incrementa la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500, así como en presencia del control de elución de Mega, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500 así como en presencia del control de elución del Mega, LB. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***. representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.1.5 Efecto del eucalipto sobre la expresión de *invF-lacZ*

Para determinar si el extracto de eucalipto tiene algún efecto sobre la expresión de *invF*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *S. Typhimurium* en microplacas con LB a 37°C durante 16 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 20). Las cepas que fueron tratadas con eucalipto a las diluciones 1/8,000 y 1/5,000, tuvieron un crecimiento similar a la cepa con el control de elución, llegando a una OD₆₀₀ aproximada de 0.6 (Figura 20A). La expresión de *invF-lacZ* fue similar en todos los tratamientos con eucalipto y con el control de elución (Figura 20B). Nuestros resultados indican que el extracto de eucalipto a las diluciones 1/8,000 y 1/5,000, no afectan la expresión de *invF*.

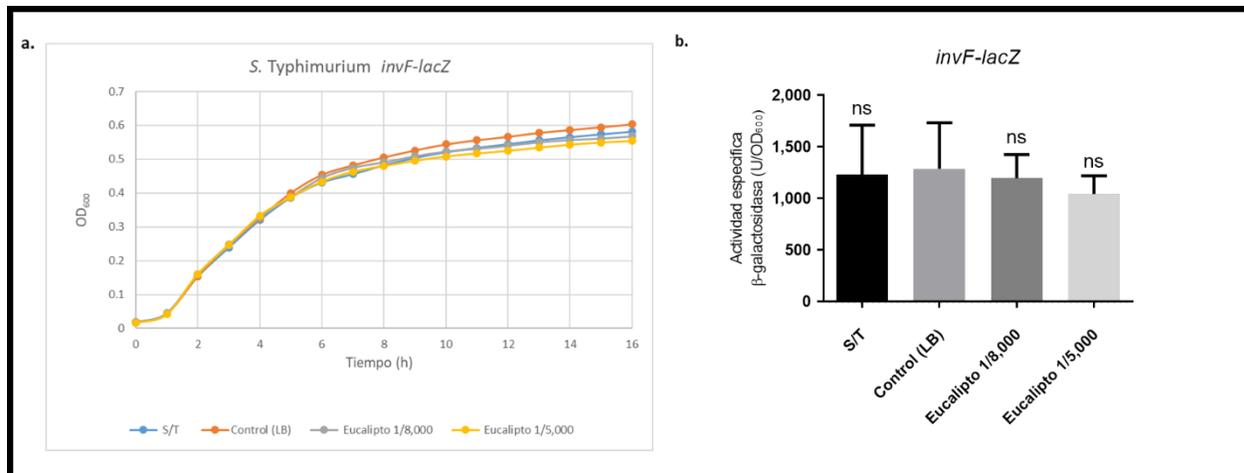


Figura 20.- El eucalipto no afecta la expresión de *invF*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *invF-lacZ*, contenida en el plásmido *pinvF-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000 y 1/5,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *invF-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000 y 1/5,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, LB. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo.

También, evaluamos el crecimiento y la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000 y 1/5,000 (Figura 21). Las cepas tratadas con eucalipto 1/8,000 y 1/5,000 tuvieron un crecimiento similar al control de elución, llegando a una OD₆₀₀ aproximada de 0.5 (Figura 21A). La expresión de *rpsL-lacZ* fue similar entre las cepas tratadas con eucalipto 1/8,000 y 1/5,000, con respecto al control de elución (Figura 21B). Nuestros resultados indican que el extracto de eucalipto a las diluciones 1/8,000 y 1/5,000, no afecta la expresión de *rpsL*.

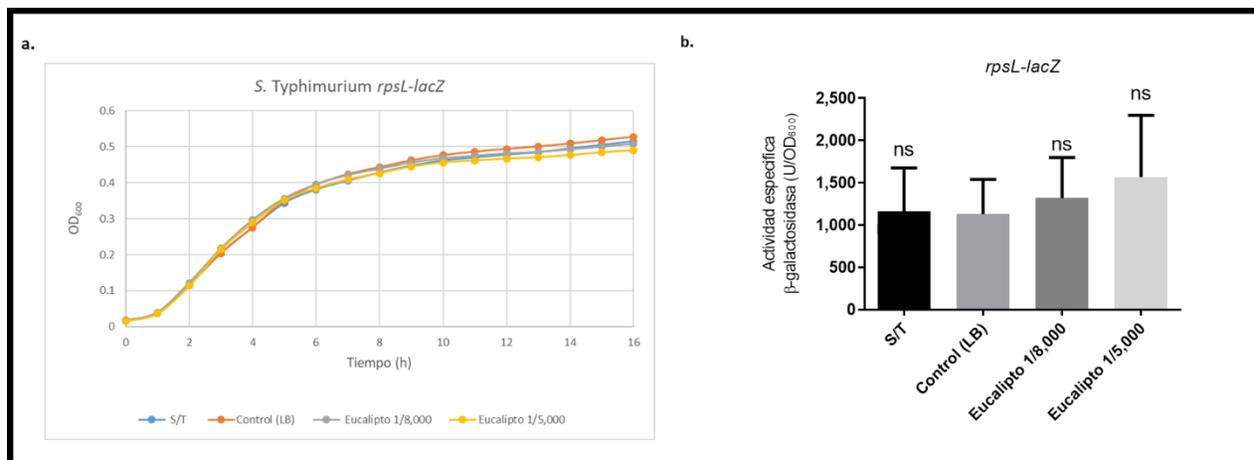


Figura 21.- El eucalipto no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones

de 1/8,000 y 1/5,000 así como en presencia del control de elución del eucalipto, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 16 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000 y 1/5,000, así como en presencia del control de elución del Eucalipto, LB. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 16 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo.

7.2 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de *ssaG-lacZ*

7.2.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de *ssaG-lacZ*

Para determinar si el cinamaldehído tiene un efecto sobre la expresión de los genes de SPI-2, evaluamos la expresión de *ssaG*, el cual codifica para una proteína estructural del SST3-2 (Fábrega & Vila, 2013). Para esto, analizamos la expresión de la fusión transcripcional *ssaG-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia o presencia de concentraciones sub-inhedoras de cinamaldehído. Debido a que los genes de SPI-2 se expresan cuando la bacteria se crece en medios mínimos que cuentan con concentraciones bajas de fosfato y magnesio, condiciones que asemejan la privación nutricional presentes en el ambiente vacuolar de la célula huésped (Deiwick et al., 1999), evaluamos la expresión de *ssaG* después de 24 h de crecimiento en MM-N a 37°C.

Las cepas de *S. Typhimurium* en los diferentes tratamientos alcanzaron una OD₆₀₀ aproximada de 0.2, después de 24 h de crecimiento en MM-N, en presencia de cinamaldehído en concentraciones 0.23 mM y 0.47 mM, así como la cepa sin tratamiento y el control de elución, etanol al 60% (Figura 22A). En presencia de cinamaldehído a 0.23 mM y 0.47 mM, la expresión de *ssaG-lacZ* disminuyó 1.8 y 2.3 veces, respectivamente, en comparación de la cepa con el control de elución (Et60%) (Figura 22B). Nuestros resultados indican que el cinamaldehído a las concentraciones 0.23 mM y 0.47 mM, disminuyen la expresión de *ssaG*.

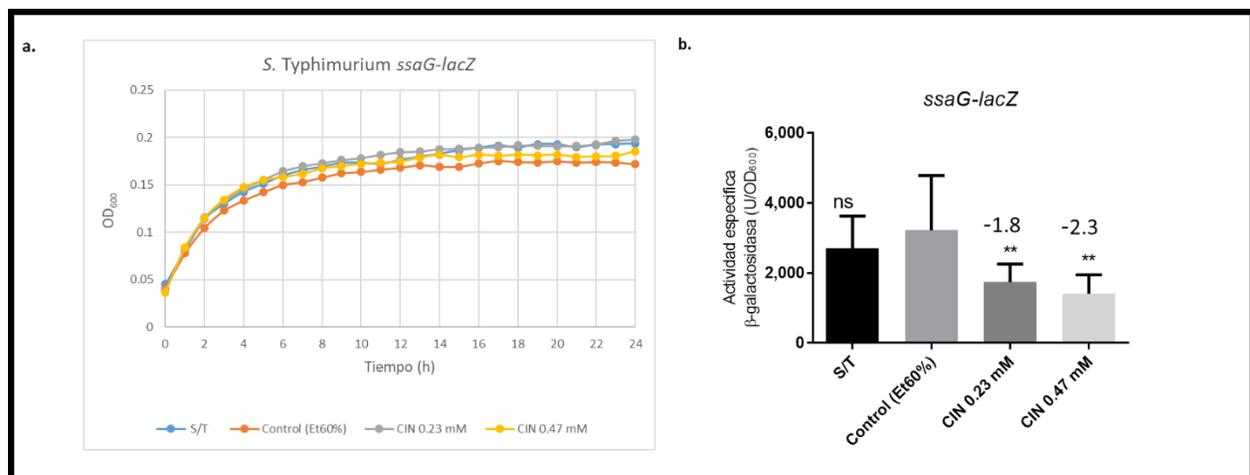


Figura 22.- El cinamaldehído disminuye la expresión de *ssaG*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, contenida en el plásmido *pssaG-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de

cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.23 mM y 0.47 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.23 mM y 0.47 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. **, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.01$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

Para comprobar que el efecto del cinamaldehído no fuera solamente sobre genes de virulencia como *ssaG*, también se evaluó la expresión de *rpsL-lacZ* en la cepa de *S. Typhimurium* WT, en ausencia o presencia de cinamaldehído (Figura 23). El crecimiento fue similar entre los tratamientos con cinamaldehído 0.23 mM y 0.47 mM (OD_{600} de 0.18, aproximadamente), con respecto a la cepa con el control de elución (Et60%) (Figura 23A). La expresión de *rpsL-lacZ* a las concentraciones de cinamaldehído 0.23 mM y 0.47 mM fue similar a la cepa con el control de elución (Et60%) (Figura 23B). Nuestros resultados indican que el cinamaldehído a las concentraciones 0.23 mM y 0.47 mM, no afectan la expresión de *rpsL*.

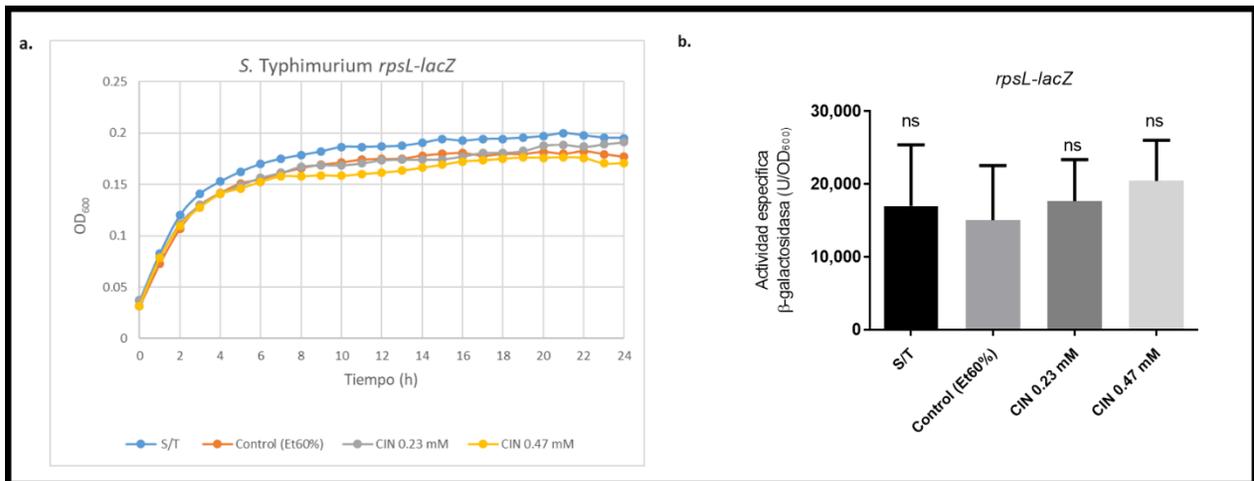


Figura 23.- El cinamaldehído no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.23 mM y 0.47 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.23 mM y 0.47 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo.

7.2.2 Efecto del CinnacAr sobre la expresión de *ssaG-lacZ*

Para determinar si el extracto de canela (CinnacAr) tiene efecto sobre la expresión de *ssaG*, primero evaluamos que las concentraciones seleccionadas no afectarían el crecimiento. Se observó que las cepas tratadas con CinnacAr 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, tuvieron un crecimiento similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución

(H₂O) (OD₆₀₀ de 0.25, aproximadamente) (Figura 24A). Por otra parte, la expresión de *ssaG-lacZ* disminuyó 1.6 veces en presencia CinnacAr a la concentración de 47.43 mg/L, en comparación de la cepa con el control de elución (Figura 24B). Nuestros resultados indican que el CinnacAr a la concentración de 47.43mg/L, disminuye la expresión de *ssaG*.

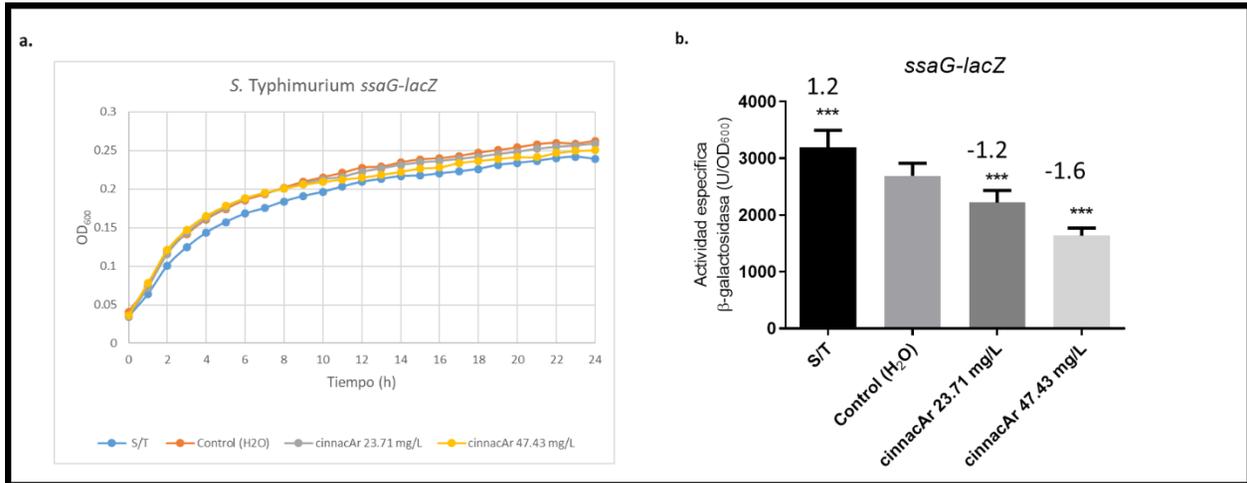


Figura 24.- El CinnacAr disminuye la expresión de *ssaG*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, contenida en el plásmido *pssaG-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, agua (H₂O). Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, agua (H₂O). La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces.

También, evaluamos el crecimiento y la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L (Figura 25). Las cepas tratadas con CinnacAr 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, crecieron de manera similar a la cepa con el control de elución (OD₆₀₀ de 0.25 aproximadamente) (Figura 25A). La expresión de *rpsL-lacZ* fue similar en las cepas tratadas con CinnacAr a 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, con respecto al control de elución (Figura 25B). Nuestros resultados indican que el CinnacAr, a las concentraciones de 23.71 mg/L y 47.43 mg/L, no afecta la expresión de *rpsL*.

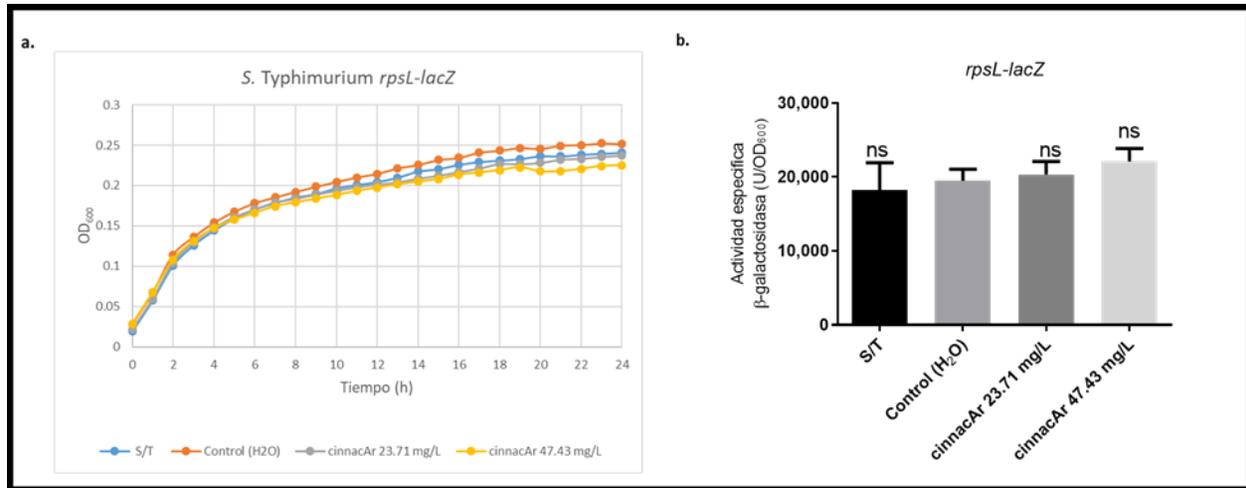


Figura 25.- El CinnacAr no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, agua (H₂O). Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de CinnacAr en concentraciones de 23.71 y 47.43 mg/L, así como en presencia del control de elución del CinnacAr, agua H₂O. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo

7.2.3 Efecto de la citronela sobre la expresión de *ssaG-lacZ*

Asimismo, evaluamos el efecto de la citronela sobre la expresión de *ssaG-lacZ* (Figura 26). Para confirmar que las diluciones seleccionadas no afectarían el crecimiento, se monitoreó el crecimiento en microplacas durante 24 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 26). El crecimiento de las cepas tratadas a las diluciones de citronela 1/1,000, 1/800 y 1/500, fue similar al de la cepa con el control de elución (MM-N), llegando a una OD₆₀₀ entre 0.22 y 0.25 a las 24h (Figura 26A). Además, la expresión de *ssaG-lacZ* fue similar en las cepas tratadas con citronela 1/1,000, 1/800, 1/500, la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (MM-N) (Figura 26B). Estos resultados indican que el tratamiento con las diluciones de citronela 1/1,000, 1/800 y 1/500, no afectan la expresión de *ssaG*.

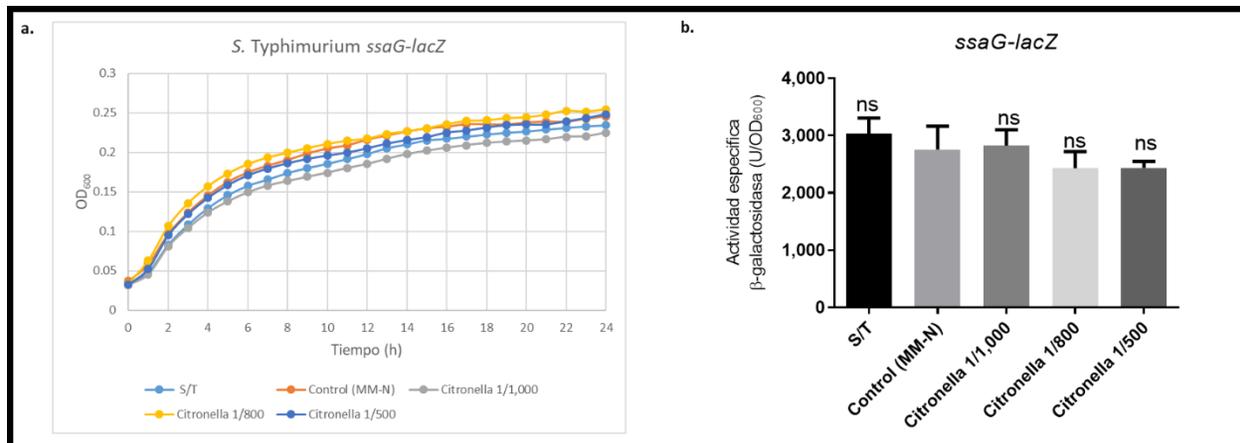


Figura 26.- La citronela no afecta la expresión de *ssaG*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, contenida en el plásmido *psaG-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500, así como en presencia del control de elución de la citronela, MM-N. Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500, así como en presencia del control de elución de la citronela, MM-N. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo.

El crecimiento de la cepa de *S. Typhimurium* que contiene la fusión *rpsL-lacZ* tratada con las diluciones de citronela 1/1,000, 1/800 y 1/500, presentaron un crecimiento similar a la cepa con el control de elución (MM-N), alcanzando una OD₆₀₀ aproximada de 0.25 (Figura 27A). La expresión de *rpsL-lacZ* fue similar en las cepas tratadas con citronela a 1/1,000, 1/800, 1/500, la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (MM-N) (Figura 27B). Estos resultados indican que el tratamiento con las diluciones de citronela 1/1,000, 1/800 y 1/500, no tienen efecto sobre la expresión de *rpsL*.

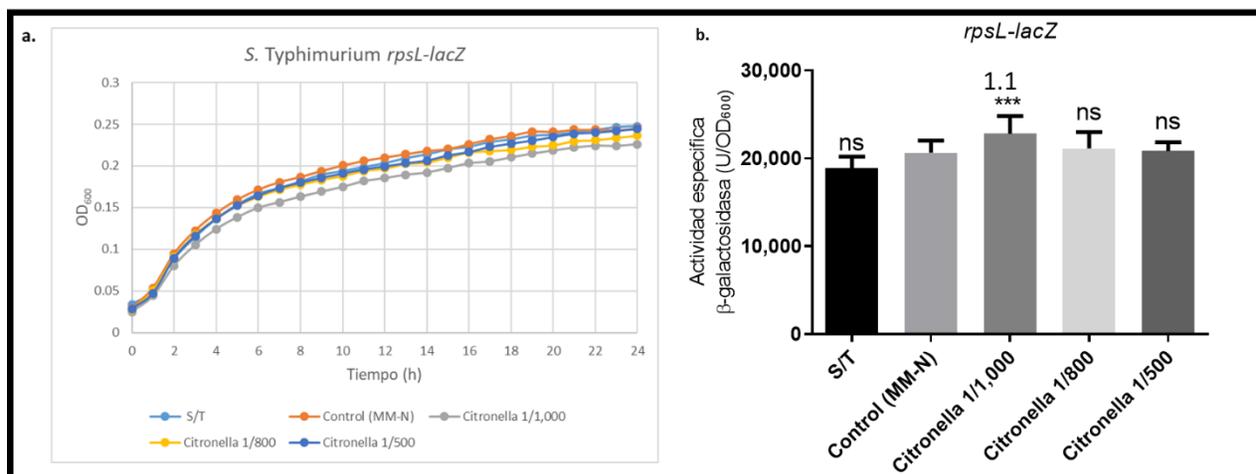


Figura 27.- La citronela no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500, así como en presencia del control de elución de la citronela, MM-N. Las cepas fueron crecidas en medio

MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,000, 1/800 y 1/500, así como en presencia del control de elución de la citronela, MM-N. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.2.4 Efecto del eucalipto sobre la expresión de *ssaG-lacZ*

Para determinar si el extracto de eucalipto tiene efecto sobre la expresión de *ssaG*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *S. Typhimurium* en microplacas con MM-N a 37°C durante 24 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 28). Las cepas tratadas con eucalipto a las diluciones 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000 presentaron un crecimiento similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (MM-N), llegando a una OD₆₀₀ de 0.25 al final de la cinética (Figura 28A). La expresión de *ssaG-lacZ* fue similar entre los tratamientos con eucalipto 1/8,000, 1/5,000, 1/1,000, la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (MM-N) (Figura 28B). Nuestros resultados indican que el eucalipto a las diluciones probadas 1/8,000, 1/5,000, 1/1,000, no afectan la expresión de *ssaG*.

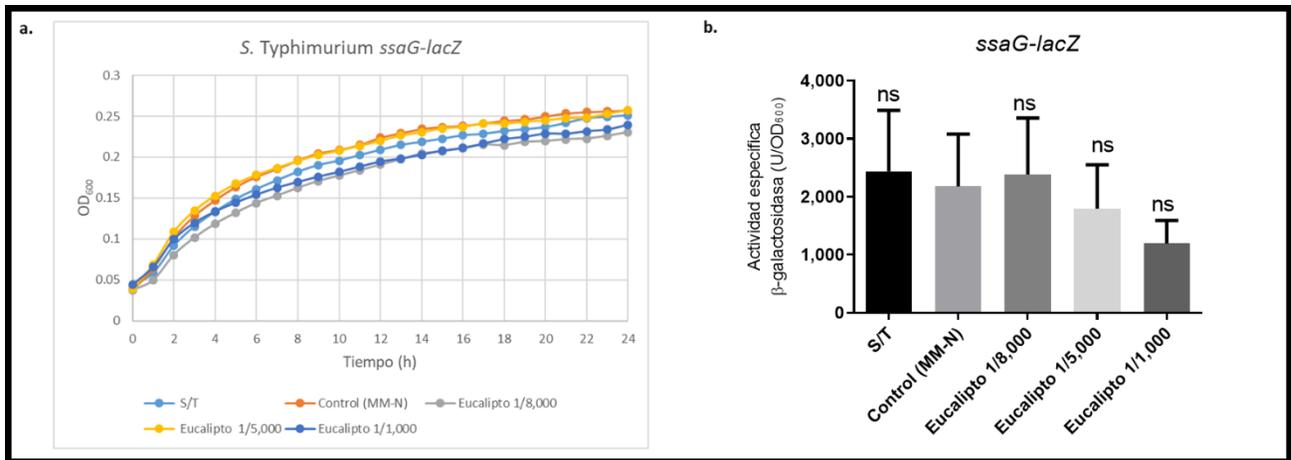


Figura 28.- El eucalipto no afecta la expresión de *ssaG*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, contenida en el plásmido *pssaG-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, MM-N. Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *ssaG-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, MM-N. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns; no significativo.

También, evaluamos el crecimiento y la expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* en presencia de eucalipto en las diluciones 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000 (Figura 29). Las cepas tratadas con eucalipto 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000

crecieron de manera similar a la cepa con el control de elución (OD_{600} entre 0.2 y 0.25) (Figura 29A). La expresión de *rpsL-lacZ* en las cepas tratadas con eucalipto 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000, fue similar a la cepa con el control de elución (Figura 29B). Nuestros resultados indican que las diluciones de eucalipto 1/8,000, 1/5,000, 1/1,000, no afectan la expresión de *rpsL*.

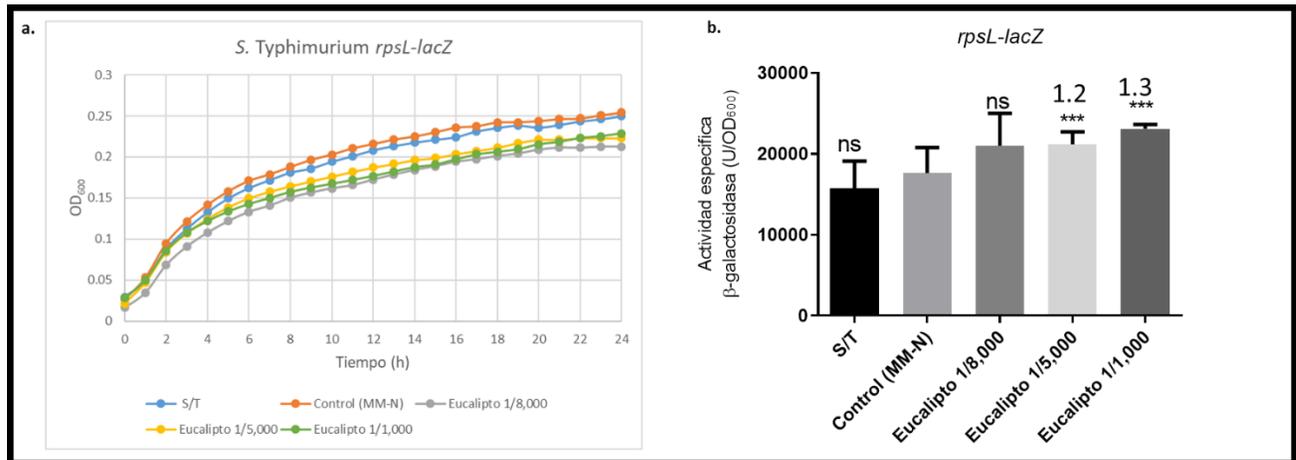


Figura 29.- El eucalipto no afecta la expresión de *rpsL*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, contenida en el plásmido *prpsL-lacZ*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, MM-N. Las cepas fueron crecidas en medio MM-N en microplaca a 37°C durante 24 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rpsL-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/8,000, 1/5,000 y 1/1,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, MM-N. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a las 24 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo.

7.3 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de *exsA-lux*

7.3.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de *exsA-lux*

Para determinar si el cinamaldehído tiene un efecto sobre la expresión de los genes del SST3 de *P. aeruginosa*, evaluamos la expresión de *exsA*, el cual codifica para el regulador transcripcional ExsA que activa la expresión estos genes (Diaz et al., 2011). Para esto, analizamos la expresión de la fusión transcripcional *exsA-lux* en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia o presencia de concentraciones sub-inhedoras de cinamaldehído. Para confirmar que las concentraciones utilizadas no afectaran el crecimiento, se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h.

Las cepas tratadas a las concentraciones de cinamaldehído 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, presentaron un crecimiento similar al de la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (OD_{600} de 0.5, aproximadamente) (Figura 30A). La expresión de *exsA-lux* fue similar entre los tratamientos con cinamaldehído a las concentraciones de

0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM, 2.35 mM y la cepa con el control de elución (Figura 30B). Estos resultados indican que el cinamaldehído, a las concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM, 2.35 mM, no afecta la expresión de *exsA*.

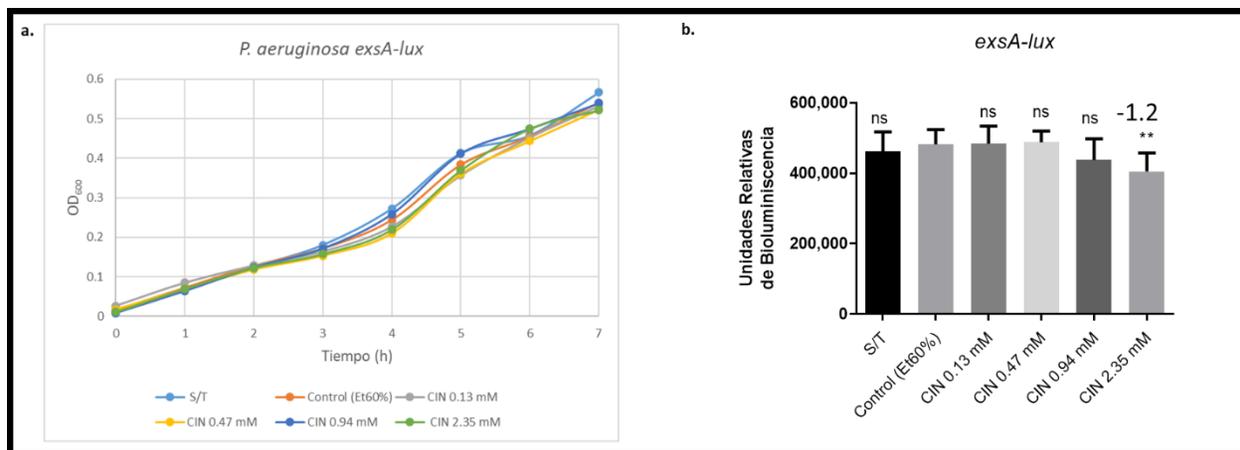


Figura 30.- El cinamaldehído no afecta la expresión de *exsA*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *exsA-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *exsA-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. **, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.01$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.3.2 Efecto de la citronela sobre la expresión de *exsA-lux*

Para determinar si la citronela tiene efecto sobre la expresión de *exsA*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Se analizó el crecimiento y la expresión de *exsA-lux* en la cepa WT de *P. aeruginosa* en presencia del extracto de citronela a diluciones de 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400 (Figura 31). Se observó que las cepas tratadas con citronela 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400 tuvieron un crecimiento similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución, llegando a una OD₆₀₀ de 0.5 aproximadamente (Figura 31A). La expresión de *exsA-lux* en presencia de citronela a las diluciones 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400 fue similar a la cepa tratada con el control de elución (Figura 31B). Estos resultados indican que la citronela, a las diluciones 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, no afecta la expresión de *exsA*.

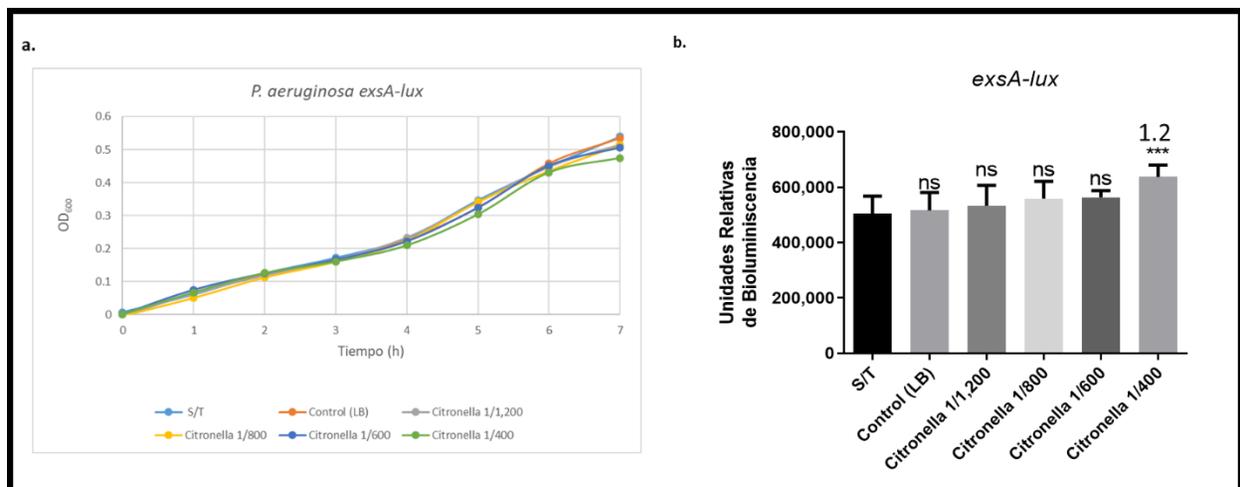


Figura 31.- La citronela no afecta la expresión de *exsA*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *exsA-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, así como en presencia del control de elución de citronela, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *exsA-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, así como en presencia del control de elución de citronela, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.3.3 Efecto del Mega sobre la expresión de *exsA-lux*

Para determinar si el extracto de planta gobernadora (Mega) tiene algún efecto sobre la expresión de *exsA*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectarían el crecimiento. El crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de Mega a las diluciones 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200 se evaluó en microplacas con LB a 37°C durante 7 h (Figura 32). Las cepas tratadas con Mega a las diluciones de 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200, crecieron de manera similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (LB) (Figura 32A). La expresión de *exsA-lux* en presencia de las diluciones de Mega utilizadas fue similar a la cepa con el control de elución (Figura 32B). Estos resultados indican que el Mega, a las diluciones de 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200, no afecta la expresión de *exsA*.

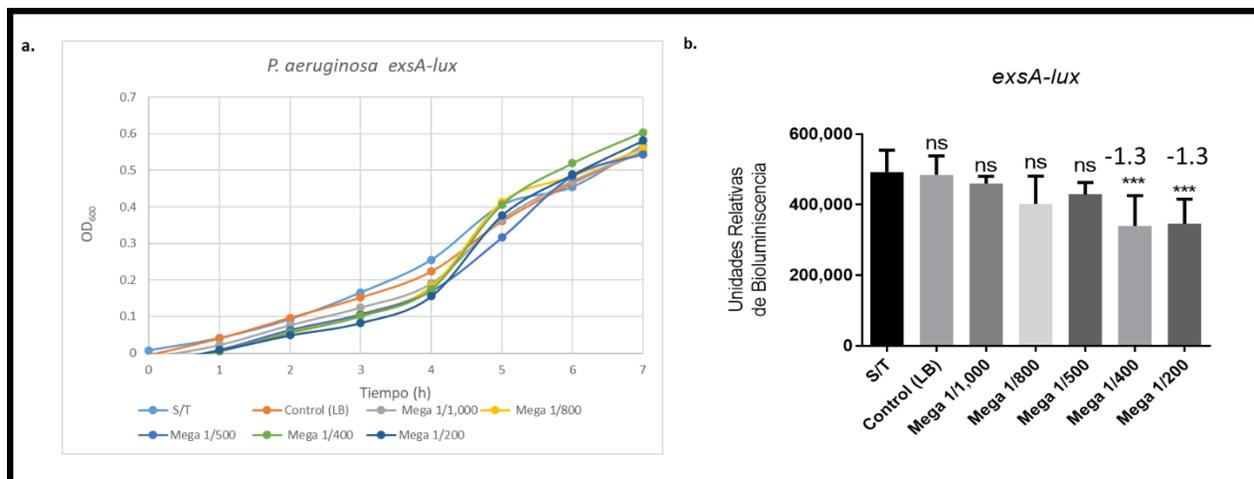


Figura 32.- El Mega no afecta la expresión de *exsA*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *exsA-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200, así como en presencia del control de elución del Mega, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *exsA-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200, así como en presencia del control de elución del Mega, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.3.4 Efecto del eucalipto sobre la expresión de *exsA-lux*

Para determinar si el extracto de eucalipto tiene efecto sobre la expresión de *exsA*, evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectan el crecimiento. Se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h, en presencia del extracto de eucalipto a las diluciones de 1/1,500, 1/1,000 y 1/500 (Figura 33). Las cepas tratadas a las diluciones de eucalipto 1/1,500, 1/1,000 y 1/500, crecieron de manera similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (OD₆₀₀ de 0.5, aproximadamente) (Figura 33A). La expresión de *exsA-lux* no se afectó en ninguno de los tratamientos probados (Figura 33B). Nuestros resultados indican que el extracto de eucalipto, a las diluciones de 1/1,500, 1/1,000 y 1/500, no afecta la expresión de *exsA*.

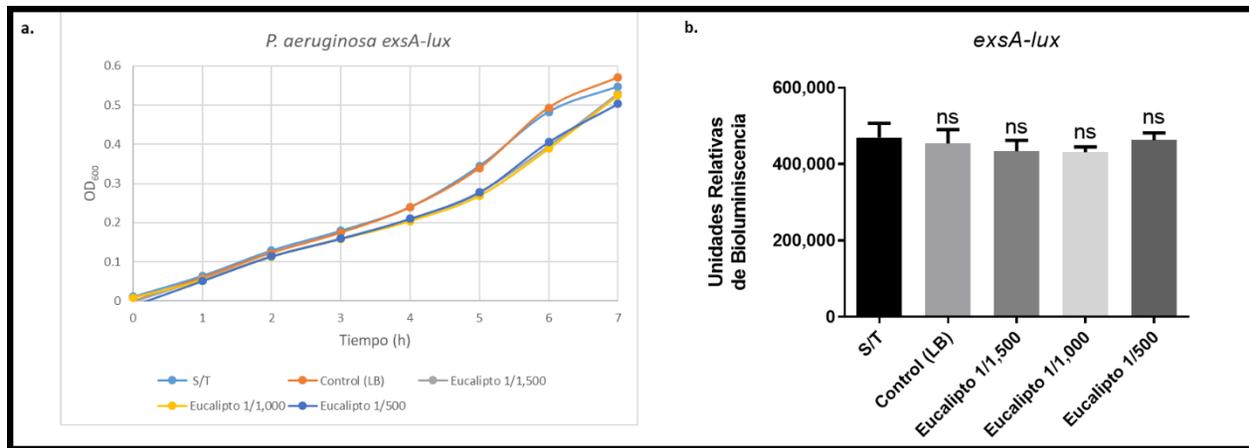


Figura 33.- El eucalypto no afecta la expresión de *exsA*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *exsA-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalypto en diluciones de 1/1,500, 1/1,000 y 1/500, así como en presencia del control de elución del eucalypto, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *exsA-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalypto en diluciones de 1/1,500, 1/1,000 y 1/500, así como en presencia del control de elución del eucalypto, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ns, no significativo.

7.3.5 Efecto del Citrobio sobre la expresión de *exsA-lux*

Para determinar si el extracto de cítricos (Citrobio) tiene efecto sobre la expresión de *exsA*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectarían el crecimiento. El crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de Citrobio a diluciones de 1/16,000 y 1/5,000 se evaluó en microplacas con LB a 37°C durante 7 h (Figura 34). En presencia de Citrobio a diluciones de 1/16,000 y 1/5,000, el crecimiento de las cepas fue similar al de la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (LB) (OD₆₀₀ de 0.5, aproximadamente) (Figura 34A). La expresión de *exsA* en presencia de Citrobio a las diluciones de 1/16,000 y 1/5,000, fue similar a la cepa con el control de elución (Figura 34B). Estos resultados indican que el Citrobio en las diluciones de 1/16,000 y 1/5,000, no afectan la expresión de *exsA*.

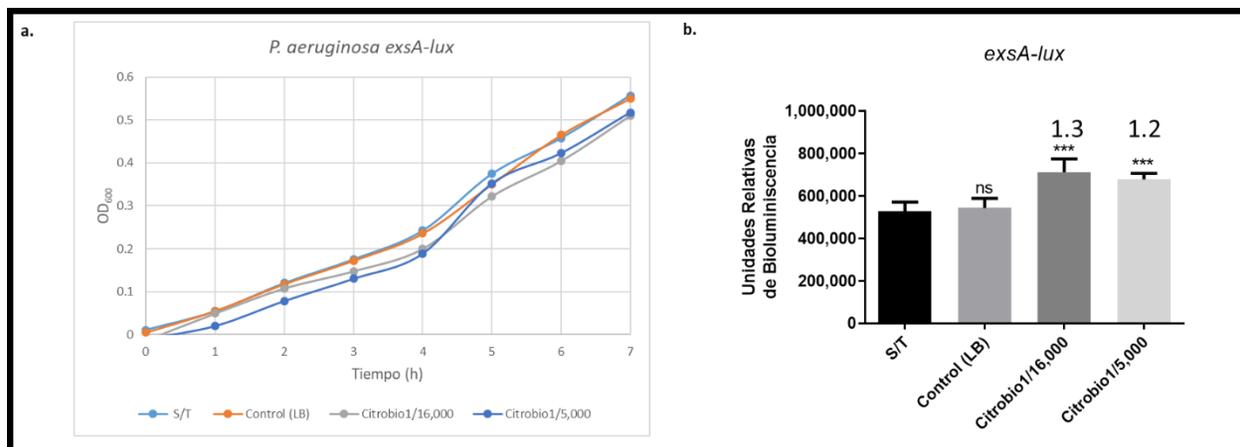


Figura 34.- El citrobio no afecta la expresión de *exsA*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *exsA-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de citrobio en diluciones de 1/16,000 y 1/5,000, así como en presencia del control de elución del citrobio, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *exsA-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de citrobio en diluciones 1/16,000 y 1/5,000, así como en presencia del control de elución del citrobio, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.4 Efecto de los extractos o compuestos sobre la expresión de *rhIR-lux*

7.4.1 Efecto del cinamaldehído sobre la expresión de *rhIR-lux*

Para determinar si el cinamaldehído tiene un efecto sobre la expresión de los genes de quorum sensing de *P. aeruginosa*, evaluamos la expresión de *rhIR*, el cual codifica para el regulador transcripcional RhIR del sistema *rhl* (Jiménez *et al.*, 2012). Para esto, analizamos la expresión de la fusión transcripcional *rhIR-lux* en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia o presencia de cinamaldehído. Para confirmar que las concentraciones utilizadas no afectarían el crecimiento, se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h, en presencia de diferentes concentraciones de este compuesto (Figura 35).

Las cepas tratadas a las concentraciones de cinamaldehído 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, presentaron un crecimiento similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (OD₆₀₀ de 0.55, aproximadamente) (Figura 35A). La expresión de *rhIR-lux* disminuyó 2 veces en presencia de cinamaldehído a las concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, con respecto a la cepa con el control de elución (Figura 35B). Nuestros resultados indican que la presencia de cinamaldehído a las concentraciones 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, disminuyen la expresión de *rhIR*.

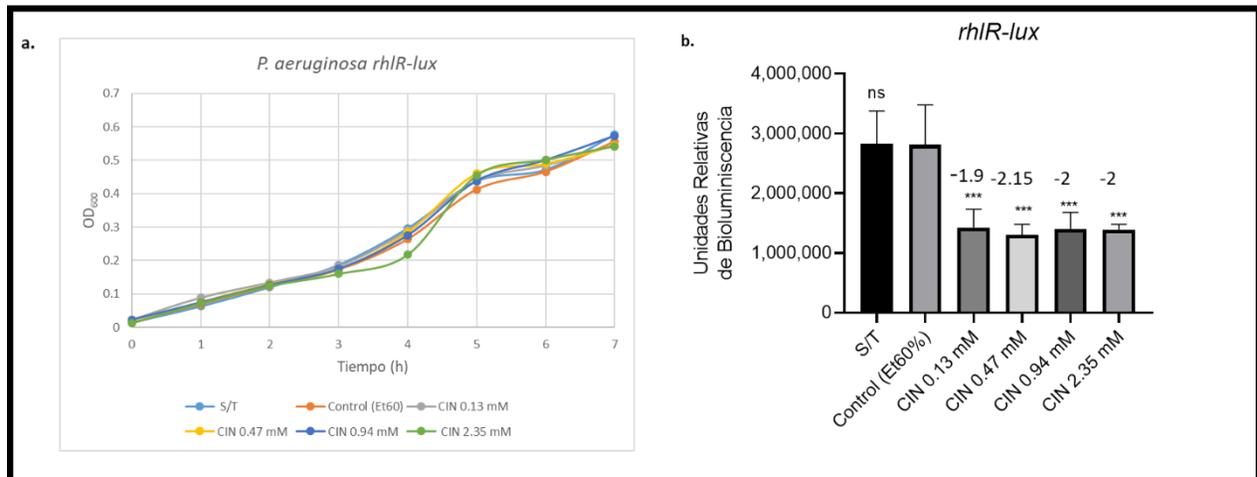


Figura 35.- El cinamaldehído disminuye la expresión de *rhIR*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *rhIR-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rhIR-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de cinamaldehído (CIN) en concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM, así como en presencia del control de elución del cinamaldehído, etanol al 60% (Et60). Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.4.2 Efecto de la citronela sobre la expresión de *rhIR-lux*

Para determinar si la citronela tiene efecto sobre la expresión de *rhIR*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 36). Las cepas tratadas a las diluciones de citronela 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, presentaron un crecimiento similar entre las cepas sin tratamiento y la cepa con el control de elución, llegando a una OD₆₀₀ de 0.5 (Figura 36A). La expresión de *rhIR-lux* disminuyó alrededor de 2 veces en las cepas tratadas a las diluciones de citronela 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, con respecto a la cepa con el control de elución (Figura 36B). Nuestros resultados indican que la citronela a las diluciones 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, disminuyen la expresión de *rhIR*.

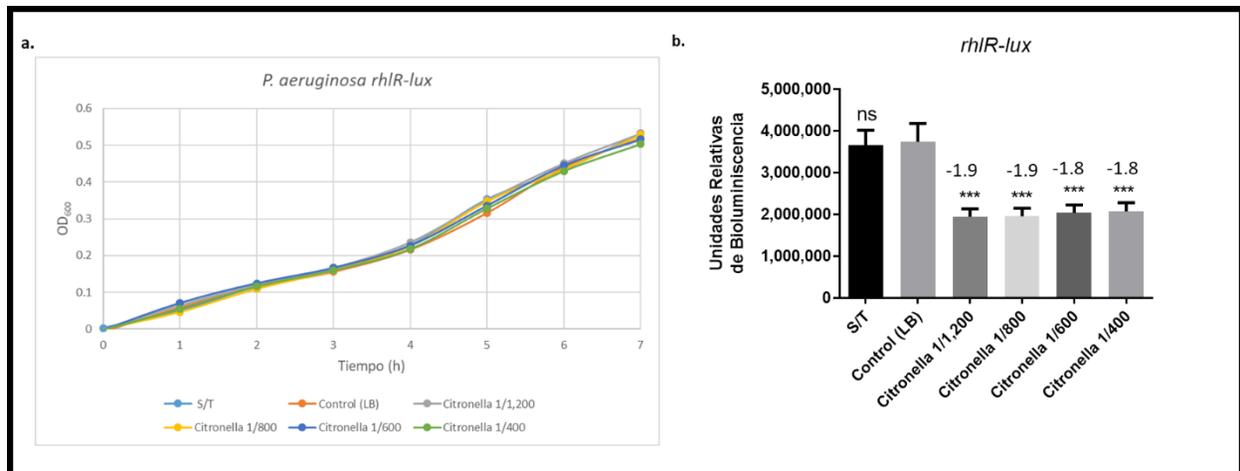


Figura 36.- La citronela disminuye la expresión de *rhIR*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *rhIR-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400, así como en presencia del control de elución del citronela, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rhIR-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de citronela en diluciones de 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400 así como en presencia del control de elución del citronela, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.4.3 Efecto del Mega sobre la expresión de *rhIR-lux*

Para determinar si el extracto de planta gobernadora (Mega) tiene efecto sobre la expresión de *rhIR*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectarían el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 37). Las cepas tratadas a las diluciones de Mega 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200, presentaron un crecimiento similar entre las cepas sin tratamiento y la cepa con el control de elución, llegando a una OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.6 (Figura 37A). La expresión de *rhIR-lux* disminuyó alrededor de 2 veces en presencia de Mega 1/500, 1/400 y 1/200, en comparación de la cepa con el control de elución (Figura 37B). Nuestros resultados indican que el Mega a las diluciones 1/500, 1/400 y 1/200, disminuyen la expresión de *rhIR*.

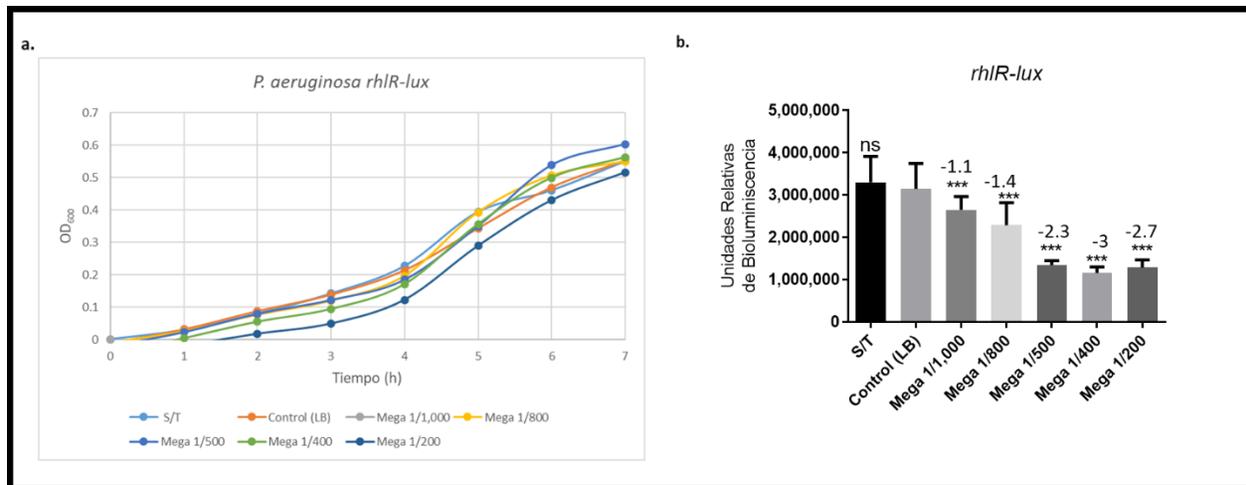


Figura 37.- El Mega disminuye la expresión de *rhIR*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *rhIR-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200 así como en presencia del control de elución del Mega, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rhIR-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de Mega en diluciones de 1/1,000, 1/800, 1/500, 1/400 y 1/200 así como en presencia del control de elución de Mega, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.4.4 Efecto del eucalipto sobre la expresión de *rhIR-lux*

Para determinar si el extracto de eucalipto tiene efecto sobre la expresión de *rhIR*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 38). Las cepas tratadas con eucalipto a las diluciones 1/1,500 y 1/1,000 presentaron un crecimiento similar a la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución (Figura 38A). La expresión de *rhIR-lux* disminuyó 2 veces en presencia de eucalipto a las diluciones 1/1,500 y 1/1,000, con respecto a la cepa con el control de elución (Figura 38B). Nuestros resultados indican que el eucalipto a las diluciones de 1/1,500 y 1/1,000, disminuyen la expresión de *rhIR*.

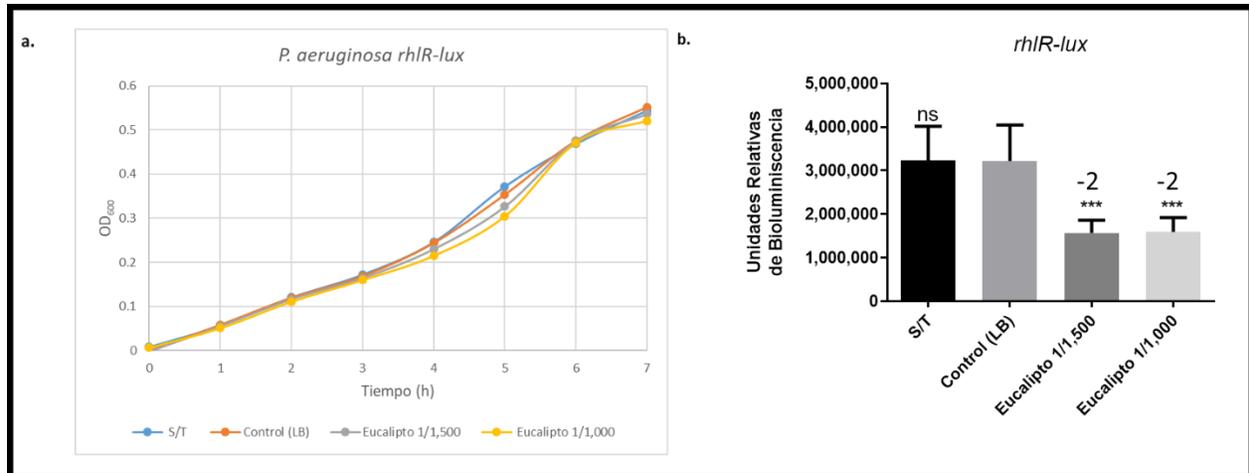


Figura 38.- El eucalipto disminuye la expresión de *rhIR*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *rhIR-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/1,500 y 1/1,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rhIR-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de eucalipto en diluciones de 1/1,500 y 1/1,000, así como en presencia del control de elución del eucalipto, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa con un valor de $p < 0.001$, con respecto a la cepa tratada con el control de elución; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

7.4.5 Efecto del Citrobio sobre la expresión de *rhIR-lux*

Para determinar si el extracto de cítricos (Citrobio) tiene efecto sobre la expresión de *rhIR*, primero evaluamos que las diluciones seleccionadas no afectaran el crecimiento. Para esto, se monitoreó el crecimiento de *P. aeruginosa* en microplacas con LB a 37°C durante 7 h, en presencia de diferentes diluciones de este extracto (Figura 39). Las cepas tratadas a las diluciones 1/16,000 y 1/5,000 presentaron un crecimiento similar al de la cepa sin tratamiento y la cepa con el control de elución, llegando a una OD₆₀₀ de 0.5 (Figura 39A). La expresión de *rhIR-lux* disminuyó 1.5 veces en presencia de Citrobio 1/5,000, en comparación de la cepa con el control de elución (Figura 39B). Nuestros resultados indican que el Citrobio una dilución de 1/5,000, disminuye la expresión de *rhIR*.

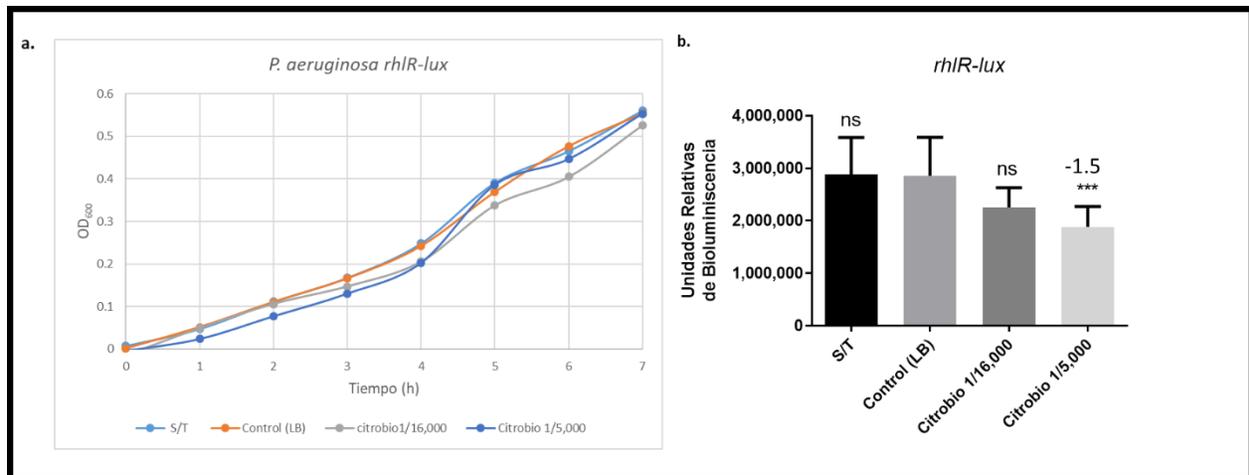


Figura 39.- El *Citrobio* disminuye la expresión de *rhIR*. **(a)** Cinética de crecimiento de la cepa WT de *P. aeruginosa* que contiene la fusión transcripcional *rhIR-lux*, en ausencia (S/T) o en presencia de *Citrobio* en diluciones de 1/16,000 y 1/5,000 así como en presencia del control de elución del *Citrobio*, LB. Las cepas fueron crecidas en medio LB en microplaca a 37°C durante 7 h. **(b)** La expresión de la fusión transcripcional *rhIR-lux*, se determinó en la cepa WT de *P. aeruginosa*, en ausencia (S/T) o en presencia de *Citrobio* en diluciones de 1/16,000 y 1/5,000, así como en presencia del control de elución del *Citrobio*, LB. Las unidades relativas de bioluminiscencia se determinaron a las 7 h del crecimiento en microplaca. Los datos graficados representan los promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. ***, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.001$; además, se consideró un cambio cuando la expresión se afectó en 1.5 veces. ns, no significativo.

VIII. Discusión

La resistencia a los antimicrobianos ha surgido como un gran desafío para la medicina moderna y la salud pública. El hecho alarmante es que tarde o temprano se producirá resistencia a cualquier antibiótico nuevo. La principal ventaja de apuntar a los mecanismos de virulencia es que existe una baja posibilidad de que se desarrollen mecanismos de resistencia. En este sentido, las plantas representan una alternativa prometedora para la búsqueda de diferentes actividades antimicrobianas, debido a la producción de diferentes metabolitos secundarios que les permiten contender con diferentes estrés del medio donde se encuentran.

En este estudio, evaluamos la actividad anti-virulencia de diferentes extractos comerciales y del compuesto cinamaldehído, contra cepas de *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*. En particular, se evaluaron los extractos de canela (CinnacAr), gobernadora (Mega), eucalipto, citronela y de cítricos (Citrobio), mediante el uso de fusiones transcripcionales a los genes de virulencia *invF* y *ssaG* de *S. Typhimurium* y *rhIR* y *exsA* de *P. aeruginosa*. Debido a que los extractos utilizados en este trabajo son de origen comercial (CinnacAr, citrobio y mega) o artesanal (citronela y eucalipto), desconocemos la parte de la planta y los métodos de extracción utilizados para su obtención, por lo que no pudimos obtener la concentración de estos y utilizamos diluciones para la mayoría de ellos.

En el caso del extracto de canela (CinnacAr), la expresión de *invF* y de *ssaG* disminuyó en la cepa de *S. Typhimurium* tratada con este extracto (Figura 14 y 24), mientras que no se afectó la expresión de *rpsL* (Figura 15 y 25). Probablemente, el efecto anti-virulencia observado del CinnacAr sobre la expresión de *invF* y *ssaG* sea debido al cinamaldehído, el cual es uno de los componentes principales del extracto de canela, además del eugenol (Chericoni et al., 2005). Se ha reportado que el cinamaldehído y el eugenol afectan la secreción de proteínas efectoras del SST3-1, a través de inhibir la expresión de algunos reguladores de SPI-1 como HilA, InvF, HilC y HilD (efecto anti-virulencia), y, a su vez, el cinamaldehído incrementa la supervivencia de ratones infectados con *Salmonella* (Liu et al., 2019; Zhao et al., 2022). Debido a esto, evaluamos el efecto anti-virulencia del cinamaldehído, donde observamos que la expresión de *invF* y de *ssaG* disminuyó en la cepa tratada con este compuesto (Figura 12 y 22). El efecto del cinamaldehído sobre la expresión de *invF* y *ssaG* fue mayor que cuando se evaluó el CinnacAr, probablemente debido a que, al ser un extracto total, el cinamaldehído se encuentra en menor concentración; sin embargo, la expresión de *rpsL* también disminuyó en la cepa crecida en LB en presencia de este compuesto (Figura 13). Que el efecto del cinamaldehído se observara también sobre la expresión de *rpsL* sugiere que este compuesto podría tener un efecto en la expresión de otros genes de *Salmonella*. Con respecto a esto, Kollanoor y colaboradores evaluaron el efecto en el transcriptoma de *Salmonella* en presencia de

cinamaldehído y eugenol (Kollanoor et al., 2017). En este estudio encontraron que la presencia de ambos compuestos afecta la expresión de genes relacionados a diversas funciones como virulencia, colonización, metabolismo, composición de membranas y sistemas de transporte, por lo que el cinamaldehído podría tener un efecto sobre la expresión global de *Salmonella*, y por ello observamos que también se afectó la expresión de *rpsL*. En *P. aeruginosa* se ha descrito que el cinamaldehído es capaz de inhibir la formación de biopelícula, así como la erradicación de biopelículas pre-formadas (Topa et al., 2020; Torres., 2021); también, actúa inhibiendo la expresión de genes del quorum sensing, como *lasB*, *rhIA* y *pqsA* y presenta sinergia en la disminución del quorum sensing y en la formación y erradicación de biopelículas en combinación de antibióticos como colistina y trobamicina (Topa et al., 2020). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente, ya que la expresión de *rhIR* disminuyó en presencia de cinamaldehído (Figura 35); sin embargo, la presencia de cinamaldehído no afectó la expresión de *exsA* (Figura 30).

En el caso del extracto de citronela, la expresión de *invF* disminuyó en la cepa de *S. Typhimurium* tratada con este extracto (Figura 16), pero no tuvo efecto sobre la expresión de *ssaG* ni de *rpsL* (Figura 26, 17 y 27). Por otra parte, la expresión de *rhIR*, pero no de *exsA*, disminuyó en la cepa de *P. aeruginosa* tratada con citronela (Figura 36 y 31). Probablemente, el efecto anti-virulencia observado con el extracto de citronela sea debido al metabolito secundario geraniol, uno de los componentes principales de la citronela (Pontes et al., 2019). Además de tener un efecto antibacteriano, el geraniol tiene la capacidad de inhibir la biopelículas de la bacteria *Staphylococcus aureus* (Pontes et al., 2019) y del hongo *Candida albicans* (De Toledo et al., 2016); además, se encontró que inhibe la actividad catalítica del regulador maestro de virulencia, DsbA, en *Shigella sonnei* (Mirza et al., 2018). En un estudio previo en nuestro grupo, se determinó que el extracto de citronela disminuye el mantenimiento de la biopelícula de *P. aeruginosa* (Torres., 2021). Hasta el momento, no se había estudiado el efecto del extracto de citronela sobre la expresión de genes de virulencia de *Salmonella* y *Pseudomonas*; sin embargo, se requieren de más estudios para conocer el mecanismo por el cual actúa.

En el caso del extracto de planta gobernadora (Mega), la expresión de *invF* y *rpsL* se incrementó en la cepa de *S. Typhimurium* en presencia de este extracto (Figura 18 y 19). Que la expresión de *invF* y *rpsL* se incrementara en presencia de Mega, sugiere que la presencia de este extracto afecta la expresión global de *Salmonella*. Aunque las concentraciones/diluciones probadas en este trabajo no afectaron el crecimiento de las bacterias, la presencia de este extracto podría generar una condición de estrés que induzca la expresión de uno o varios genes de *Salmonella*, como el caso de *rpsL* (que codifica para la proteína ribosomal S12) o de *invF* (que codifica para uno de los reguladores de SPI-1). Por otro lado, la expresión de *rhIR*, pero no de *exsA*, disminuyó en la cepa de *P. aeruginosa* tratada con Mega (Figura 37 y 32). Dentro de los metabolitos

secundarios de la planta gobernadora se encuentran los lignanos (como el ácido dihidroguaiarético) y flavonoides (como la tetrametoxiflavona) (Favela-Hernández et al., 2012). Para el ácido dihidroguaiarético se encontró un efecto antibacteriano contra *S. aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* (Favela-Hernández et al., 2012; Clemente-Soto et al., 2014), además, afecta la expresión de genes relacionados a la pared celular, metabolismo, respiración, virulencia y adaptación en *M. tuberculosis* (Clemente-Soto et al., 2014). En contraste, en nuestro grupo encontramos que la presencia de Mega incrementa la formación de biopelícula en la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, quizás debido al estrés inducido por los componentes de este extracto (Torres., 2021). Probablemente estos resultados contradictorios donde el Mega incrementó la formación de biopelícula (Torres., 2021), y disminuyó la expresión de *rhIR* (el cual participa en quorum sensing, proceso que regula la formación de biopelícula) (Este trabajo), sean debido a las diferencias en los experimentos realizados, las cepas y las diluciones utilizadas, así como del medio de cultivo empleado. El mecanismo por el cual el extracto de Mega afecta la expresión de los genes de *Salmonella* y *Pseudomonas* queda por determinarse.

Uno de los metabolitos principales del eucalipto es el 1,8-cineol (eucaliptol), el cual posee actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* (Mekonnen et al., 2016). Además, en un estudio realizado con extractos de cúrcuma, los cuales contienen eucaliptol, demostraron un efecto en la inhibición de la producción de exotoxinas de *L. monocytogenes* y *S. aureus* (efecto anti-virulencia) (Huang et al., 2019). Hasta el momento, no se había estudiado el efecto anti-virulencia del extracto de eucalipto sobre la expresión de genes de virulencia de *Salmonella* y de *Pseudomonas*. En este trabajo, observamos que el eucalipto no afectó la expresión de los genes de *S. Typhimurium*, *invF* (Figura 20) ni de *ssaG* (Figura 28), a las diluciones probadas de este extracto. Es necesario realizar más experimentos donde evaluemos un rango menor de diluciones de este extracto sobre la expresión de los genes de virulencia de *Salmonella*. Por otra parte, la expresión de *rhIR*, pero no de *exsA*, disminuyó en la cepa de *P. aeruginosa* tratada con eucalipto (Figura 38 y 33). Aunque no se había estudiado previamente el efecto del extracto de eucalipto sobre los sistemas de quorum sensing de *Pseudomonas*, nuestro trabajo concuerda con un reporte previo donde se demostró que el extracto de eucalipto inhibe la producción del pigmento violaceína en *Chromobacterium violaceum*, la cual es usada como biomarcador de quorum sensing (Luís et al., 2015), es decir, que el eucalipto tiene un efecto anti-quorum sensing.

En un estudio realizado previamente en nuestro grupo, se determinó que el extracto de cítricos (Citrobio), induce la formación de biopelícula en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Torres., 2021); sin embargo, en este trabajo observamos que la expresión de *rhIR* disminuyó en presencia de Citrobio (Figura 39). Estos resultados parecen ser contradictorios ya que la formación de biopelícula es regulada positivamente a través del

quorum sensing. Sin embargo, esto podría deberse a las diferencias en las metodologías utilizadas para ambos estudios. Por otra parte, la presencia de citrobio no afectó la expresión de *exsA* (Figura 34). Probablemente uno o varios metabolitos secundarios del extracto de cítricos (citrobio) tienen diferentes efectos sobre la expresión de los genes de virulencia de *P. aeruginosa*, por lo que se requieren de más estudios para conocer la identidad de estos compuestos.

Se han realizado estudios de otros extractos o compuestos de plantas sobre la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*. Por ejemplo, la punicalagina, compuesto presente en el extracto de granada, disminuyó la movilidad y la expresión de genes relacionados a movilidad, como *fliA*, y algunos genes de virulencia, como *hilA* y *ssrA* (SPI-1 y SPI-2, respectivamente), en presencia de concentraciones subinhibitorias de este compuesto (Li et al., 2014) (Figura 40 A y B). El pirogalol, compuesto presente en diversas frutas y verduras, disminuyó la expresión de genes de virulencia presentes en de SPI-1, como *hilA* e *invF* en concentraciones subinhibitorias de este compuesto (Birhanu et al., 2021) (Figura 40 A). No obstante, hasta el momento no se ha estudiado el mecanismo por el cual estos compuestos presentes en plantas afectan la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*. Los ácidos grasos forman parte de las señales ambientales que *Salmonella* detecta en el intestino de sus hospederos y que modulan la expresión de sus genes de virulencia. Se ha reportado que el regulador HilA es modificado por un grupo acilo al acumularse el butiril-CoA, un producto generado por el metabolismo del butirato, y, de esta manera, afecta la expresión de los genes de SPI-1 (Zhang et al., 2020). Otros ácidos grasos de cadena larga, como el ácido hexadecenoico (c2-HDA) o el oleato, afectan la capacidad del regulador HilD de unirse y activar la transcripción de sus genes blanco (Golubeva et al., 2016; Chowdhury et al., 2021) (Figura 40 A). El compuesto defostatina, una molécula no antibiótica derivada de *Streptomyces*, modifica al regulador de respuesta SsrB y, de esta manera, disminuye la expresión de los genes de SPI-2 (Tsai et al., 2020) (Figura 40 B). Nuestros resultados indican que la expresión de los genes de virulencia *invF* y *ssaG* de *S. Typhimurium* se afecta en presencia de los extractos de canela (CinnacAr) y para el caso de *invF*, también por la presencia de citronela. Probablemente, los componentes de estos extractos afecten a los reguladores específicos de virulencia de esta bacteria, tal como HilD y HilA (SPI-1) o SsrA/B (SPI-2), y, por ello, se afecte la expresión de genes corriente debajo de la cascada de regulación como *invF* o *ssaG*, respectivamente; mientras que, los componentes del extracto de planta gobernadora (Mega), que afectó la expresión tanto de *invF* y *rpsL*, tengan un efecto sobre el proceso de transcripción o sobre algún regulador global que controle la expresión de varios genes involucrados en diversos procesos biológicos. Sin embargo, se requieren de más estudios para determinar específicamente el efecto de los extractos o compuestos evaluados en nuestro estudio.

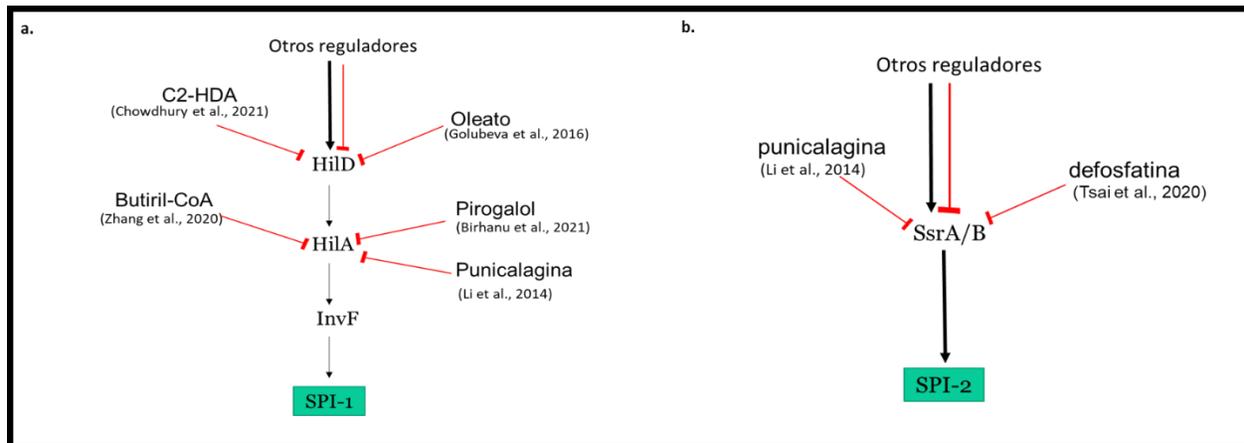


Figura 40.- Compuestos con actividad anti-virulencia sobre reguladores específicos de virulencia en *S. Typhimurium*. SPI-1 (a) y SPI-2 (b).

En *Pseudomonas*, se han estudiado otros extractos o compuestos de plantas que tienen efecto anti-virulencia. El extracto de bergamota (*Citrus bergamia*) y de *Aspidosperma*, así como la quercetina (presente en frutas y verduras), afectaron los fenotipos regulados por quorum sensing como la movilidad tipo enjambre, la formación de biopelícula, la producción de proteasas y de pirocianina, así como la expresión de los genes de quorum sensing *lasI*, *lasR*, *rhlI* y *rhlR* (Ouyang et al., 2016; Ahmed et al., 2021) (Figura 41). En otro estudio, se demostró que el extracto de las hojas de *Olea europaea* (olivo) y *Camellia sinensis* (té verde) disminuyeron la expresión de los genes del sistema Quorum sensing *las* y *rhl* (El-sayed et al., 2020) (Figura 41). El 5-hidroximetilfurfural, el cual se encuentra en frutas como el plátano rojo (*Musa acuminata*), el café, la miel y las frutas secas, disminuyó la producción de pirocianina, elastasas, proteasas, la formación de biopelícula, la movilidad tipo enjambre, así como la expresión de los genes del sistema de Quorum sensing *las* y *rhl* (Rajkumari et al., 2019; Vijayakumar & Ramanathan, 2020) (Figura 41). De manera interesante, Rajkumari y colaboradores, a través de acoplamiento molecular, demostraron que el 5-hidroximetilfurfural interacciona con los reguladores transcripcionales LasR y RhIR, antagonizando la unión con sus ligandos naturales (Rajkumari et al., 2019). Nuestros resultados indican que la expresión de *rhlR* se afecta en presencia de los extractos de eucalipto, citrobio, citronela y mega, así como del compuesto cinamaldehído. Probablemente, los componentes de estos extractos afectan a los reguladores específicos de quorum sensing, tal como LasR o RhIR, y de esta manera, se afecta la expresión de *rhlR*. Que en nuestros resultados no observáramos ningún efecto sobre la expresión de *exsA* nos sugiere que la expresión del SST3 no se ve afectada por la presencia de estos extractos o compuestos de plantas; sin embargo, es necesario evaluar la expresión de *exsA* en otras condiciones que induzcan la expresión máxima del SST3, tal como las bajas concentraciones de Ca^{2+} o la presencia de suero en el medio (Hauser, 2009; Diaz et al., 2011).

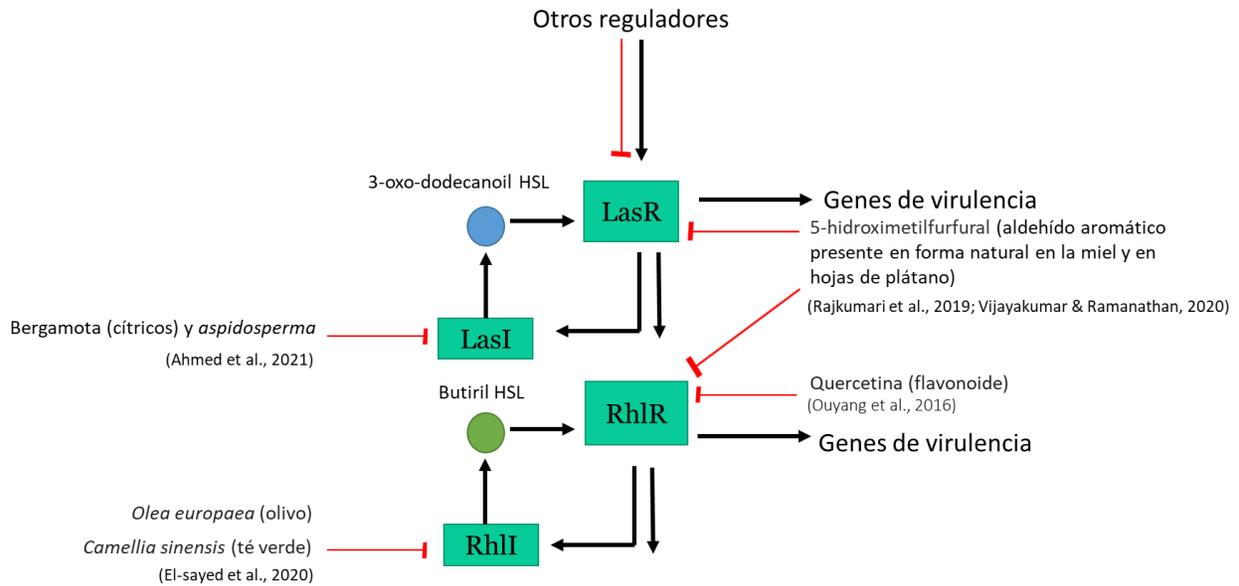


Figura 41.- Compuestos o extractos con actividad anti-virulencia sobre reguladores específicos de quorum sensing de *P. aeruginosa*.

En este trabajo encontramos que algunos de los extractos utilizados tienen actividad anti-virulencia contra cepas de laboratorio de *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa*, por lo que se requieren de más estudios para determinar si estos extractos tienen también un efecto anti-virulencia contra cepas multi-resistentes a los antibióticos. Con base en nuestros resultados, en nuestro grupo se tiene planeado obtener nuestros propios extractos de estas plantas utilizando diferentes solventes (como hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol, etanol y agua) y/o de diferentes partes de la planta para obtener diferentes metabolitos, y, de esta manera, conocer la concentración de cada extracto. El uso de técnicas cromatográficas como el HPLC, nos permitirá conocer el o los compuestos presentes en estos extractos que presentaron actividad anti-virulencia.

IX. Conclusión

Para *S. Typhimurium*:

- El extracto de canela (CinnacAr) disminuyó la expresión de *invF* y de *ssaG* a una concentración de 47.43 mg/L.
- El cinamaldehído disminuyó la expresión de *invF* a una concentración de 0.94 mM, la expresión de *rpsL* a una concentración de 0.47 mM, así como la expresión de *ssaG* a las concentraciones de 0.23 mM y 0.47 mM.
- El extracto de citronela disminuyó la expresión de *invF* a una dilución de 1/600.
- El extracto de planta gobernadora (Mega) incrementó la expresión de *invF* y *rpsL* a la dilución de 1/500.
- El extracto de eucalipto, a las diluciones probadas en este trabajo, no tuvo efecto sobre la expresión de *invF*, *ssaG* ni de *rpsL*.

Para *P. aeruginosa*:

- El cinamaldehído disminuyó la expresión de *rhIR* a las concentraciones de 0.13 mM, 0.47 mM, 0.94 mM y 2.35 mM.
- El extracto de citronela disminuyó la expresión de *rhIR* a las diluciones 1/1,200, 1/800, 1/600 y 1/400.
- El extracto de planta gobernadora (Mega) disminuyó la expresión de *rhIR* a las diluciones de 1/500, 1/400 y 1/200.
- El extracto de eucalipto disminuyó la expresión de *rhIR* a las diluciones de 1/1,500 y 1/1,000.
- El extracto de cítricos (Citrobio) disminuyó la expresión de *rhIR* a la dilución de 1/5,000.
- Ninguno de los extractos probados tuvo efecto sobre la expresión de *exsA*.

X. Perspectivas

- Evaluar el efecto de los extractos o compuestos probados sobre la expresión de otros genes de virulencia y genes constitutivos (controles).
- Determinar la posible sinergia de los extractos probados.
- Evaluar el efecto de los extractos o compuestos probados sobre la expresión de los genes de virulencia en cepas multi-resistentes.
- Identificar los compuestos presentes en los extractos de plantas con actividad anti-virulencia.

XII. Literatura citada

- Ahmed, A. A., Salih, F. A. (2019). *Quercus infectoria* gall extracts reduce quorum sensing-controlled virulence factors production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn wounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 19(1): 177.
- Ahmed, S. O., Zedan, H. H., Ibrahim, Y. M. (2021). Quorum sensing inhibitory effect of bergamot oil and aspidosperma extract against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*. 203(7): 4663–4675
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (1): 5–16
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H, ... Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 11: 1645–1658.
- Azam, M. W., Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. 24(1): 350–359.
- Baba, J., Mohammed, S. B., Ya'aba Y., Umaru F. I. (2018). Antibacterial activity of sweet orange *Citrus sinensis* on some clinical bacteria species isolated from wounds. *Journal of Family Medicine and Community Health*. 5(4): 1154.
- Bachir, R. G., Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(9): 739–742.
- Birhanu, B. T., Lee, E. B., Lee, S. J., Park, S. C. (2021). Targeting *Salmonella* Typhimurium Invasion and Intracellular Survival Using Pyrogallol. *Frontiers in Microbiology*, 12: 631426.
- Brannon, J. R., Hadjifrangiskou, M. (2016). The arsenal of pathogens and antivirulence therapeutic strategies to disarm them. *Drug design, Development and Therapy*. 10: 1795–1806.
- Chericoni, S., Prieto, J. M., Iacopini, P., Cioni, P., Morelli, I. (2005). *In vitro* activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* and Eugenol in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(12): 4762-4765
- Chowdhury, R., Pavinski Bitar, P. D., Keresztes, I., Condo, A. M., Altier, C. (2021). A diffusible signal factor of the intestine dictates *Salmonella* invasion through its direct control of the virulence activator HilD. *PLoS Pathogens* 17(2): e1009357.
- Clemente-Soto, A., Balderas-Rentería, I., Rivera, G., Segura-Cabrera, A., Garza-González, E., & del Rayo Camacho-Corona, M. (2014). Potential Mechanism of Action of meso-Dihydroguaiaretic Acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Molecules*. 19(12): 20170–20182.

- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564–582.
- Davies, J., George, B. S., Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*. 9(5): 445-453
- De Toledo, L., Ramos, M., Spósito, L., Castilho, E., Pavan, F., Lopes, R., Zocolo, G., Silva, F., Soares, T., Dos Santos, A., Bauab, T., De Almeida, M. (2016). Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(8): 1252.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., Hensel, M. (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Molecular Microbiology*. 31 (6): 1759-1773
- Diaz, M. R., King, J. M., Yahr, T. L. (2011). Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2, 89.
- Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C., Otto, M. (2017). Different medications for serious errors: anti-virulence strategies in the era of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*. 16(7): 457–471.
- Dos Santos, A., Ferrari, R. G., Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Current Microbiology*. 76(6): 762–773
- El-sayed, N. R., Samir, R., Abdel-Hafez, L. J. M., Ramadan, M. A. (2020). Olive Leaf Extract Modulates Quorum Sensing Genes and Biofilm Formation in Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 9(9): 526.
- Fàbrega, A., Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2): 308–341.
- Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Camacho-Corona, M. R. (2012). Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytotherapy Research*. 26(12): 1957–1960.
- Figueroa, I., Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(2): 25-42
- Gellatly, S. L., Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new knowledge about pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Diseases*. 67(3): 159-173.
- Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Cott Chubiz, J. E., Slauch, J. M. (2016). Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. *mBio*. 7(1).
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., López-Gresa, M. P., Blázquez, M. A., Granell, A. (2019). Volatile Compounds in Citrus Essential Oils: A Comprehensive Review. *Frontiers in Plant Science*. 10: 12.
- Gruenwald, J., Freder, J., Armbruster, N. (2010). Cinnamon and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50(9): 822-834

- Haraga, A., Ohlson, M. B., Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews. Microbiology*. 6(1): 53–66
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews*. 7(9): 654–665.
- Hoiseth, S. K., Stocker, B. A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 291(5812): 238–239.
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... Guerin, P. J., Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 387(10014): 176–87.
- Huang, Y., Xue, C., He, W., Zhao, X. (2019). Inhibition effect of Zedoary turmeric oil on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* growth and exotoxin proteins production. *Journal of Medical Microbiology*. 68(4): 657-666
- Ibarra, J., Bustamante, V. (2018). Los compuestos anti-virulencia como alternativa a los antibióticos, *Biotecnología en movimiento*. No. 15, P.18-21. Recuperado de <https://biotecmov.files.wordpress.com/2018/11/orig-electrc3b3nicos-bm15.pdf>
- Jiménez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., Quax, W. J. (2012). Multiple signaling systems that regulate virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76 (1): 46–65.
- Khan, U. M., Sameen, A., Aadil, R. M., Shahid, M., Sezen, S., Zarrabi, A., ... Butnariu, M. (2021). *Citrus* Genus and Its Waste Utilization: A Review on Health-Promoting Activities and Industrial Application. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2021: 2488804.
- Kollanoor Johny, A., Frye, J. G., Donoghue, A., Donoghue, D. J., Porwollik, S., McClelland, M., Venkitanarayanan, K. (2017). Gene Expression Response of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Phage Type 8 to Subinhibitory Concentrations of the Plant-Derived Compounds Trans-Cinnamaldehyde and Eugenol. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1828.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. (2017). Orientation of microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 15(12): 740-755.
- Lee, K., Yoon S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(6): 1053-1064.
- Levy, S., Marshall, B. (2004). Worldwide antibacterial resistance: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. 10: 122-129.
- Li, G., Yan, C., Xu, Y., Feng, Y., Wu, Q., Lv, X., Yang, B., Wang, X., Xia, X. (2014). Punicalagin Inhibits *Salmonella* Virulence Factors and Has Anti-Quorum-Sensing Potential. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(19): 6204–6211.
- Liu, Y., Zhang, Y., Yonglin, Z., Wang, T., Deng, X. M., Chu, X., Zhou, T. Z. (2019). Cinnamaldehyde inhibits type three secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by affecting the expression of key effector proteins. *Veterinary Microbiology*. 239: 108463.

- Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*. 79: 274-282.
- Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., Taddese, S. (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology*. 2016: 9545693.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1988). A simple salt extraction procedure to extract DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*. 16 (3): 1215.
- Mirza, Z. R. M. H., Hasan, T., Seidel, V., Yu, J. (2018). Geraniol as a novel antivirulence agent against bacillary dysentery-causing *Shigella sonnei*. *Virulence*. 9(1): 450–455.
- Montero, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos” (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona.
- Moradali, M. F., Ghods, S., Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7: 39.
- Muro, C., García, S., León, M. (2018). Cómo obtener nuevos compuestos antimicrobianos de las plantas. *Biotechnología en movimiento*. No. 15, Recuperado de <https://biotecmov.files.wordpress.com/2018/11/orig-electrc3b3nicos-bm15.pdf>
- O'Neill J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The Review on Antimicrobial Resistance*.
- Ouyang, J., Sun, F., Feng, W., Sun, Y., Qiu, X., Xiong, L., Liu, Y., Chen, Y. (2016). Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 120(4): 966–974.
- Paredes, C. (2019). Caracterización de la proteína HilD: un regulador central de la virulencia de *Salmonella enterica* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Paz-Zarza, V.M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S.G., Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*. 36(2): 180-189.
- Pérez, D., Bustamante, V. (2018). Crisis mundial por bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Biotechnología en movimiento*. (15): 5-2. Recuperado de <https://biotecmov.files.wordpress.com/2018/11/orig-electrc3b3nicos-bm15.pdf>
- Pérez-Morales, D., Banda, M. M., Chau, N., Salgado, H., Martínez-Flores, I., Ibarra, J. A., Ilyas, B., Coombes, B. K., Bustamante, V. H. (2017). The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathogens*. 13(7): e1006497.

- Pontes, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., de Carvalho, M. G., Catunda Júnior, F. E. A., Cavalcante, T. T. A. (2019). Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*. 28(3): 633–639.
- Rajkumari, J., Borkotoky, S., Reddy, D., Mohanty, S. K., Kumavath, R., Murali, A., Suchiang, K., Busi, S. (2019). Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of 5-hydroxymethylfurfural against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Insights from *in vitro*, *in vivo* and *in silico* studies. *Microbiological Research*. 226, 19–26.
- Ranasinghe, P., Pigera, S., Premakumara, G. A., Galappaththy, P., Constantine, G. R., Katulanda, P. (2013). Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13: 275.
- Sagar, P. K., Sharma, P., Singh, R. (2020). Antibacterial efficacy of different combinations of clove, eucalyptus, ginger, and selected antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Ayu*. 41(2): 123–129.
- Seol, G. H., Kim, K. Y. (2016). Eucalyptol and Its Role in Chronic Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 929: 389–398
- Skouta, R., Morán-Santibañez, K., Valenzuela, C., Vasquez, A., Fenelon, K. (2018). Assessing the Antioxidant Properties of *Larrea tridentata* Extract as a Potential Molecular Therapy against Oxidative Stress. *Molecules*. 23(7): 1826.
- Téllez, Galván Alexis. (2020). Actividad antibacteriana de dos extractos comerciales de plantas (cítricos y canela) contra cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella Typhimurium*". (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Topa, S. H., Palombo, E. A., Kingshott, P., Blackall, L. L. (2020). Activity of Cinnamaldehyde on Quorum Sensing and Biofilm Susceptibility to Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*. 8(3): 455
- Torres, Lozano Rosa Fernanda. (2021). Efecto de extractos y compuestos comerciales de plantas en la formación y mantenimiento de biopelículas de cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Torres-Alvarez, C., Núñez González, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas, C., Báez-González, J. G. (2016). Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA - Journal of Food*. 15(1): 129-135
- Tsai, C. N., MacNair, C. R., Cao, M. P., Perry, J. N., Magolan, J., Brown, E. D., Coombes, B. K. (2020). Targeting Two-Component Systems Uncovers a Small-Molecule Inhibitor of *Salmonella* Virulence. *Cell Chemical Biology*. 27(7): 793–805.
- Vijayakumar, K., Ramanathan, T. (2020). *Musa acuminata* and its bioactive metabolite 5-Hydroxymethylfurfural mitigates quorum sensing (*las* and *rhl*) mediated biofilm and

- virulence production of nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Journal of Ethnopharmacology. 246: 112242.
- Wei, L. S., Wee, W. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. Iranian Journal of Microbiology. 5(2): 147–152.
- WHO. Geneva: World Health Organization. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.
- WHO. World Health Organization (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- Williams McMackin, E. A., Djapgne, L., Corley, J. M., Yahr, T. L. (2019). Fitting pieces into the puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system gene expression. Journal of Bacteriology. 201(13): e00209-19
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative. Molecules. 24(11): 2130.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., Ren, L. (2015). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. Current Medicinal Chemistry. 22(1): 132–149.
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus. 9(6): e1403.
- Zhang, Z. J., Pedicord, V. A., Peng, T., & Hang, H. C. (2020). Site-specific acylation of a bacterial virulence regulator attenuates infection. Nature Chemical Biology. 16(1): 95–103.
- Zhao, X., Wei, S., Tian, Q., Peng, W., Tao, Y., Bo, R., Liu, M., Li, J. (2022). Eugenol exposure *in vitro* inhibits the expressions of T3SS and TIF virulence genes in *Salmonella* Typhimurium and reduces its pathogenicity to chickens. Microbial Pathogenesis. 162: 105314.

Cuernavaca, Morelos a 12 de octubre de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **MICHELLE GUADALUPE SALGADO REBOLLAR**, con el título del trabajo: **EFEECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Typhimurium*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. EN B. MARIA LUISA BARROSO GARCIA
SECRETARIO: DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ
CARBENTE

VOCAL: M. EN C. JESSICA NAVA GALEANA

SUPLENTE: DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO

SUPLENTE: DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-10-12 12:08:32 | Firmante

DfMrukC5h/bUbR82nbSGZ6J+wgokS7C9jsvC4pYQagW8gbxu26o/b3Mn7k2lppqL9aWl4H/VQMyxT2SGa7VnNpArUhUBI4ixyFVEUzue0zVYwjsTutvX2z8hzizAwKLYlip0ck115L UfqHBrFuLAD6WIHN3sO3doj8zgQ0xEZrfAuZpAx/fWiYvtLMbUlxOMDasJDbxZFyFjcv1dQ8JpKU5fExKGI6HF+jSvxwRLlh5Pdvmpb7YV+ueeTgBzQQ3AiPiqHXQ5kO5DIWRPcd c92dxhDJV3aUPHD3CrOUE7IA9VBm4dWWrK3bG7zNHO5poHjTYUjj5BajCTMGibMn9Q==

JESSICA NAVA GALEANA | Fecha:2022-10-12 12:16:04 | Firmante

Inev4Qo7itZ5mpCHpG4FrJqJ7CGYabz0UJhG+tMaLhMg0xgfDiQCyW5PIbvdCYPzYgPBPR3aP+v7LIi3TDCsPeMu/Q2uKp2ImwZ/1yUYVCKCTVyR2+yTWh4dB5x0uAk0+IWUPo lno0ffAvEKrYnu2RaWCh3JpTtqf+gmtqYMITpQWC2HxKu9dVg1CCDOiFzcgOI1WUY5lZC9CitAzE2keFz2U2pnK++hhVUWUPUCUZMD2ewq2XAXWjqHvzIwLcLQASy4dwa6nQB ws/4pkmMYL7KvFL34bxMPCzInpdzPTWK4dM0oymI6dEpAcCHt1PYYBizSl4Zx+Jv/XSgOeXW/gA==

DEYANIRA PÉREZ MORALES | Fecha:2022-10-12 12:32:24 | Firmante

bJIs1+SjW9dABDBpBbvC80ocEn0gowDu0olrC05mNaumU651D17ygzpPKyTouTJKJ1k3/cB9B0/RNjpuKuDpcAzNAMmLorWTcaqCWZgUx2YGC0yAehcierHla0E7MNisgN0 EcE1tLgX9rixShwgv3Sl01WCowUY6UdCyDCZK3UK7nNOQJUrA2G/ZG9TZcK3VOVRz4+/yaVBtrHIL2H9cZkPFnyQF52PB/uUYiW4n4fVc4AiFEjkVfA21oo7o6HV8Xv8XtPHf N4Rbiii+qZqZKOUAIXJkbnzXhDEO0GB3NkyITRtEW5nKTgbwLzS6vAl9oWivtrF2PaU4ulw==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2022-10-16 16:15:44 | Firmante

LMYp89yv6PwDKRTfPL1QdxbbCayMhN2cgpaygKR9VRtKMS0zdTJahWRa6/73rwl0LBqw4/Y8HY4TCnsTungecTz3uCqZBxYbsfRjswWfzfEoaOrVI9I9MybOLch6dCAz1TeIk8 H7wtWV7zTTfDTvZEWCdnlrDpdEsHTkudvYeszVkgCAI0MWp5EoQ1K050cpkN8D8lmj7DG4S1S1juk+lz4ZbiQwEpYn4ncmf2qxaKiBgXeGRik1EY99MfzxyMIV+VoY3r9p80qymt TCiGO/9tm1Ci7CUPOLrXwW5erMO6tNvOBk7A7WwfnE6x2xLi1HWQbgiuqzLxprRZYKSd5Q==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2022-11-09 12:39:47 | Firmante

KJeFdU6i9tDSQsgxJl4dehEIWZ2AYZ9onKDN/kwKtpR4RtyFA353tkcoN0lw0vSa+YdxZ+GSdAkG+YYpWxJ9bckFutkFiw7Es6oevdQRvfoKDOeaBJ4N+QM1F6WGWmSbyrhrlr XvivnX4ShaNzC222nyjeAmWWAO290KVMs91BVfxeTKMrVn2z4SMmA0s5iMSS4KS+9W3KUd667my4C+Phtwy+t9Aftf6fJ+aSvx7r2vtev/GwAYYhmyzOPSIZ0IUG1N0kmr0xSR 2uAww2BAtszec92UabMrl7GyVTdsbk7SJZ2cbJ63yT+GeRJAqE8dltPb8eLLcBqM8uydoA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



P9Mn8arEi

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MuzPldx7oZqolsFSojgAIL4OSf6GLMpG>