

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



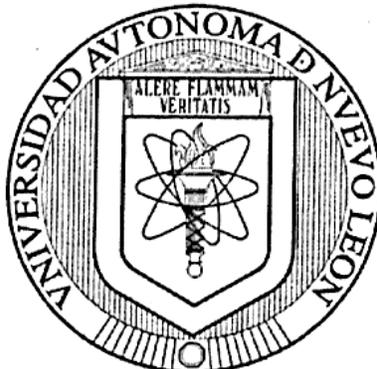
**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE DERIVADOS DE QUINOXALINA**

**POR
ANA CRISTINA GONZÁLEZ MORALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

A G O S T O, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS DE QUINOXALINA

Aprobación de tesis por el comité particular de

Ana Cristina González Morales

Dirección de Tesis


Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Director


Dra. Karina W. Vázquez Cisneros
Co-Director


Dra. Diana Elisa Ávila Zamora
Co-Director


Dr. Ramiro Ramírez Avalos
Co-Director


Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis asesores en especial al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño por la confianza otorgada al aceptarme como tesista, brindándome apoyo, paciencia y tiempo para llevar a cabo el presente trabajo. A la Dra. Karina W. Vázquez Cisneros quien me presentó la opción de realizar este proyecto en conjunto con el Dr. Jaime y por ayudarme y aconsejarme en la ejecución del trabajo. Al Dr. Gildardo Sánchez Rivera por proporcionarme los compuestos evaluados, que sin dicho apoyo no se hubiera podido ejecutar el proyecto. A mis demás asesores la Dra. Diana Avilés Zamora, por darse un tiempo para evaluar mi presentación y al Dr. Ramiro Avalos Ramírez por los consejos.

Al personal docente y técnico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia quienes me asesoraron, me proporcionaron el material e instalaciones requeridos para la realización del trabajo.

Al departamento de Inmunología en especial al Dr. Uziel Castillo por proporcionarme la asesoría e instalaciones requeridas para realizar los ensayos de citotoxicidad. Gracias.

A mis compañeras y colegas, Karina, Alicia, Lilian e Itzel por darnos aliento para seguir adelante y culminar esta etapa de nuestras vidas, por los consejos, por su ayuda, por los buenos momentos que pasamos alrededor de estos dos años, les agradezco demasiado.

A mi pareja Pedro por darme siempre sus mejores consejos, su paciencia, su amor, por apoyarme en todo momento, por hacer de alguna manera esta etapa de nuestras vidas un poco más sencilla, por motivarme a continuar y finalizar este proyecto, siempre te estaré agradecida.

A mi Familia, porque la familia nunca te abandona, ni te olvida. Gracias por siempre estar en todo momento, aunque no se encuentren cerca de mí, sé que están al pendiente.

A mis padres María Margarita y Jorge Jaime gracias por todo su apoyo, por creer en mí y siempre tratar de darme lo mejor. A mi hermana Karla Alejandra gracias por hacerme ver el lado positivo de las cosas y por soportarme siempre. No hay suficientes palabras para poder describir lo cuan agradecida estoy con ustedes.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a CONACyT por generarme su apoyo mediante su beca, dándome la oportunidad de cursar esta etapa de aprendizaje y crecimiento profesional. De igual manera agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme sus puertas una vez más, permitiendo culminar este proceso de preparación académica y personal.

A todos, infinitas gracias.

DEDICATORIA

Antes que nada quiero dedicar el presente trabajo a Dios todo poderoso quien está presente en cada paso que doy.

A mi familia, quien es el soporte principal de mi vida, principalmente a mis padres Margarita y Jorge que siempre me dan su apoyo incondicional, alentándome a convertir los sueños más locos e inalcanzables en metas logradas.

A mi hermana Karla por brindarme los mejores consejos, por ser esa persona que siempre está ahí para escucharme y hacerme sentir mejor en los momentos de dificultad y a mi cuñado Mateo por amar y cuidar a mis más grandes tesoros, mis hermosas sobrinas Camila y Natalia; a ellas por ser esos seres de luz que iluminan mi vida.

A mi maravilloso compañero de vida Pedro, por permitirme vivir esta experiencia a su lado soportándome en todo momento, por su amor y apoyo en esta etapa de mi vida, por motivarme cada día a seguir adelante.

A mis amigos cercanos, Mary, Brenda, Sam, Sol, Alejandro, Ever, Víctor, por su apoyo incondicional, su comprensión, sus consejos y sus palabras de motivación.

Para todas aquellas personas que de alguna forma pusieron su granito de arena para que pudiera culminar este trabajo.

“Las especies que sobreviven no son las más fuertes, ni las
más rápidas, ni las más inteligentes,
sino aquellas que se adaptan mejor al cambio”.

Charles Darwin

ÍNDICE

DIRECCIÓN DE TESIS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 DESCRIPCIÓN DE MODELOS PROCARIOTAS.....	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1.1 Características generales.....	3
2.1.1.2 Patogénesis y Patogenicidad	4
2.1.1.2.1 Polisacáridos capsulares	4
2.1.1.2.2 Endotoxina	4
2.1.1.2.3 Estructuras encargadas de la colonización	5
2.1.1.2.4 Enterotoxinas	5
2.1.1.2.5 Otras sustancias.....	6
2.1.1.3 Infecciones clínicas.....	7
2.1.1.3.1 Colibacilosis entérica	8
2.1.1.3.2 Colisepticemia.....	8
2.1.1.3.3 Enfermedad del edema en cerdos	8
2.1.1.3.4 Diarrea post-destete.....	9
2.1.1.3.5 Mastitis por coliformes	9
2.1.1.3.6 Infección del tracto urogenital.....	9
2.1.1.4 Características epidemiológicas.....	10
2.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2.1.2.1 Características generales.....	11
2.1.2.2 Patogénesis y patogenicidad.....	12
2.1.2.2.1 Antígenos capsulares	12
2.1.2.2.2 Fimbrias.....	13
2.1.2.2.3 Lipopolisacárido (LPS).....	14
2.1.2.2.4 Sideróforos.....	14
2.1.2.3 Infecciones clínicas.....	15
2.1.2.3.1 Mastitis por coliformes	15
2.1.2.3.2 Endometritis.....	15
2.1.2.3.3 Neumonía	16
2.1.2.3.4 Infecciones del tracto urinario.....	16
2.1.2.4 Características epidemiológicas.....	17
2.1.3 <i>Proteus mirabilis</i>	18
2.1.3.1 Características generales.....	18
2.1.3.2 Patogénesis y patogenicidad.....	19

2.1.3.2.1	<i>Ureasa</i>	19
2.1.3.2.2	<i>Sistemas de secreción</i>	19
2.1.3.2.3	<i>Toxinas</i>	19
2.1.3.2.4	<i>Fimbrias y adhesinas</i>	20
2.1.3.2.5	<i>“Swarming” factor de virulencia</i>	20
2.1.3.3	Infecciones clínicas	21
2.1.3.3.1	<i>Infección del Tracto Urinario (UTI)</i>	21
2.1.3.3.2	<i>Otitis externa</i>	21
2.1.3.4	Características epidemiológicas	22
2.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.1.4.1	Características generales	23
2.1.4.2	Patogénesis y patogenicidad	24
2.1.4.2.1	<i>Flagelos y pili</i>	24
2.1.4.2.2	<i>Sistemas de secreción tipo 3 (T3SS)</i>	25
2.1.4.2.3	<i>Sensores de quórum y biopelícula</i>	25
2.1.4.2.4	<i>Proteasas</i>	26
2.1.4.2.5	<i>Lipopolisacárido (LPS)</i>	26
2.1.4.3	Infecciones clínicas	26
2.1.4.3.1	<i>Infecciones reproductivas</i>	26
2.1.4.3.2	<i>Infecciones respiratorias</i>	27
2.1.4.3.3	<i>Infecciones dermatológicas</i>	27
2.1.4.3.4	<i>Otitis</i>	27
2.1.4.3.5	<i>Cistitis</i>	27
2.1.4.3.6	<i>Otras</i>	28
2.1.4.4	Características epidemiológicas	28
2.1.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.1.5.1	Características generales	29
2.1.5.2	Patogénesis y patogenicidad	30
2.1.5.2.1	<i>Infección primaria</i>	30
2.1.5.2.2	<i>Infección mediada por toxinas</i>	31
2.1.5.2.3	<i>Toxina α</i>	31
2.1.5.2.4	<i>Exfoliatina</i>	31
2.1.5.2.5	<i>Toxinas superantigénicas (SAg)</i>	31
2.1.5.2.6	<i>Enterotoxinas</i>	32
2.1.5.3	Infecciones clínicas	32
2.1.5.3.1	<i>Mastitis por <i>S. aureus</i></i>	32
2.1.5.3.2	<i>Piaemia por garrapatas</i>	33
2.1.5.3.3	<i>Enfermedad de extremidades en aves</i>	33
2.1.5.3.4	<i>Botriomicosis</i>	33
2.1.5.3.5	<i>Otras infecciones</i>	34
2.1.5.4	Características epidemiológicas	34
2.2	Resistencia antibacteriana y su problemática	35
2.3	Molécula de quinoxalina	37
2.3.1	Descripción	37
2.3.2	Actividad biológica	38
2.3.3	Derivados de quinoxalina como agentes antibacterianos	39
III.	JUSTIFICACIÓN	43
IV.	HIPÓTESIS	44

V.	OBJETIVOS	45
	Objetivo general.....	45
	Objetivos específicos.....	45
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	46
6.1	Derivados de quinoxalina.....	46
6.2	Preparación de microorganismos y controles	48
6.3	Prueba de difusión en agar	50
6.4	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	52
6.5	Viabilidad celular.....	53
6.6	Evaluación de la actividad citotóxica	54
6.7	Análisis estadístico.....	59
VII.	RESULTADOS	60
VIII.	DISCUSIÓN	68
IX.	CONCLUSIÓN	72
X.	PERSPECTIVAS	73
XI.	CITAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura antigénica de <i>Escherichia coli</i>	3
Figura 2. Esquema de los factores de patogenicidad de <i>Klebsiella</i>	12
Figura 3. <i>Proteus mirabilis</i> vista desde un microscopio óptico y crecimiento en forma de “swarming”	19
Figura 4. Tinción de gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Kenneth Todar y agar de aislamiento de <i>Pseudomonas</i>	24
Figura 5. Tinción de gram de <i>Staphylococcus aureus</i> y colonias hemolíticas en agar sangre.....	30
Figura 6. Bioisómeros y estructura del anillo de quinoxalina	37
Figura 7. Derivados óxidos de molécula de quinoxalina	38
Figura 8. Estructura de derivados de 1, 3, 4-oxadiazol	39
Figura 9. Estructuras derivadas de quinoxalina utilizadas por Vieira.....	40
Figura 10. Modelos de quinoxalina con actividad antibacteriana utilizados por Parhi.....	41
Figura 11. Modelo de la estructura de quinoxalina utilizada por Morales.....	42
Figura 12. Distribución de pocillos y ensayo de difusión en agar	51
Figura 13. Técnica de microdilución seriada al doble en microplaca.....	53
Figura 14. Distribución de microplaca de la actividad citotóxica.....	58
Figura 15. Cuenta viable en placa de derivados de quinoxalina	64
Figura 16. Reducción de Unidades Formadoras de Colonias	65
Figura 17. Porcentaje de citotoxicidad en Macrófagos murinos J774	66
Figura 18. Compuesto AG2: <i>Propyl 3-(furan-2-carbonyl)-1,4-di (λ1-oxidanyl)-2-</i> <i>(trifluoromethyl)-1λ4,4λ4-quinoxaline-6-carboxylate</i>	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>E. coli</i> implicada en enfermedades entéricas.....	7
Tabla 2. Propiedades de <i>Klebsiella</i>	11
Tabla 3. Características de cada compuesto derivado de quinoxalina.....	46
Tabla 4. Moléculas de derivados de quinoxalina.....	47
Tabla 5. Prueba de sensibilidad de fármacos comerciales en cepas aisladas.....	60
Tabla 6. Prueba de sensibilidad de fármacos comerciales en cepas control.....	61
Tabla 7. Prueba de sensibilidad de compuestos derivados de quinoxalina y controles sobre cepas aisladas.....	62
Tabla 8. Prueba de sensibilidad de compuestos derivados de quinoxalina y controles sobre cepas control.....	62
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (cmi) de compuestos derivados de quinoxalina.....	63
Tabla 10. Resultados de actividad citotóxica de los compuestos en línea celular macrófagos murinos J774.....	66
Tabla 11. Resultados de índice de selectividad.....	66

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CDBBB	Colección del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
UFC	Unidad formadora de colonias
OMS	Organización Mundial de la Salud
CCPE	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
DNDi	Iniciativa Medicamentos para las Enfermedades Desatendidas
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μg	Microgramo
nm	Nanómetro
mm	Milímetro
ICC	Infusión Cerebro Corazón
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
DMSO	Dimetil sulfóxido
Rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Buffer fosfato salino
CPF	Ciprofloxacina
AMX	Amoxicilina
QNX	Quinoxalina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium
CO_2	Dióxido de carbono
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
UV	Ultravioleta
IC_{50}	Concentración inhibitoria máxima media

RESUMEN

La proliferación de cepas resistentes como consecuencia del uso de antibióticos, es un proceso natural que se ha acelerado en las últimas décadas por la aplicación inadecuada de ciertos fármacos. Pese a ser un problema inevitable, se requiere el desarrollo de agentes alternativos capaces de combatir estos patógenos sin generar efectos adversos. Hoy en día, se han desarrollado distintos métodos para evaluar la bioactividad de numerosas familias de compuestos contra varias cepas de microorganismos. En el presente estudio se pretende realizar una contribución que permita la caracterización de la actividad biológica de derivados de quinoxalina, justificando así la búsqueda de alternativas para extender el espectro de actividad y lograr minimizar la resistencia generada. Para llevar a cabo la evaluación de los compuestos, se utilizaron modelos procarióticos representativos de gram-negativos y gram-positivos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Así mismo los compuestos fueron ensayados sobre cepas control de *S. aureus* CDBB B 1001, *P. aeruginosa* CDBB B 1021 y *P. mirabilis* CDBB B 1343. La actividad antibacteriana de los compuestos fue determinada por medio de la prueba de difusión en agar, CMI y cuenta viable en placa; mientras que la actividad citotóxica de los mismos fue evaluada mediante el ensayo MTT sobre macrófagos murinos J774. Los resultados mostraron que la mayoría de los compuestos fueron eficaces frente a la cepa gram positivo. El compuesto AG2 obtuvo la mejor actividad antibacteriana y una citotoxicidad moderada.

Palabras clave: Resistencia antibacteriana, actividad biológica, derivados, quinoxalina.

ABSTRACT

The proliferation of resistant strains as a consequence of the use of antibiotics is a natural process that has accelerated in recent decades due to the inadequate application of certain drugs. Despite being an inevitable problem, it requires the development of alternative agents capable of combating these pathogens without generating adverse effects. Nowadays, different methods have been developed to evaluate the bioactivity of numerous families of compounds against several strains of microorganisms. In the present study we intend to make a contribution that allows the characterization of the biological activity of quinoxaline derivatives, justifying the search for alternatives to extend the spectrum of activity and minimize the resistance generated. To carry out the evaluation of the compounds, representative prokaryotic models of gram-negative and gram-positive were used as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The compounds were also tested on control strains of *S. aureus* CDBB B 1001, *P. aeruginosa* CDBB B 1021 and *P. mirabilis* CDBB B 1343.

The antibacterial activity of the compounds was determined by means of the agar diffusion test, MIC and viable plate count; while the cytotoxic activity thereof was evaluated by the MTT assay on murine macrophages J774. The results showed that most of the compounds were effective against the gram positive strain. The AG2 compound obtained the best antibacterial activity and moderate cytotoxicity.

Keywords: Antibacterial resistance, biological activity, derivatives, quinoxaline.

I. INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal, la piel y mucosas de animales están colonizados por un grupo denso y heterogéneo de microorganismos, siendo parte de su microbiota. Al verse comprometido el sistema inmune, puede contribuir a que algunos de estos microorganismos oportunistas generen infecciones que alteren la salud, tanto en animales como en humanos.

La proliferación de cepas resistentes como consecuencia del uso de antibióticos, es un proceso natural que se ha acelerado por la aplicación inadecuada de estos fármacos y pese a ser un problema inevitable, siendo este uno de los problemas más graves de salud pública y sanidad animal (De la Fuente *et al.*, 2016), han hecho que diversas instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CCPE), propongan implementar numerosas estrategias para prevenir y solucionar, o tratar de retrasar este proceso (Davies, 2010).

En respuesta a la mencionada problemática, se ha impulsado una intensa labor de investigación para la búsqueda, identificación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y la modificación o implementación de novedosos protocolos y/o técnicas para evaluar adecuadamente su efectividad (Mills *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014).

Durante décadas, las investigaciones se han enfocado en determinar cuantitativamente la relación entre la dosis aplicada y el efecto de los antibióticos o los agentes suministrados individualmente o combinados, para conocer cuál combinación muestra un efecto sinérgico. Sin embargo, todos los sistemas biológicos muestran particular y extrema complejidad que ha originado el desarrollo de innumerables modelos experimentales y al mismo tiempo, una constante controversia sobre la metodología y la interpretación de los resultados obtenidos de la combinación de antibióticos y otros compuestos antimicrobianos como infusiones herbales y iones metálicos (Mills *et al.*, 2011).

En la actualidad existen infecciones asociadas con patógenos de carácter zoonótico resistentes a ciertos fármacos, los cuales tienen un interés en el área de salud pública y sanidad animal, ya que constituyen un motivo de preocupación por tanto pueden poner en riesgo la terapéutica de las enfermedades, como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, algunos Enterococos resistentes a la vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a diversos fármacos como la amoxicilina y recientemente a fluoroquinolonas. (Chethana *et al.*, 2013; Parhi *et al.*, 2013; Taibo, 2003; Dixit *et al.*, 2011; Umale *et al.*, 2015; Biberstein *et al.*, 1994). La creciente resistencia de los microorganismos patógenos a los medicamentos convencionales, se ha convertido en un grave problema que requiere el desarrollo de agentes alternativos capaces de combatir estos patógenos sin efectos adversos (Fernandes *et al.*, 2013). Se han desarrollado algunos enfoques para evaluar la bioactividad de numerosas familias compuestas contra varias cepas de microorganismos (Gradelski *et al.*, 2001; Moellering 2011).

La quinoxalina es un compuesto heterocíclico orgánico, formado por la fusión de un anillo de benceno y una pirazina; se describen como bioisómeros de las quinolinas y otros anillos aromáticos tales como la piridina, que se ha utilizado como base de síntesis de derivados bioactivos y varios grupos de investigación han demostrado su potencial en aplicaciones médicas y farmacológicas (Zanetti *et al.*, 2005; Carta *et al.*, 2002). El resto del anillo de quinoxalina lo encontramos como parte de la estructura química de diversos antibióticos tales como equinomicina, levomicina y actinoleutina (Cheeseman *et al.*, 1979; Porter, 1984), las cuales inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas. En las últimas dos décadas varios compuestos heterocíclicos derivados de quinoxalina (1,4-dioxido de quinoxalina), han mostrado intereses quimioterapéuticos con respecto a las aplicaciones antioxidantes, antitumorales, antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Burguete *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2012; De Clercq, 1997; Waring *et al.*, 2002 y Haykal *et al.*, 2008;). Los derivados de quinoxalina con N-óxido y N, N-dióxido tienen interés particular, ya que presentan una relevante actividad antibacteriana (González, 2012; Vieira *et al.*, 2014; Morales-Castellanos *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2017).

II. ANTECEDENTES

2.1 Descripción de modelos procariotas

2.1.1 *Escherichia coli*

2.1.1.1 Características generales

Escherichia coli es un bacilo gram negativo anaerobio facultativo, no móvil, en su estructura puede contener flagelos peritricos y fimbrias; mide aproximadamente 2 μm , catalasa negativo, oxidasa positivo, fermenta lactosa, produce indol y no forma esporas, algunas características bioquímicas la separa de otras especies. Hay alrededor de 150 antígenos O distintos y bastantes antígenos K y H, los cuales son designados por números (Kenneth y C., 2011).

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae comúnmente conocida como Enterobacterias, filo Proteobacteria. Este microorganismo coloniza el tracto intestinal de humanos y animales pocas horas después del nacimiento. Es considerado habitual en la microbiota intestinal, sin embargo, existen algunas cepas que pueden ser patógenas y causar diversos cuadros clínicos tanto en humanos como en animales, entre los más comunes encontramos diarrea (Rodríguez-Angel & C, 2002; Gomes *et al.*, 2016).

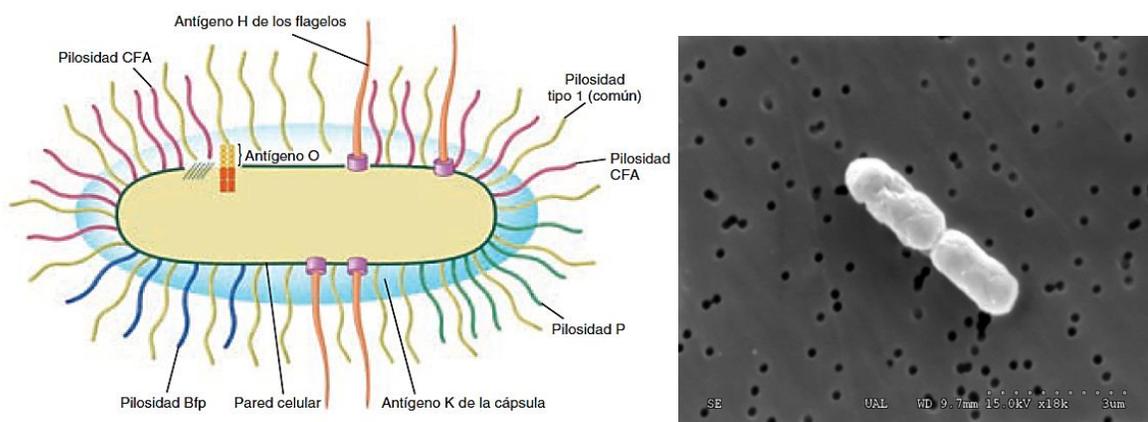


Figura 1. Estructura antigénica de *Escherichia coli* (tomada del libro Microbiología Medica de Kenneth y C., 2011) y fotografía a 18.000 aumentos (capturada por el Servicio de microscopia de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería)

Entre las cepas patógenas encontramos cepas intestinales y extraintestinales, dentro de las que ocasionan diarrea se destacan *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y con adherencia difusa (DAEC). La *E. coli* uropatógena (UPEC) es otra cepa importante, probablemente sea uno de los patógenos principales que causan pielonefritis y cistitis que en complicación puede llegar a provocar urosepsis. Han sido clasificadas así por sus diferentes propiedades como de virulencia, epidemiológicas, patogénicas, manifestaciones clínicas y su tratamiento (Bouzari, Jafari, & Aslani, 2012; Gomes *et al.*, 2016; Sukkua *et al.*, 1999).

2.1.1.2 Patogénesis y Patogenicidad

Son diversos los factores de virulencia de cepas patogénicas de *E. coli*, como la implicación de cápsulas, endotoxinas, estructuras encargadas de la colonización, enterotoxinas u otras sustancias (Quinn *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2016).

2.1.1.2.1 Polisacáridos capsulares

Algunas cepas de *E. coli* son capaces de producir polisacáridos capsulares, lo cuales obstruyen la captación fagocítica. El material de la cápsula es ligeramente antigénico, lo que disminuye o interrumpe totalmente la efectividad antibacteriana del sistema del complemento (Quinn *et al.* 2001; Gomes *et al.*, 2016).

2.1.1.2.2 Endotoxina

Es un componente lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de bacterias gram negativo, es liberado durante la muerte bacteriana. Se compone de un lípido A, polisacárido central y cadenas específicas laterales (Gomes *et al.*, 2016).

Al producir la enfermedad el LPS produce actividad pirogénica, daño endotelial que lleva a la coagulación intravascular diseminada y al shock endotóxico. Tales efectos son importantes en la enfermedad septicémica (Quinn *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2016).

2.1.1.2.3 Estructuras encargadas de la colonización

Estructuras como las adhesinas fimbriales se encuentran presentes en algunas cepas enteroxigénicas de *E. coli* las cuales son fundamentales para la adhesión a superficies de la mucosa intestinal y del tracto urinario inferior. Dicha adhesión facilita la colonización al minimizar los efectos expulsivos de los movimientos peristálticos y da un efecto enrojecido en la orina. Se han identificado diversas adhesinas, sin embargo, las más significativas que han sido reportadas que afectan a animales domésticos son K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6) y F41 (Quinn *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2016).

2.1.1.2.4 Enterotoxinas

Las características patológicas de la infección por *E. coli* además de ser atribuidas a las estructuras anteriormente descritas, de igual manera se cree que las enterotoxinas, verotoxinas, factores necrotizantes citotóxicos, entre otras sustancias, tienen un papel fundamental en la infección (Quinn *et al.*, 2001).

Toxinas lábiles (LT) también de tipo A-B. Su nombre está relacionado con su propiedad física de ser lábiles al calor, característica importante en su descubrimiento. La subunidad B presenta una fijación sobre la membrana celular, mientras que la subunidad A cataliza la ribosilación de ADP de la proteína G encontrada en la membrana celular de células epiteliales del intestino (Kenneth y C., 2011).

Toxina estable (ST) es una toxina de carácter peptídico la cual se une a un receptor en este caso una glucoproteína lo que activa a la enzima guanilato ciclasa encontrada unida a la membrana. El incremento de esta enzima en la concentración de guanósín monofosfato cíclico causa una elevación total en la secreción de líquido y electrolitos hacia el lumen intestinal, de igual manera como sucede con las LT (Kenneth y C., 2011).

La hemolisina α es una citotoxina formadora de poros, la cual se inserta en la membrana plasmática de diversos tipos de células hospedadoras ocasionando la expulsión del contenido plasmático y concluyendo con la muerte celular de formar similar a la toxina

α de *Staphylococcus aureus* (Kenneth y C., 2011). La producción de esta citotoxina generalmente se encuentra en algunas cepas de *E. coli* aisladas en cerdos con edema y diarrea (Quinn *et al.*, 2001).

El factor necrosante citotóxico (CNF) es una toxina AB que altera las proteínas G, modificando las vías de señalización intracelulares (Kenneth y C., 2011). Se han hallado dos tipos de factor necrosante citotóxico (CNF1 y CNF2), en cepas aisladas de casos clínicos de diarrea, septicemia e infecciones del tracto urinario, tanto en animales como en humanos (Quinn *et al.*, 2001).

Toxina Shiga (Stx) nombrada por el microbiólogo Kiyoshi Shiga, descubridor de *Shigella dysenteriae*. Anteriormente se creía que esta toxina era exclusiva de esta especie, sin embargo, se conoce que existen formas moleculares que son liberadas por cepas de *E. coli*. Es de tipo A-B, la subunidad B se une a un receptor específico Gb₃, presente en eucariotas y se interioriza en una vacuola endocítica. La subunidad A atraviesa la membrana vacuolar en la red trans-Golgi, sale al citoplasma y es modificada por enzimas en el sitio ribosomal RNA 28S de la subunidad 60S donde se une al acil-tRNA, bloqueando la síntesis de proteínas (Kenneth y C., 2011; Gomez *et al.*, 2016; Treacy *et al.* 2019).

2.1.1.2.5 Otras sustancias

Los sideróforos son moléculas de unión al hierro como la aerobactina y la enterobactina, estas son sintetizadas por ciertas cepas de *E. coli* cuando los niveles de este elemento son bajos en los tejidos, estas moléculas de unión ayudan a la supervivencia de la bacteria (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.1.3 Infecciones clínicas

Las enfermedades resultantes por dicha bacteria, han sido estudiadas en gran detalle en animales productores de alimentos, debido al riesgo de infección transmitida por alimentos hacia el consumidor (Gyles *et al.*, 2010).

En animales jóvenes la infección se limita en la zona intestinal (colibacilosis entérica y diarrea neonatal) también puede presentarse como septicemia (colisepticemia y colibacilosis sistémica) o toxemia (toxemia colibacilar). Las infecciones no entéricas se generan debido a una invasión oportunista lo cual puede afectar el tracto urinario (pielonefritis y cistitis), glándulas mamarias (mastitis) y útero (piometra y metritis) (Quinn *et al.*, 2001).

Tabla 1. *E. coli* implicada en enfermedades entéricas (Gyles L.C. *et al.*, 2010)

Especie	Enfermedad	Tipo de <i>E. coli</i>
Bovinos	· Diarrea neonatal	· STa ⁺ , K99 ⁺ , F41 ⁺ , ETEC
	· Diarrea/Disentería en 2-8 semanas de edad	· STEC de una amplia variedad de grupos O, en especial 5, 26, 111, 118
Porcinos	· Diarrea neonatal	· ETEC STa ⁺ , K99 ⁺ , F41 ⁺ · ETEC LT ⁺ , STb ⁺ O149:K88ac · ETEC LT ⁺ , STa ⁺ , STb ⁺ O149:K88ac
	· Diarrea post-destete	· ETEC LT ⁺ , STb ⁺ O149:K88ac · ETEC LT ⁺ , STa ⁺ , STb ⁺ O149:K88ac · ETEC F18 ⁺ O138 · ETEC F18 ⁺ O141 · EPEC de los grupos O: 45, 103
	· Enfermedad de edema	· STEC F18 ⁺ Stx2e ⁺ O139 · ETEC/STEC F18 ⁺ Stx2e ⁺ O138 · ETEC/STEC F18 ⁺ Stx2e ⁺ O141
Caninos	· Diarrea	· ETEC, principalmente STa ⁺ · EPEC
Conejos	· Diarrea	· EPEC de los grupos O: 2, 15, 103, 128, 132

2.1.1.3.1 Colibacilosis entérica

La transmisión de la cepa patógena vía oral, la colonización del intestino y la producción de toxinas son vitales para el desarrollo de la enfermedad. La cepa ETEC al unirse a receptores presentes en los enterocitos, coloniza el intestino delgado distal de animales recién nacidos. La cepa AEEC coloniza el intestino delgado y colón, dando origen a una necrosis en los enterocitos y a la fusión de las vellosidades (Quinn *et al.*, 2001).

En terneros la colibacilosis entérica se desarrolla los primeros días de vida. En lechones pueden presentarla dentro de las 24 horas post-nacimiento, la camada completa suele verse afectada. En corderos no es muy común (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.1.3.2 Colisepticemia

Las cepas septicémicas evaden las barreras y mecanismos de defensa del huésped. Llegan a invadir el torrente sanguíneo difundiéndose por todo el organismo, esto se genera después de haber colonizado intestinos, pulmones y/o tejidos umbilicales. La infección a menudo es aguda y mortal, entre los signos clínicos tempranos detectables se encuentran pirexia, depresión, debilidad, taquicardia, diarrea en algunos casos, en terneros y corderos comúnmente se detectan meningitis y neumonía. La infección post-septicémica se localiza en las articulaciones de terneros y corderos generando artritis, hinchazón, dolor y rigidez en los miembros afectados. Las aves de corral pueden padecer airaculitis y pericarditis después de la septicemia (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.1.3.3 Enfermedad del edema en cerdos

Es una toxemia que se presente entre la primera y segunda semana post-destete en cerdos. La enfermedad se puede generar debido a cambios en el manejo. Las cepas no invasivas se replican y producen VT2e, esta se absorbe en el torrente sanguíneo y daña las células endoteliales generando un edema perivascular. La aparición de la enfermedad es repentina, en algunas ocasiones el animal muere sin haber mostrado sintomatología. Dentro de los signos clínicos característicos se detecta paresia posterior, temblores musculares, edema en párpados y parte frontal de la cara (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.1.3.4 Diarrea post-destete

Como su nombre lo dice, esta enfermedad se presenta una o dos semanas después del destete, debido a los cambios de alimentación, manejo y el estrés post-destete. Los brotes están asociados a la cepa ETEC. Los signos clínicos varían, la enfermedad puede cursar afebril con inapetencia hasta diarrea acuosa en casos graves. Los animales afectados pueden morir repentinamente. Algunas veces la cepa VTEC puede estar implicada en estas situaciones (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.1.3.5 Mastitis por coliformes

En vacas lecheras la fuente de infección es por contaminación fecal en el área de la glándula mamaria y por un mal manejo en la ordeña. Animales con niveles bajos de células somáticas son más susceptibles. La fase aguda se caracteriza por endotoxemia y puede ser mortal. El signo clínico principal es la secreción acuosa o grumosa en los pezones, que generalmente se observa al ordeñar al animal. Los animales afectados se encuentran decaídos e inapetentes (Quinn *et al.*, 2001; Treacy *et al.* 2019).

2.1.1.3.6 Infección del tracto urogenital

Las infecciones ascendentes del tracto urinario ocasionadas por cepas uropatógenicas de *E. coli* resultan en cistitis y pielonefritis especialmente en perras. Las cepas oportunistas de *E. coli* que afectan el endometrio hiperplásico son un factor crítico en la patogénesis de la piometra canina. En perros la prostatitis está asociada a la invasión de estas mismas cepas (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.1.4 Características epidemiológicas

En la actualidad se conoce que el ganado es un portador asintomático y reservorio importante de cepas patógenas de *E. coli*. Este patógeno puede ser transmitido por alimentos contaminados como productos cárnicos y vegetales. Al habitar de forma natural el tracto gastrointestinal, hace que la materia fecal sea la principal fuente de contaminación. Los terneros son un importante reservorio para la transmisión de *E. coli* patógena a humanos (Kolenda *et al.*, 2015; Cheol *et al.*, 2013).

Los rumiantes como reservorios primarios tienen una prevalencia que oscila entre el 2% y 42%. La colonización y la evacuación de bacterias en heces se hacen más prominentes en los meses cálidos. La persistencia de la bacteria en el agua destinada al consumo para el ganado contribuye a la transmisión. *E. coli* O157: H7 es una cepa persistente puede durar años en la granja y capaz de producir verotoxinas (Scott *et al.*, 2006; Cheol *et al.*, 2013).

Durante décadas a la fecha esta agente zoonótico ha causado una serie de brotes epidémicos, afectando países como Estados Unidos, Canadá, Australia, en diversas regiones de Asia, Sudáfrica y algunas de Europa. Se estima que en Estados Unidos se generan alrededor de 75,000 casos y 50 muertes al año (Cheol *et al.*, 2013; Sukkua *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2016). En Inglaterra, en la isla Wight se detectaron en 2017 un total de siete casos (seis confirmados y uno probable) infectados con *E. coli* O157: H7 (Treacy *et al.* 2019).

Estudios realizados en diversos países en desarrollo mostraron que las cepas ETEC y EPEC son los principales causantes de diarrea en niños. En México, se estima que entre un 17 a 19% de los casos de niños con diarrea se encuentra involucrada la cepa EPEC. Por lo que uno de cada cinco niños enfermos de diarrea puede estar infectado con este patotipo. En otros países en desarrollo como Brasil y Chile, los datos son similares (Vidal & Canizález, 2007; Cheol *et al.*, 2013).

Existen múltiples variantes que dificultan el estudio epidemiológico de las diferentes cepas de *E. coli*, como regiones geográficas, periodos de tiempo, clase socioeconómica, entre otros (Sukkua *et al.*, 1999; Cheol *et al.*, 2013).

2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

2.1.2.1 Características generales

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es una bacteria oportunista, dentro de sus características bacteriológicas distintivas se encuentra la ausencia de motilidad y la presencia de una capsula hecha de polisacáridos. Esto da el aspecto brillante y mucoso a las colonias. Estudios sugieren que dicha capsula interfiere en la activación del complemento. Así mismo, en su estructura contiene diferentes tipos de pilosidades, lo cuales seguramente permitan la adherencia al epitelio de los aparatos respiratorio y urinario (Kenneth y C., 2011; Murray, Rosenthal & Pfaller, 2009).

La especie más común es *Klebsiella pneumoniae*, esta es capaz de causar neumonía lobular clásica, característico de las bacterias encapsuladas. Generalmente las neumonías generadas por este patógeno son indistinguibles de las producidas por otras enterobacterias. Las infecciones pueden ser letales debido a la resistencia de una gran variedad de antibióticos (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2009; Ullmann, 1998).

Esta bacteria habita en el tracto gastrointestinal, tiene una facilidad para propagarse rápidamente en el entorno por lo que tienden a causar brotes nosocomiales (Ullmann, 1998).

Su identificación es prácticamente fácil, se realiza a través de cultivos de laboratorio rutinarios a 37 ° C. En agar sangre las colonias se presentan grandes, mucoides y no son hemolíticas (McVey, Kennedy, Chengappa, 2013).

Tabla 2. Propiedades de *Klebsiella* (McVey, Kennedy, Chengappa, 2013)

Propiedad	<i>Klebsiella</i>
Fermentación de lactosa	+
Hidrolisis de urea	(+)
Utilización de citrato	(+)
Sulfuro de hidrógeno	-
Prueba de Voges-Proskauer	+
Motilidad	-
Especies comunes	<i>pneumoniae</i> y <i>oxytoca</i>

+ positivo, (+) muy positivo, - negativo

2.1.2.2 Patogénesis y patogenicidad

Se han identificado una serie de factores bacterianos que contribuyen a la patogénesis, con la finalidad de comprender el mecanismo de las enfermedades que genera *Klebsiella* spp. Se han obtenido modelos *in vitro* e *in vivo* de investigaciones realizadas sobre la interacción entre la bacteria y el huésped. Se han establecido modelos *in vivo* con animales de laboratorio específicamente con ratas y ratones, con la finalidad de estudiar la virulencia que tiene *Klebsiella* en infecciones del tracto urinario (UTI). Son cinco los factores (Fig. 2) que se centran en el estudio de la patogenicidad en *Klebsiella* (Ullmann, 1998).

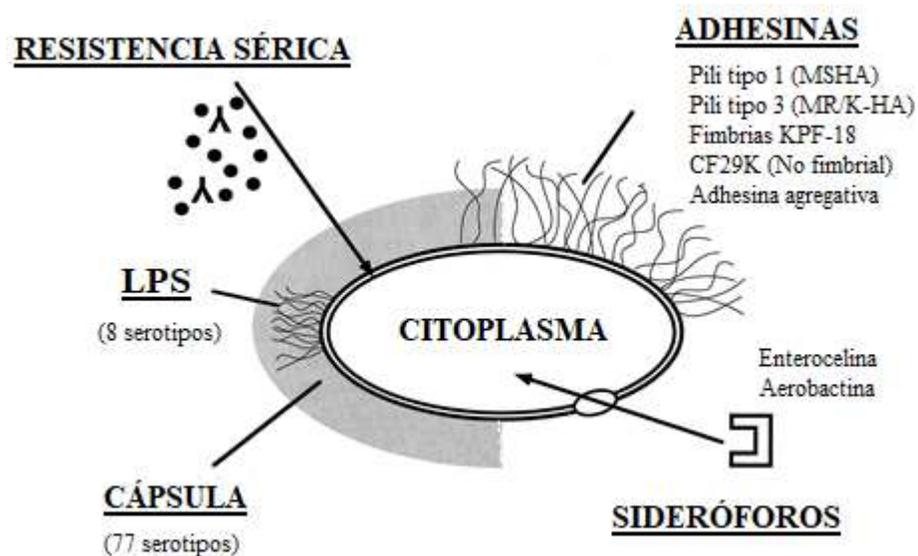


Figura 2. Esquema de los factores de patogenicidad de *Klebsiella* (Ullmann, 1998).

2.1.2.2.1 Antígenos capsulares

Las bacterias del género *Klebsiella* por lo general desarrollan cápsulas constituida por complejos polisacáridos. Se han definido más de 70 tipos capsulares. La capsula es esencial para la virulencia de *Klebsiella*. El material capsular forma haces de gran grosor cubriendo la superficie bacteriana, lo que protege a la bacteria de ser fagocitada por los granulocitos polimorfonucleares y previene la muerte bacteriana por medio de factores séricos bactericidas. Se cree que el mecanismo molecular se basa en la inhibición de la activación de componentes del complemento en específico C3b. Estudios *in vitro* han

mostrado que cepas con capsulas de tipo K1 y K2 son propensas a ser virulentas, aunque de los más de 70 antígenos K solo unos pocos han sido estudiados sistemáticamente (Williams, 1983).

2.1.2.2.2 Fimbrias

Uno de los puntos críticos para la supervivencia y colonización de la bacteria, es adherirse y mantenerse en la célula huésped. Para que esto se lleve a cabo la bacteria se ayuda de una de sus estructuras, el pili o también conocidas como fimbrias. Las enterobacterias se caracterizan por tener diferentes tipos de fimbrias, como las mencionadas en el apartado de *E. coli*. Estas estructuras tienen una longitud aproximada de 10 μm y un diámetro de 1-11 nm, están compuestas de proteínas globulares poliméricas. Estas fimbrias son clasificadas de acuerdo a su capacidad para aglutinar eritrocitos de diferentes especies, depende si la reacción es inhibida o no por D- manosa, si es inhibida se denominan hemaglutininas sensibles a la manosa por el contrario si estas no son inhibidas se les asignan resistentes a la manosa (MSHA y MRHA) respectivamente. En la bacteria *Klebsiella* se destacan dos tipos de fimbrias las tipo 1 y tipo 3 (Ullmann, 1998).

- Fimbria tipo 1 (común): Son MHSA, aglutinan eritrocitos de cobayos. La proteína de adhesión se encuentra en el eje fimbrial y se une a los trisacáridos de la manosa de las glicoproteínas del huésped. En infecciones urinarias estas estructuras se adhieren eficazmente a las células del túbulo proximal, mientras que en infecciones respiratorias las adherencias de las bacterias a las células del tracto respiratorio conducen a un deterioro de la resistencia a la colonización en vías respiratorias superiores con la proliferación posterior de bacterias patógenas facultativas desarrollando neumonía (Bagley, 1981).
- Fimbria tipo 3: Estas solo aglutinan eritrocitos tratados con tanino. Cepas de *Klebsiella pneumoniae* que expresan fimbrias de tipo 3 se adhieren a células endoteliales, epitelio del tracto respiratorio y células uroepiteliales. En infecciones urinarias, estas estructuras se adhieren a las membranas basales tubulares, las capsulas de Bowman y a los vasos renales (Clegg, 1987).

2.1.2.2.3 Lipopolisacárido (LPS)

En la actualidad aún no se encuentra bien definido el papel que tiene el LPS bacteriano sobre el sistema bactericida sérico del huésped. En el caso de *Klebsiella*, se han planteado dos hipótesis. La primera hipótesis establece que los polisacáridos en la capsula pueden servir como camuflaje cubriendo el LPS subyacente y exponer una estructura de superficie que no activa el complemento. Por otro lado, las cadenas O laterales del LPS pueden llegar a través de la capsula y exponerse al medio exterior en ciertas cepas. Dado que el LPS puede activar el complemento, C3b se deposita posteriormente sobre el LPS. Como preferentemente se fija en las cadenas O laterales más largas del polisacárido, C3b está lejos de la membrana bacteriana, así se evita la formación del complejo de ataque de la membrana lítica (C5b-C9) y no se producen daños a la membrana ni la muerte celular (Ullmann, 1998).

2.1.2.2.4 Sideróforos

El crecimiento bacteriano además de estar limitado por los mecanismos de defensa del huésped también está controlado por la disponibilidad de hierro, ya que este es un elemento dispensable para el crecimiento bacteriano y sirve como catalizador redox en proteínas participando en los procesos de transporte de oxígeno y electrones. El suministro de hierro disponible para las bacterias en el huésped es extremadamente bajo, debido a que este se encuentra unido intracelularmente a proteínas como hemoglobina, ferritina, hemosiderina, mioglobina y extracelularmente a lactoferrina y transferrina. Muchas de las bacterias intentan compensar la falta de hierro en el huésped mediante la secreción de quelantes de hierro de alta afinidad y bajo peso molecular nombrados como sideróforos. Estos son capaces de absorber competitivamente el hierro unido a las proteínas del huésped. Los quelantes sintetizados por las bacterias pertenecen a dos grupos químicos diferentes los sideróforos de tipo fenolato (más comunes como la enterocelina, sintetizado por enterobacterias) y los de tipo hidroxamato (ferrichromes, sintetizados por hongos) (Khimji *et al.*, 1978; Bullen, 1978).

2.1.2.3 Infecciones clínicas

Las enfermedades más comunes causadas por *Klebsiella pneumoniae* suelen ser neumonías e infecciones del tracto urinario. Algunas cepas de *K. pneumoniae* pueden causar infecciones graves como bacteremia (primario y/o secundaria) debido a la gran resistencia a antimicrobianos estas infecciones pueden llegar a ser letales (Paczosa, 2016).

2.1.2.3.1 Mastitis por coliformes

La gran mayoría de los patógenos participes en la infección de mastitis por coliformes deben cumplir ciertos requisitos: deben adherirse, invadir y colonizar el epitelio mamario. En casos específicos como de *K. pneumoniae* y *E. coli* parece ser que la adhesión no es tan importante en la patogenia de la enfermedad, ya que las bacterias coliformes suelen multiplicarse en las secreciones sin adherirse al epitelio mamario. Estas tienen la capacidad de aprovechar la lactosa de la leche como fuente energética, además de tener la capacidad de sobrevivir en ambientes anaeróbicos. En el periodo post-lactancia cuando la glándula mamaria involuciona, las secreciones tornan difícil el crecimiento y la multiplicación de las bacterias coliformes, esto debido a la escasez de hierro disponible durante el periodo seco, ya que se genera un aumento en las proteínas captadoras de hierro como la lactoferrina. La mastitis por *K. pneumoniae* afecta principalmente al ganado bovino productor de leche y tiene un impacto negativo sobre su producción, como consecuencia de infecciones resistentes a antibióticos las vacas no recuperan los niveles de producción completos después de la recuperación (Podder, 2014).

2.1.2.3.2 Endometritis

Klebsiella pneumoniae es un organismo oportunista que habita naturalmente en el aparato reproductor de diferentes especies. Las infecciones reproductivas ocasionadas por este patógeno oportunista se dan en la etapa final de la gestación, una vez que el canal de parto se comienza a abrir, el útero queda expuesto a los microorganismos que

habitan en los genitales, produciendo inflamación en la capa glandular del útero (Fernández, 2006; Sánchez, 2011).

2.1.2.3.3 Neumonía

K. pneumoniae se encuentra de forma natural en la nasofaringe, cuando la bacteria se introduce en los alvéolos, las primeras células que detectan la invasión son las epiteliales. El problema se origina cuando estas células de defensa no detectan dicha invasión. Se cree que la bacteria por su capsula se camuflajea y es así que evade a las células epiteliales, por lo que no se produce la entrada a la célula manteniéndose en los espacios libres, llenos de aire de los alveolos pulmonares, al menos en las primeras fases de la infección. La bacteria por medio de uniones celulares llega a tener acceso al endotelio y de ahí se disemina en el torrente sanguíneo. Utiliza el mismo mecanismo que las células de defensa para llegar desde la sangre hasta el tejido afectado. En condiciones normales estas uniones se encuentran cerradas, abriéndose solo cuando el tejido se encuentra inflamado con esto deja pasar a las células de defensa, lo que hace que la infección se disemine rápidamente (De Astorza, 2004). Se han reportado 15 casos de neumonía y sepsis en una criadora de perros Mastín de Burdeos (Greene, 2012).

2.1.2.3.4 Infecciones del tracto urinario

Para entender la uropatogénesis de *K. pneumoniae* es necesario definir los aspectos bacterianos que median la adherencia, la colonización y el crecimiento en células uroepiteliales y en instrumental hospitalario como catéteres que residen en el tracto urinario. Se han desarrollado modelos experimentales *in vivo* murinos de infecciones urinarias (IU) por enterobacterias pero aún no se ha implementado ningún modelo *in vivo* para imitar el cateterismo urinario. El crecimiento bacteriano en los catéteres urinarios es una de las principales causas por las que se desarrollan las IU. Otro de los factores se encuentra relacionado con la capacidad de *K. pneumoniae* de internalizarse en las células epiteliales y evitar los mecanismos de defensa del huésped. Las comunidades bacterianas intracelulares (IBC) referidas por *E. coli*, se ha observado que algunas cepas de *Klebsiella* tienen este fenotipo demostrando propiedades similares a

organismos que crecen como biopelículas. El aislamiento de *K. pneumoniae* uropatógena forman IBC en animales infectados experimentalmente, por lo que se deben implementar estrategias que tomen en cuenta esta característica para su eliminación eficiente del tracto urinario (Clegg, 2016).

2.1.2.4 Características epidemiológicas

Klebsiella spp tienen diversos hábitats, se puede encontrar en el medio ambiente como en aguas superficiales, aguas residuales, el suelo, plantas, en las superficies mucosas de humanos y mamíferos como equinos, porcinos, bovinos, entre otros. En humanos se encuentra de forma saprofita en la nasofaringe y en el tracto intestinal.

La tasa de enfermos por este organismo es variable de un estudio a otro. Se estima que *Klebsiella* spp. causa alrededor de un 8% de todas las infecciones bacterianas nosocomiales en los Estados Unidos y en Europa. No se han observado diferencias significativas en la frecuencia en diferentes zonas geográficas. En los Estados Unidos, *Klebsiella* es ubicada entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales y los datos reportados para el Reino Unido y Alemania tienen similitud a los reportados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Ullmann, 1998).

Estadísticas reportadas por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, *Klebsiella* representa un 3% de los brotes epidémicos. Las cepas multiresistentes a diferentes fármacos representan un riesgo en los hospitales. En la década de los 70's se encontraron cepas resistentes a los amino glucósidos. Desde 1982, las cepas que producen β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) han ido evolucionando afectando la acción de fármacos como las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. La característica especial de este organismo son las cepas resistentes a la ceftazidima, esto se ha observado en *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* (Burwen, 1994).

En Estados Unidos se han reportado casos de aislados de *Klebsiella* productores de BLEE, en donde el 5% fueron cepas de *K. pneumoniae* probadas den el sistema del Estudio Nacional de Infección Nosocomial. En Francia e Inglaterra se informa de un 14 a 16% de cepas productoras de BLEE en aislados clínicos de *Klebsiella*. La incidencia varía dependiendo de regiones y hospitales, se han reportado regiones con hasta 25 a 40% (Jacoby, 1996).

2.1.3 *Proteus mirabilis*

2.1.3.1 Características generales

Es un bacilo gram negativo anaerobio facultativo, tiene la capacidad de producir aglutinación, ureasa y motilidad en placas de medio de cultivo. Pertenece a la clase Gammaproteobacteria, es miembro del orden Enterobacteriales y de la familia Enterobacteriaceae. Un grupo de investigadores realizaron un estudio en donde reconstruyeron el árbol filogenético basándose en proteínas centrales compartidas, proteínas ribosomales, y cuatro de análisis de secuencia multilocus y propusieron reclasificar a *Proteus mirabilis* y colocarlo dentro de la familia de Morganellaceae (Armbruster Mobley & Pearson, 2018).

Este bacilo puede ser encontrado en una amplia variedad de entornos incluidos los suelos, fuentes de agua y aguas residuales, además es un comensal del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Es capaz de generar diferentes infecciones incluyendo heridas, oculares, del tracto gastrointestinal y sobre todo en el tracto urinario (Wenner & Rettger, 1919).

Proteus mirabilis es uno de los principales agentes causales de pielonefritis, urolitiasis, prostatitis e infecciones del tracto urinario asociadas con catéter (CAUTI) en humanos. En caninos y equinos causa infecciones del tracto urinario, aunque también ha sido asociado en canidos con casos de otitis externa (Quinn *et al.*, 2001; Armbruster & Mobley, 2012).

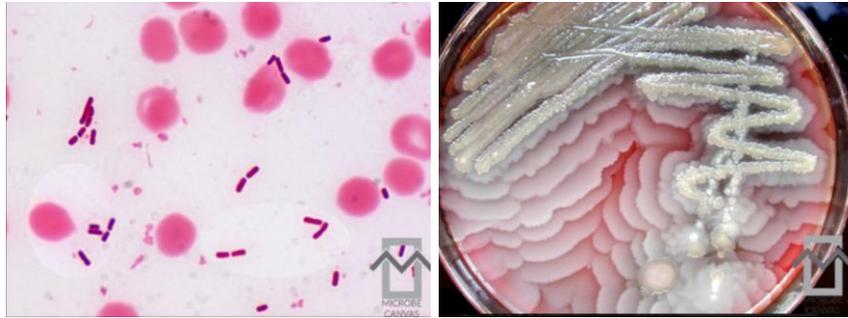


Figura 3. (Izq.) *Proteus mirabilis* vista desde un microscopio óptico y (der) crecimiento en forma de “swarming” (Versalovic et al., 2011).

2.1.3.2 Patogénesis y patogenicidad

Diversos son los factores de virulencia de *Proteus* spp., sin embargo, existen ciertas determinantes que han permitido el desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* para comprender más el mecanismo de acción de esta particular bacteria.

2.1.3.2.1 Ureasa

Es una metaloenzima de níquel, cada unidad contiene tres subunidades estructurales (UreA, UreB y UreC) se encuentran ensambladas armónicamente como un homotrímero de heterotrímeros. Al exponerse a la urea se induce su síntesis. Para volverse catalíticamente activa debe adquirir iones divalentes de níquel a través de un proceso que involucra ciertas proteínas accesorias, las UreD, UreE, UreF y UreG (Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

2.1.3.2.2 Sistemas de secreción

Estudios han encontrado que *P. mirabilis* secreta proteínas a través de sistemas de tipo I, II, III, IV, V y VI, así mismo utiliza Sistemas generales de secreción o Sistemas Sec y Sistema TAT (por sus siglas en inglés Twin Arginine Targeting). Estas vías son previstas por medio de análisis de secuenciación genómica (Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

2.1.3.2.3 Toxinas

Se han registrado diversos tipos de toxinas reveladas por la cepa de *P. mirabilis* HI4320, sin embargo, solo a tres se les ha atribuido el papel de virulencia.

Las principales toxinas secretadas por *P. mirabilis* son las hemolisinas, estas son toxinas secretoras formadoras de poros que se inserta en las membranas celulares de eucariotas, como consecuencia causan el escape de iones de sodio y generan un daño celular. Para el género de *Proteus* se han identificado dos tipos de hemolisinas, la dependiente de calcio (similar a Hemolisina α de *E. coli*) y la independiente de calcio (Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

La aglutinina tóxica de *Proteus* (Pta) fue identificada inicialmente como una proteína superficial de la membrana externa reconocida por el sistema inmune murino. Pta es una proteína de 120 kDa que se procesa catalíticamente para convertirse en una proteína activa de 110 kDa de la membrana externa. Se le atribuye la colonización de la vejiga y riñones en modelos murinos. Se considera la toxina más potente durante la infección experimental (Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

Otra toxina importante es la metaloproteasa zapA, esta proteasa de 55 kDa pertenece a la familia serralisina, codificada por zapA. Inicialmente se pensaba que era una proteasa IgA, pero se determinó que es capaz de dividir IgA, IgG, componente secretor, péptidos antimicrobianos hBD1 y LL-37, proteínas del complemento C1q y C3, fibronectina, actina, colágeno, laminina y caseína (Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

2.1.3.2.4 Fimbrias y adhesinas

Las bacterias Gram negativas producen un conjunto de fimbrias denominadas acompañantes de chaperones por su método de secreción y de adherencia. *P. mirabilis* HI4320 codifica 17 operones fimbriales. Aunque su función aun no esté bien establecida, la transcripción se ha detectado en los 17 operones y la mayoría de las fimbrias están codificadas por diferentes aislados de *P. mirabilis*. Este género de bacteria es capaz de producir diversos tipos de fimbrias (Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

2.1.3.2.5 “Swarming” factor de virulencia

Componentes como la ureasa, la proteasa Zapa y la hemolisina son inducidas durante el efecto de swarming de *Proteus*. Se ha detectado que la capacidad del swarming es más

relevante en pacientes humanos cateterizados, debido a la capacidad de este microorganismo de escurrirse a través de catéteres elaborados de silicona o látex. El papel del swarming en la virulencia de *Proteus* es debatible, estudios han encontrado que cepas de *P. mirabilis* no móviles son completamente virulentas, lo que sugiere que el swarming puede no estar directamente relacionado a la virulencia de la UTI (Schaffer *et al.*, 2015).

2.1.3.3 Infecciones clínicas

La principal infección que causa el género de *Proteus* en animales especialmente canidos es la del tracto urinario. Frecuentemente se dan casos clínicos en donde la cepa no es susceptible a los antimicrobianos comunes, por lo que se complica la infección y el tratamiento (Marques *et al.*, 2018).

2.1.3.3.1 Infección del Tracto Urinario (UTI)

Dentro de las infecciones sintomáticas del tracto urinario que causa *P. mirabilis* se incluyen cistitis, pielonefritis, prostatitis y en algunos casos puede causar urolitiasis. Estas bacterias pueden causar bacteremia y sepsis urinaria que puede ser fatal para el paciente y en complicaciones puede conducir a la muerte (Schaffer *et al.*, 2015).

Este microorganismo como ya se mencionó anteriormente, habita en el tracto gastrointestinal de animales y humanos por lo que se cree que la mayoría de las UTI causadas por este comensal oportunista se deben al paso de bacterias del tracto gastrointestinal al urinario. Otras formas de contagio es la de transmisión de persona a persona, persona en contacto con animales y nosocomiales (Schaffer *et al.*, 2015; Armbruster, Mobley & Pearson, 2018).

2.1.3.3.2 Otitis externa

La otitis externa no es más que una inflamación del canal auditivo que puede ser aguda o crónica. Las infecciones de oído son ocasionadas por diversos factores, primeramente pueden ser mecánicos por la presencia de cuerpos extraños, por hipersensibilidades o enfermedades autoinmunes, desordenes de queratinización, casos iatrogénicos, predisposición en ciertas razas, presencia de microorganismos como hongos, levaduras,

bacterias y parásitos. Estos últimos, por lo general son factores secundarios comunes que pueden mantenerse y empeorar la infección. Dentro de las bacterias gram negativo las más frecuentes son *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, por el lado de las gram positivo se encuentra *Staphylococcus* spp. *Proteus mirabilis* se encuentra con más frecuencia en casos de otitis crónicas (Soler *et al.*, 2000; Pulido *et al.*, 2010; Behera *et al.*, 2016; Pietschmann *et al.*, 2013).

2.1.3.4 Características epidemiológicas

En caninos y felinos la presentación de infecciones bacterianas del tracto urinario es un problema clínico de gran importancia, ocurre aproximadamente entre el 12-14% en perros y el 1% en gatos, la mayoría de los individuos padecen de este problema en algún punto de su vida. Las infecciones del tracto urinario persistentes son diagnosticadas hasta un 4-5% en casos de pacientes caninos con signos clínicos (Petreigne, 2017).

Las bacterias gram negativas frecuentemente aisladas en las UTI son *E. coli* y *P. mirabilis*, mientras que *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. son las gram positivas más comunes. Dichas bacterias aisladas (cepas BLEE, cefalosporinas AmpC y resistencia bifuncional de alto nivel de la gentamicina HLGR) de casos clínicos de perros y gatos presentan mecanismos de resistencia a antimicrobianos y pueden ser un riesgo epidemiológico de relevancia tanto humana como veterinaria. Debido a que los reportes de bacterias multiresistentes en perros y gatos han incrementado en los últimos años, se ha tenido que enfrentar a desafíos terapéuticos que a menudo requieren del uso de antimicrobianos de importancia crítica en humanos (Schaffer *et al.*, 2015).

En un estudio reciente en humanos realizado en Canadá, *P. mirabilis* fue el agente causal del 4% de aproximadamente 3,000 casos reportados de ITU. En 2006, 11 millones de visitas al médico en Estados Unidos, fueron por infecciones del tracto urinario generando así un costo total de \$ 3.5 millones de dólares. La mayor incidencia de *P. mirabilis* se genera en pacientes geriátricos que se encuentran cateterizados por largos periodos de tiempo. Esta bacteria también es común en los casos de bacteriemia en pacientes con ITU concurrente. Se encontró que entre el 5-20% de estos casos son

causados por *P. mirabilis* con una tasa de mortalidad del 50% en personas de la tercera edad (Schaffer *et al.*, 2015).

Por otro lado, la incidencia de otitis externa en perros es del 10-20% mientras que en gatos esta entre 2-10%. Se cree que un 20% de las consultas veterinarias son por problemas óticos, del cual el 40% de los casos están relacionados con otitis externas (Pulido *et al.*, 2000, Behera *et al.*, 2016).

2.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.4.1 Características generales

Los miembros del genero *Pseudomonas* son bacterias gram negativo aeróbica obligada. Existen alrededor de 200 especies de *Pseudomonas*, sin embargo, la más importante dentro de este grupo para la medicina veterinaria se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*. Estos microorganismos tienen un tamaño entre 1.5-5.0 μm por 0.5-1.0 μm (McVey *et al.*, 2013).

P. aeruginosa tiene la capacidad de oxidar carbohidratos, la mayoría de los aislamientos son oxidasa y catalasa positivo. Son móviles gracias a sus flagelos polares, no requieren requisitos especiales de crecimiento, se desarrollan bien en agares rutinarios como el agar MacConkey a temperaturas de 4-41 °C. Esta bacteria produce pigmentos detectables en ciertos agares (Quinn *et al.*, 2001; McVey *et al.*, 2013).

El hábitat de las especies de *Pseudomonas* es el medio ambiente, se pueden encontrar mundialmente en fuentes de agua, suelo y plantas. *P. aeruginosa* se puede encontrar en piel, membranas mucosas y heces de animales y humanos. Este microorganismo patógeno puede causar una serie de infecciones oportunistas, aunque la mayoría son secundarias a las defensas comprometidas del huésped (Quinn *et al.*, 2001).

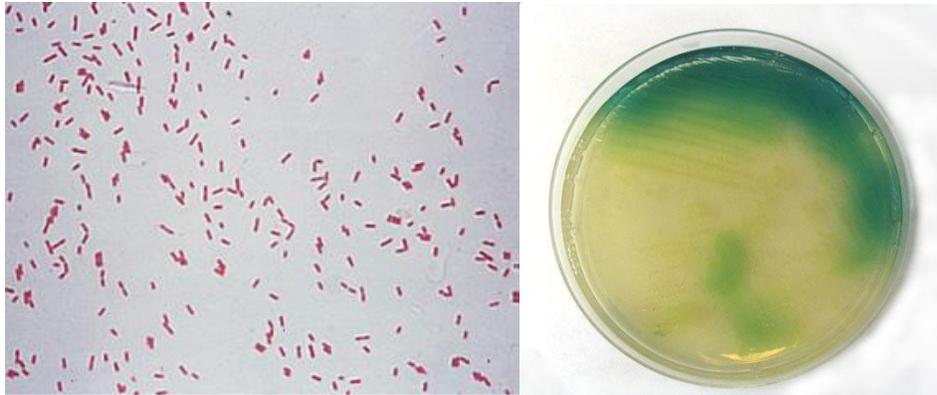


Figura 4. (izq.) Tinción de gram de *Pseudomonas aeruginosa* por Kenneth Todar y (der) agar de aislamiento de *Pseudomonas* por Environmental Microbiology Laboratory, Inc.

2.1.4.2 Patogénesis y patogenicidad

P. aeruginosa como patógeno oportunista posee una virulencia particular. Este microorganismo para iniciar la infección necesita de alguna alteración en las primeras líneas de defensa como una herida o una vía para esquivarlas como alguna solución contaminada o una sonda endotraqueal (Kenneth & C., 2011).

2.1.4.2.1 Flagelos y pili

P. aeruginosa posee solo un flagelo polar y varios pili de tipo 4, localizados en un polo de la célula. Estas elongaciones proteicas funcionan como adhesinas y como los principales medios de motilidad, también se ha detectado que pueden provocar una respuesta inflamatoria. El flagelo proporciona motilidad mediante movimientos giratorios como los de un sacacorcho, formando parte esencial de la quimiotaxis bacteriana. El primer paso para generar una infección es la unión de la bacteria a las células epiteliales, se cree que esto se genera con la ayuda de las pilosidades, flagelos y los polisacáridos extracelulares. La bacteria puede adherirse a través de la unión de su flagelo al glucolípidido asialo GM1y puede provocar una fuerte respuesta mediada por NFκB a través de la señalización de TLR5 y por una respuesta mediada por caspasa-1 a través del dominio de oligomerización de nucleótidos como receptor (Nod-como receptor o NLRs). Los pili tipo 4 son importantes adhesinas y se encuentran

involucradas en la motilidad de contracción y formación de biopelículas o biofilms (Gellatly & Hancock, 2013, Mulcahy, Isabella & Lewis, 2013).

2.1.4.2.2 Sistemas de secreción tipo 3 (T3SS)

Los sistemas de secreción tipo 3 se encuentra en diferentes géneros de bacterias patógenas gram negativo, es utilizado para inyectar las toxinas directamente en las células del huésped. Este sistema es un determinante importante en la virulencia de *P. aeruginosa* y su expresión se asocia con infecciones agudas y se ha determinado una mayor mortalidad en pacientes infectados. El T3SS tiene aspecto de un apéndice en forma de aguja, permite la translocación de proteínas efectoras de la bacteria a la célula huésped. Se han identificado solo cuatro efectores ExoY, ExoS, ExoT y ExoU (Gellatly & Hancock, 2013).

2.1.4.2.3 Sensores de quórum y biopelícula

El sensor de quórum es un mecanismo que permite la adaptación coordinada de una población bacteriana a los cambios ambientales. Esta mediada autoinductores (pequeñas moléculas difusibles de membrana), las cuales son producidas por cada bacteria y actúan como cofactores reguladores transcripcionales específicos cuando alcanzan concentraciones de umbral altos. La concentración de estas partículas es proporcional al número de bacterias, de tal forma que cuando aumenta a una masa crítica (quórum), y la concentración de autoinductores se vuelve suficiente para provocar la activación de genes específicos en la cadena descendente, resultando en una respuesta coordinada en toda la población bacteriana. *P. aeruginosa* produce tres autoinductores, dos de estos son acil-homoserina-lactonas (AHL): la 3-oxododecanoil-homoserina-lactona (3-oxo-C12 HSL) y la butiril homoserina lactona (C4 HSL). El tercer autoinductor es una 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona. La supervivencia celular, la formación de biofilms y la virulencia están reguladas por estos tres sistemas Las biopelículas son poblaciones de bacterias altamente organizadas y estructuradas unidas entre sí a una superficie, su formación está estrechamente relacionada a QS (Gellatly & Hancock, 2013).

2.1.4.2.4 Proteasas

Varias proteasas son secretadas por *P. aeruginosa*, se ha establecido que tienen funciones en las infecciones oculares y en la sepsis donde tienen la capacidad de degradar proteínas como inmunoglobulinas y fibrina, alterando las uniones epiteliales.

P. aeruginosa puede producir dos elastasas LasA y LasB reguladas por el sistema de sensor quórum y se secretan por sistemas tipo 2 (Gellatly & Hancock, 2013).

2.1.4.2.5 Lipopolisacárido (LPS)

Es un glucolípido complejo que forma la capa externa de la membrana celular y desempeña un papel importante en la antigenicidad, respuesta inflamatoria, la exclusión de moléculas externas y la mediación de interacciones con los antibióticos. *P. aeruginosa* produce un LPS de tres dominios que se conforma por un lípido A anclado a la membrana, una región central, y un polisacárido específico O también llamado antígeno O (Gellatly & Hancock, 2013, Mulcahy, Isabella & Lewis, 2013).

2.1.4.3 Infecciones clínicas

Pseudomonas aeruginosa se encuentra presente en una amplia variedad de infecciones oportunistas. Puede producir infecciones por heridas de quemaduras, heridas abiertas, vías urinarias, dermatológicas, oculares, respiratorias y reproductivas (Quinn *et al.*, 2001; Kenneth & C., 2011).

2.1.4.3.1 Infecciones reproductivas

La mastitis bovina asociada a este patógeno a menudo es relacionada con agua contaminada utilizada en la limpieza de la ordeña o con el uso de antibióticos intramamarios contaminados (Gyles L.C. *et al.*, 2010).

En equinos se relaciona con metritis (vaginitis) secundaria a un tratamiento prolongado con agente antimicrobianos, queratitis y conjuntivitis después del tratamiento de úlceras corneales con mezclas tópicas de antibióticos y esteroidales (Quinn *et al.*, 2001; McVey *et al.*, 2013).

2.1.4.3.2 Infecciones respiratorias

La neumonía hemorrágica y la septicemia causada por *P. aeruginosa* se producen esporádicamente en el visón con tasas de mortalidad de hasta 50% en algunos brotes (Quinn *et al.*, 2001; Gyles L.C. *et al.*, 2010).

2.1.4.3.3 Infecciones dermatológicas

En ovejas la podredumbre de vellón es una afección relacionada con las intensas lluvias, se han registrados casos en Reino Unido y Australia, en regiones con climas extremadamente húmedos. La maceración de la epidermis después de la penetración de agua en el vellón permite la colonización de *P. aeruginosa* lo que resulta en una dermatitis supurativa. La piocina (pigmento verde azulado) decolora la lana (Gyles L.C. *et al.*, 2010; McVey *et al.*, 2013).

2.1.4.3.4 Otitis

La infección por *P. aeruginosa* se asocia con otitis externa e infecciones oculares ocasionales en canidos y en menor porcentaje en félidos. Generalmente se presentan los pacientes con temblores o rasguños en la cabeza, exudados purulentos, mal olor, hinchazón, inflamación y dolor. La otitis externa y media a menudo se diagnostican juntas, incluso si la membrana timpánica se encuentra intacta, se pueden encontrar diferentes especies bacterianas con distintas susceptibilidades a antibióticos. En algunas ocasiones la terapia inicial puede fallar o la otitis puede reaparecer tras un tratamiento exitoso. En estos casos se recomienda realizar pruebas de laboratorio para seleccionar el antibiótico apropiado. A sí mismo, se han registrado casos de otitis externa/ media y rinitis purulenta en ovejas de un rebaño que habían sido bañadas con agua reutilizada (Gyles L.C. *et al.*, 2010).

2.1.4.3.5 Cistitis

En canidos y félidos *P. aeruginosa* puede generar infecciones oportunistas del tracto urinario inferior, incluyendo cistitis (Quinn *et al.*, 2001; McVey *et al.*, 2013).

2.1.4.3.6 Otras

P. aeruginosa puede llegar a causar infrecuentemente septicemia en animales inmunocomprometidos, pero en humanos con quemaduras, leucemia o fibrosis quística, es causa frecuente de bacteriemia (Gyles L.C. *et al.*, 2010; Kenneth & C., 2011).

2.1.4.4 Características epidemiológicas

Ambientes húmedos con poca ventilación son favorables para *P. aeruginosa*. En hospitales específicamente en áreas de cirugía dentro de bolsas esterilizadas, en mangueras de máquinas anestésicas y/o en soluciones desinfectantes que no se han limpiado y secado adecuadamente, es común aislar a este microorganismo (McVey *et al.*, 2013;).

En personas sanas entre 2-10% se ha aislado *P. aeruginosa* en faringe y heces. Las tasas de colonización aumentan en individuos hospitalizados e inmunocomprometidos. Tiene la capacidad de sobrevivir y proliferar en agua con escasos nutrientes, haciendo que la contaminación de líquidos no estériles sea sencilla, un ejemplo serían los humidificadores de respiradores mecánicos. La inhalación de aerosoles de dichos orígenes puede darle la capacidad de esquivar las primeras barreras de defensa e iniciar una infección pulmonar (Kenneth & C., 2011).

Un 30% de la población porta *P. aeruginosa* en su piel y en la mucosa intestinal. Esta bacteria se asocia con infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística y representa una alta mortalidad en casos pediátricos como infecciones subyacentes a enfermedades hemato-oncológicas, cirugías cardiovasculares, hospitalizaciones prolongadas, malformaciones intestinales y prematuridad. Se ha reportado una incidencia de bacteremia entre el 0.09-3.8% casos por cada 1,000 pacientes presentándose más en niños con enfermedades subyacentes (Morales *et al.*, 2017).

P. aeruginosa presenta resistencia a una variedad de antibióticos sobre todo a los carbapenémicos, lo que representa un desafío para los médicos y químicos farmacéuticos. En las últimas décadas se ha presentado una diseminación de cepas resistentes y multiresistentes por todo el mundo. Un estudio europeo de 2009 dio a conocer una incidencia del 25.6%, mientras que un estudio realizado en España mostró el 16.4%, en donde el 10.8% eran cepas multiresistentes (Hernández *et al.*, 2018).

En programas europeos de vigilancia epidemiológica muestran que *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos gram negativo más frecuentemente aislado en hospitales. Los factores de riesgos más importantes para el desarrollo de infecciones nosocomiales son las asociadas a hospitalizaciones prolongadas, enfermedades subyacentes y procedimientos quirúrgicos (Morales *et al.*, 2017).

2.1.5 *Staphylococcus aureus*

2.1.5.1 Características generales

El género de estafilococos está conformado por bacterias en forma de cocos, son gram positivos y miden aproximadamente 1 µm de diámetro, tiende a observarse en grupos irregulares dando un aspecto a racimo de uvas. Existen alrededor de 30 especies de *Staphylococcus* que son comensales en la piel y mucosas, aunque algunos pueden actuar como patógenos oportunistas causando infecciones piógenas. *S. aureus* es anaeróbico facultativo productor de coagulasa, catalasa negativo, es inmóvil y no produce esporas (Quinn *et al.*, 2001; Kenneth & C., 2011; McVey *et al.*, 2013).

La pared celular de *S. aureus* consiste en un peptidoglucano entrelazado con cantidades considerables de ácido teicoico. El peptidoglucano generalmente se encuentra cubierto de polisacáridos y proteínas de superficie (Kenneth & C., 2011).

La identificación de *S. aureus* es por medio del cultivo en agar sangre, donde se producen colonias blancas que tienden a adquirir un color entre crema y dorado. Gran parte de las cepas muestran un aro beta hemolítico transparente alrededor de las

colonias. Una de las pruebas más importantes para distinguir entre *S. aureus* de otras especies, es la prueba de coagulasa, esto puede realizarse incubando estafilococos en plasma o se puede realizar en una gota de agua mezclada con plasma, combinada con una emulsión densa de *S. aureus*; esto causa una fijación directa del fibrinógeno por el factor de aglutinación en la superficie de las células bacterianas (Kenneth & C., 2011).

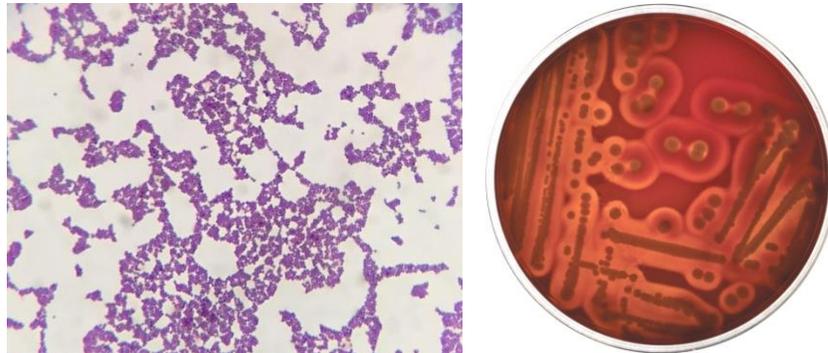


Figura 5. (Izq.) Tinción de gram de *Staphylococcus aureus* y (der) colonias hemolíticas en agar sangre (McVey *et al.*, 2013).

2.1.5.2 Patogénesis y patogenicidad

Los estafilococos son bacterias piógenas que a menudo causan lesiones supurativas. La importancia patógena de varios factores de virulencia es incierta, aunque algunos están mediados por el plásmido-fago y otros están codificados por el genoma de estafilococos. El polisacárido capsular, los ácidos teicoicos y la proteína A, son estructuras que interfieren con la opsonización y la posterior fagocitosis. Las proteínas de pared celular bacteriana, que se unen a la fibronectina y al fibrinógeno, pueden facilitar la unión a los tejidos dañados. El grado de patogenicidad está relacionado con la producción de coagulasa, la actividad de la ADNasa y la producción de proteína A (Quinn *et al.*, 2001; Kenneth & C., 2011).

2.1.5.2.1 Infección primaria

La infección comienza con la adherencia de *S. aureus* a las células huésped, esto es mediado por una variedad de proteínas superficiales bacterianas. Las proteínas fijadoras de fibronectina (FnBP) regulan la adhesión y probablemente la invasión en células de mamíferos. Esto permite que *S. aureus* persista y produzca citolisinas como toxina α , dañando así las células hospedadoras. Al avanzar la infección comienzan otras proteínas

a enlazarse con el colágeno y otros elementos de la matriz extracelular. En este paso se produce Clf fijador de fibrinógeno, proteína antifagocítica A, combinado con la continua producción de toxina α , lo que genera una inhibición de la actividad fagocítica del hospedador, permitiendo que *S. aureus* se multiplique y que la lesión se expanda (Kenneth & C., 2011).

2.1.5.2.2 Infección mediada por toxinas

S. aureus es capaz de producir toxinas un claro ejemplo es en la intoxicación alimenticia por estafilococo. Las bacterias contaminantes producen exotoxinas pirógenas que pueden iniciar su acción enterotóxica en el intestino horas después de ingerirlas. Por otro lado, en el caso del síndrome estafilocócico de la piel escaldada la producción de toxina exfoliante se genera después de unos días y puede ejercer su acción a nivel local o sistémico. Hasta el momento se han identificado cuatro toxinas citolíticas la α , β , δ y γ . (Kenneth & C., 2011).

2.1.5.2.3 Toxina α

Es una de las toxinas citolíticas más importante que secretan la gran mayoría de cepas estafilocócicas. Esta es responsable de formar poros transmembranales que lisan la membrana citoplasmática celular del huésped, mediante la inserción directa en bicapa lipídica. Esto permite la salida de moléculas vitales para la célula huésped, provocando así la muerte celular (Kenneth & C., 2011).

2.1.5.2.4 Exfoliatina

S. aureus produce una Exfoliatina que se enlaza a un gangliósido específico de la membrana celular que solo se encuentra en el estrato granuloso de la epidermis queratinizada de niños y en pocos adultos. En este sitio ocasiona la división intercelular de la epidermis entre el estrato espinoso y granuloso (Kenneth & C., 2011).

2.1.5.2.5 Toxinas superantigénicas (SAg)

Son una familia de proteínas secretadas que pueden estimular efectos sistémicos al ser absorbidas por el tracto intestinal. Se han descrito alrededor de 15 toxinas

superantigénicas en estafilococos (StaphSAg). Las más importantes son las variantes antigénicas conocidas como enterotoxinas estafilocócicas y la causante del síndrome del choque tóxico (TSST-1) recientemente descubierta. Las StaphSAg son semejantes en cuanto actividad biológica y fisicoquímica a los StrepSAg de estreptococos del grupo A (Kenneth & C., 2011).

2.1.5.2.6 Enterotoxinas

Tienen la capacidad de producir síntomas gastrointestinales (vómitos) en humanos y animales. Existen diversas proteínas antigénicas diferentes en esta clase. Al formarse las toxinas son relativamente estables y retienen su actividad aun después de pasar por procesos de cocción o al exponerse a enzimas gástricas e intestinales. Este grupo de toxinas parece ser que actúan mediante la estimulación de reflejos viscerales abdominales, que se transmiten a los centros eméticos bulbares en el tronco encefálico a través del nervio vago (Kenneth & C., 2011).

2.1.5.3 Infecciones clínicas

S. aureus es una bacteria comensal, que generalmente se encuentra en la piel, membranas mucosas y como contaminantes ambientales. Las infecciones pueden ser de origen endógeno o exógeno, muchas veces se encuentran asociadas con traumatismos, pacientes inmunocomprometidos, infecciones subyacentes como parasitarias y/o fúngicas, hipersensibilidades, alteraciones endocrinas o metabólicas. En animales domésticos provoca una variedad de enfermedades (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.5.3.1 Mastitis por *S. aureus*

Es una enfermedad que afecta principalmente al ganado productor de leche a nivel mundial. La infección puede ser subclínica, aguda o crónica. Las formas agudas y gangrenosas se asocian a reacciones sistémicas y pueden llegar a ser mortales. En la infección gangrenosa el cuarto afectado se puede apreciar entre un color azul oscuro a negro, finalmente la zona afectada se desprende. La necrosis es atribuida a la toxina α , causando una contracción en el tejido liso y en las paredes de los vasos sanguíneos,

impidiendo el flujo de sangre adecuado en el cuarto afectado (Quinn *et al.*, 2001; Nagasawa *et al.*, 2017).

2.1.5.3.2 Piaemia por garrapatas

La piaemia por garrapatas es una infección que afecta a corderos en pastoreo, se han reportado casos en Gran Bretaña e Irlanda donde habitan garrapatas *Ixodes ricinus*.

La garrapata al picar al hospedador para alimentarse, ocasiona un leve traumatismo en la piel y da origen a la infección por *S. aureus*, recordando que este microorganismo es un comensal que habita la piel tanto de humanos como de animales. *Ixodes ricinus* actúa como vector de *Rickettsia* y *Ehrlichia phagocytophila*, lo que puede generar una inmunosupresión en el hospedero y predisponerlo a la infección por *S. aureus*. La piaemia se caracteriza por provocar septicemia, abscesos localizados y muerte. Entre los signos clínicos se encuentra artritis, paresia posterior y mala circulación (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.5.3.3 Enfermedad de extremidades en aves

Esta bacteria ocasionalmente puede provocar osteomielitis, artritis, sinovitis y condronecrosis en extremidades de aves de corral. Esta última es más común en aves en crecimiento. Una vez que *S. aureus* ingresa al sistema, se sitúa en las placas de crecimiento óseas provocando una alteración en la vascularización y comienzan a formar pequeños abscesos que resultan en la necrosis del hueso (Gyles *et al.*, 2010).

2.1.5.3.4 Botriomicosis

Es una infección granulomatosa supurativa crónica ocasionalmente causada por *S. aureus*. Se puede provocar por malos cuidados post-quirúrgicos, en equinos puede resultar de una castración en donde se infecta el muñón del cordón espermático, se puede detectar a unas pocas semanas de la intervención. La botriomicosis también puede afectar el tejido mamario de cerdas con crías. La lesión consiste en una masa de tejido fibroso que contiene secreción purulenta (Quinn *et al.*, 2001).

2.1.5.3.5 Otras infecciones

S. aureus algunas veces puede ser aislado en casos de pioderma, otitis externa y otras infecciones supurativas, como endometritis, cistitis e infecciones dermatológicas en animales domésticos como canidos y félidos (Quinn *et al.*, 2001; Gyles *et al.*, 2010).

2.1.5.4 Características epidemiológicas

La distribución geográfica de este microorganismo es prácticamente global, ya que lo encontramos naturalmente en la piel, tracto respiratorio superior, gastrointestinal y urogenital. La infección se puede originar por medio de alimentos contaminados o por contacto con individuos infectados. (Gyles *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2015).

En explotaciones extensivas de ganado productor de leche *S. aureus* representa un riesgo importante, ya que afecta en la productividad de los animales provocando infecciones como mastitis y metritis post-parto. Lo que se traduce en pérdidas económicas para los ganaderos ya que afecta la producción láctea total y aumenta el puerperio (días abiertos) retardando las temporadas de empadre (Monecke *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2015).

La incidencia poblacional de *S. aureus* es de alrededor de 10 a 30 de 100,000 personas al año. Las tasas de ingreso hospitalario e intervenciones invasivas aumentaron exponencialmente en un estudio realizado en Dinamarca. La adquisición nosocomial fue un contribuyente importante en la incidencia por este microorganismo (Tong *et al.*, 2015).

La mayoría de las infecciones por *S. aureus* adquiridas por la comunidad son autoinfecciones con cepas que el individuo ha estado portando en las narinas anteriores, piel o en ambas. Por lo general los brotes comunitarios se relacionan con la falta de higiene y la transmisión de fómites de individuo a individuo. *S. aureus* a diferencia de otros microorganismos vegetativos, es capaz de sobrevivir periodos de secado. De manera parecida, los brotes en hospitales son ocasionados por el contacto de una cepa en

intervenciones quirúrgicas. Es posible que la fuente del brote sea un paciente con una infección estafilocócica no evidente como una úlcera por decúbito (frecuente en pacientes en estado vegetativo), que transmite de manera directa a otros pacientes por medio del manejo de personal hospitalario (Kenneth *et al.*, 2011).

La intoxicación por alimentos es una de las infecciones más frecuentes en el mundo. Los alimentos con cierta humedad y alto contenido graso son más susceptibles a estar contaminados por una amplia gama de microorganismos. Además, los alimentos pueden contaminarse por mal manejo de personal, déficit en la higiene y falta de cocción (Kenneth *et al.*, 2011).

2.2 Resistencia antibacteriana y su problemática

La resistencia a los antibióticos es un proceso natural e inevitable que resulta de la evolución de los microorganismos. En las últimas décadas este proceso natural se ha acelerado generando resistencia a la gran mayoría de los antibióticos. La situación actual tiene tal gravedad que la OMS la ha calificado como “emergencia mundial” y ha alertado para tomar medidas para aminorar su explosivo desarrollo y estimular a la búsqueda de alternativas y diseño de nuevas moléculas antimicrobianas. Entre las medidas propuestas destacan el generar y compartir información epidemiológica, aplicación de medidas de prevención de infecciones, optimización de antibióticos a través del desarrollo de políticas nacionales y globales sobre el consumo de antibióticos promotores de crecimiento utilizados en el ganado y el uso racional en humanos (Rosales, Hernández & Vidal, 2015).

La resistencia aparece cuando se administran dosis no letales, lo que inducen un alza en las tasas de mutación y/o transferencia horizontal de materia genético. Así, la selección de la mutante resulta de un mecanismo fisiológico que se emplea en un ambiente o microorganismo diferente otorgándole mayores probabilidades de sobrevivir (De Ponce, Hernández & Vidal, 2015).

En el informe *Antibacterial agents in clinical development- an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*, publicado el 20 de septiembre de 2017 por la OMS reveló una alarmante falta de nuevos fármacos para combatir la creciente amenaza de resistencia a antimicrobianos. La mayoría de los fármacos propuestos son parcialmente nuevos, cambian algún componente de estructuras de antibióticos ya establecidas, esto solo ofrece una solución a corto plazo. En este informe se dio a conocer que hay muy pocas opciones para el tratamiento de infecciones resistentes a los antibióticos como la tuberculosis farmacoresistente, que causa alrededor de 250 000 fallecimientos anuales. El Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus (Director general de la OMS) mencionó que este problema emergente tendrá repercusiones en la medicina moderna debido a que intervenciones quirúrgicas sencillas podrían ser fatales para los pacientes, se teme que volvamos a una época en donde la gente tema contraer infecciones habituales que pondrán en riesgo su vida debido a la falta de tratamiento (OMS, 2017).

La OMS ha priorizado 12 clases de patógenos además de la tuberculosis multiresistente, algunos de estos son causantes de infecciones frecuentes como la neumonía o infecciones del tracto urinario. Cada vez se presentan más casos de cepas altamente resistentes y requieren con urgencia nuevos tratamientos. Solo se han destacado 51 antibióticos nuevos y biofármacos que podrían ser utilizados para tratar infecciones multiresistentes. No obstante, solo ocho de estos fármacos con potencial han sido clasificados por la OMS como tratamientos innovadores que ofrecen alternativas válidas. Son escasos los antibióticos en fase de desarrollo que se podrán administrar por vía oral, contrastando la demanda para el tratamiento de infecciones como las causadas por enterobacterias (*E. coli* y *Klebsiella* spp) y *Acinetobacter* que pueden llegar a ser graves (OMS, 2017).

La Iniciativa Medicamentos para las Enfermedades Desatendidas (DNDi) y la OMS establecieron la Alianza mundial de investigación y desarrollo de antibióticos. Países como Alemania, Luxemburgo, Países Bajos, Reino Unido, Sudáfrica y Suiza se

comprometieron a destinar alrededor de 56 millones de euros para aportar a esta causa (OMS, 2017).

En un estudio realizado por Sader (2002), muestra los problemas de resistencia a antimicrobianos en América Latina; predisponiendo las bacterias gram negativas no fermentadoras como *Pseudomonas* spp y *Acinetobacter* multiresistentes a carbapenems, *E. coli* y *Klebsiella* spp con resistencia a β lactámicos y con producción de BLEE, *Enterobacter* y otras enterobacterias como *Serratia* y *Citrobacter* productoras de β lactamasas con resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos. La bacteria gram positivo mostrada con mayor frecuencia fue *S. aureus* resistente a meticilina, vancomicina, oxacilina, quinolonas y otros antibióticos. Las resistencias presentadas varían de acuerdo a la zona geográfica, el manejo en hospitales, entre otros factores.

2.3 Molécula de quinoxalina

2.3.1 Descripción

La quinoxalina hablando químicamente, es un compuesto orgánico heterocíclico conformado de un anillo benceno y una pirazina; presenta dos átomos de nitrógeno en su estructura, en la posición 1 y 4. Se considera bioisómero de la quinolina, naftaleno y de algunos anillos aromáticos que contengan la pirazina y/o piridina (Santivañez-veliz, Moreno-viguri, & Monge, 2013).

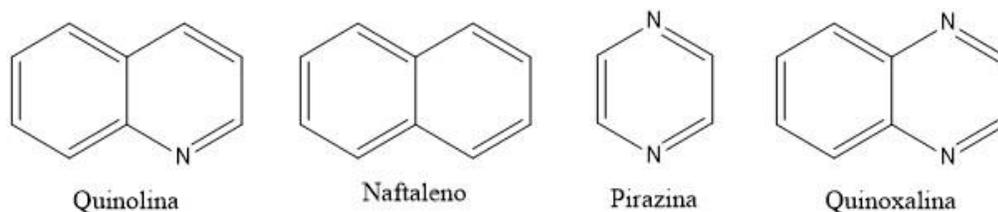


Figura 6. Bioisómeros y estructura del anillo de quinoxalina, imagen tomada y modificada de Santivañez et al. 2013.

Esta estructura ha sido utilizada como base en la síntesis de derivados bioactivos en diversos estudios de intereses farmacológicos. Existe un particular interés en ciertos derivados de quinoxalina con *N*-óxido y *N,N*-dióxido debido a su actividad antioxidante. Además de poseer similitudes con algunos antibióticos como las quinolonas, debido a esto se le atribuye su actividad biológica antibacteriana (Vieira, Pinheiro, Fernandes, & Paulo, 2014).

2.3.2 Actividad biológica

Una gran variedad de compuestos heterociclos como los que se presentan en la Figura 8 han presentado diversas actividades biológicas. Específicamente los derivados de 1-oxido de quinoxalina han mostrado una actividad antibacteriana prometedora. Compuestos derivados de 1,4-dióxido de 2-metilquinoxalina con un grupo metilo o metilo halogenado en posición 2(3) del anillo, han exhibido actividad tanto antibacteriana como antimicobacteriana (González, Cerecetto & Gonza, 2012; Palos & Rivera, 2016; Tariq, Somakala & Amir, 2017).

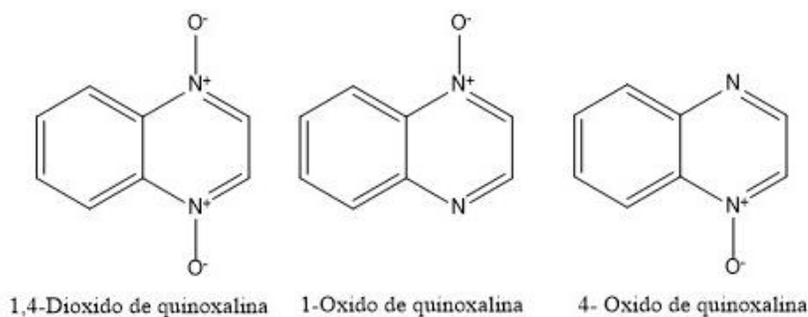


Figura 7. Derivados óxidos de molécula de quinoxalina (Palos y Rivera, 2016).

Son múltiples las actividades biológicas que presentan esta molécula y sus derivados. Es por ello el interés de investigaciones pasadas y futuras. Dentro de las actividades biológicas que ha presentado esta estructura se reconocen, la actividad antimicobacteriana (Antonio Carta *et al.*, 2004; A Carta *et al.*, 2006; Palos & Rivera, 2016; Peraman *et al.*, 2016), contra enfermedades causadas por protozoarios como la enfermedad de Chagas (Aguirre *et al.*, 2004; Aguirre & Garcí, 2008; Vicente *et al.*, 2010; Benitez *et al.*, 2011; Pérez-silanes *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2017), Malaria (Chemotherapeutika *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2008) y Leishmania (Burguete *et al.*, 2008). Así

mismo ha presentado actividad antifúngica (A Carta *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2016), antimicoplasmica (Zhao *et al.*, 2016), antiamebica (Duque-Montaña *et al.*, 2013), antibacteriana (Khan, Saleem, & Khan, 2007; Khan, 2011; Zarenezhad, Hossein, & Alborzi, 2014; Peraman *et al.*, 2016; El-attar *et al.*, 2017) y antiviral (Kleim *et al.*, 1993; Cordeiro *et al.*, 2015).

Algunos derivados han mostrado actividad anticancerígena inhibiendo células hipóxicas de manera selectiva (Aldana & Monge, 2004). Además de tener propiedades analgésicas (Antiphlogistika, Entzündungshemmer & Mahmoud, 2005), anti-inflamatorias (Pontiki *et al.*, 2007), antioxidantes (Pontiki *et al.*, 2007), Algunos compuestos con enlaces oxígeno-nitrógeno se les atribuyen su actividad biológica mediante la desoxigenación celular debido a la liberación de sus grupos NO (Pontiki *et al.*, 2011).

2.3.3 Derivados de quinoxalina como agentes antibacterianos

Patel *et al.* (2017) reportó estructuras híbridas derivadas de oxadiazol y quinoxalina, de las cuales dos de ellas presentaron actividad significativa comparable con el medicamento de referencia utilizado (cloranfenicol y ciprofloxacina) frente a *P. aeruginosa*. La primera estructura con un grupo CH₃ en la posición 2 presentó una CMI de 12.5 μM para *P. aeruginosa* y 25 μM para *S. pyogenes*; mientras que la segunda estructura con un grupo de CH₃ y Cl en posición 3 y 4 mostró un valor de CMI de 50 μM para *P. aeruginosa* (Patel *et al.*, 2017).

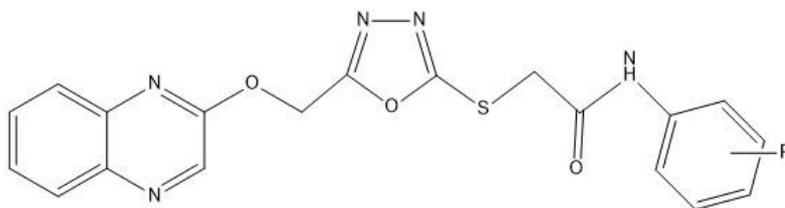


Figura 8. Estructura de derivados de 1, 3, 4-oxadiazol utilizados por Patel et al. 2017

Las CMI mostradas por Patel et al. 2017 mostraron que los análogos de 1,3,4-oxadiazol que contenían un grupo metilo (CH₃) y dicloro (Cl₂) en el anillo de fenilo presentaban actividad antibacteriana significativa y competente (Patel *et al.*, 2017).

Curiosamente, Vieira *et al.*, (2014) presentó que los compuestos que evaluó no mostraron actividad antimicrobiana en cepas gram-positivas, sin embargo, observó actividad biológica en cepas gram-negativas, a excepción de las cepas de referencia *E. coli* CTX-M2 y *E. coli* CTX-M9.

El compuesto 3M2QNXC presentó una actividad biológica en la mayoría de las cepas de referencia gram negativas estudiadas por Vieira *et al.* (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* S3R9, *E. coli* S3R22, *E. coli* TEM-1 y *E. coli* AmpC MOX-2), con halos de inhibición de 24, 26, 26, 26 y 15 mm respectivamente. El compuesto 2A3CQNX tuvo halos de inhibición sobre *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* S3R9, *E. coli* S3R22 y *E. coli* TEM-1 con halos de inhibición de 11, 16, 24 y 16 mm respectivamente; sin embargo, no presentó actividad en las cepas *E. coli* TEM -1 CTX 9, *E. coli* AmpC MOX-2, *E. coli* CTX-M2 y *E. coli* CTX-M9. Otros compuestos que tuvieron actividad biológica (QNX, 2MQNX y 2HF) solo presentaron actividad en *E. coli* TEM-1, el resto no presentaron actividad biológica en ninguna de las cepas estudiadas por Vieira *et al.* (2014).

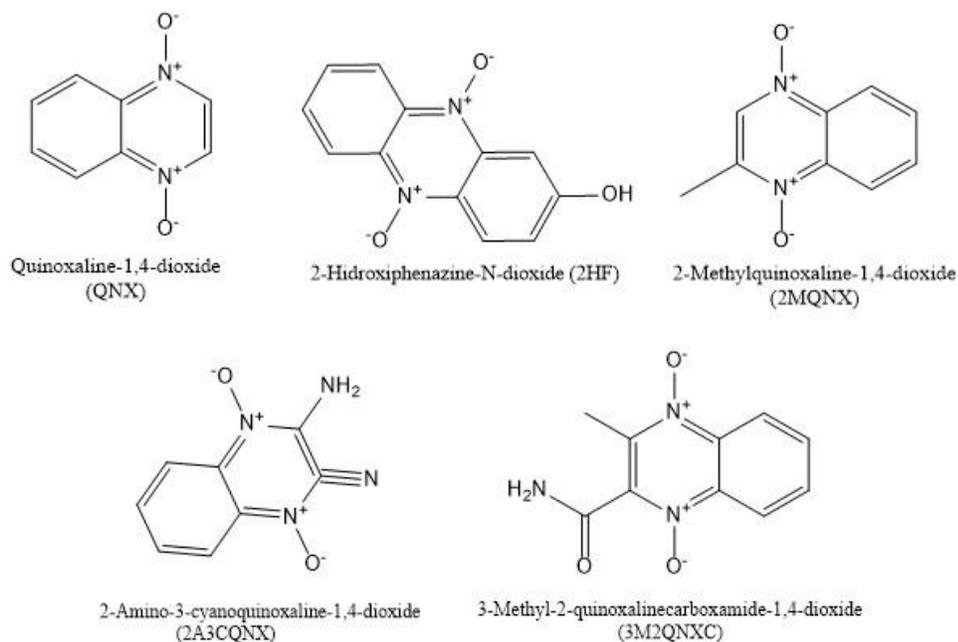
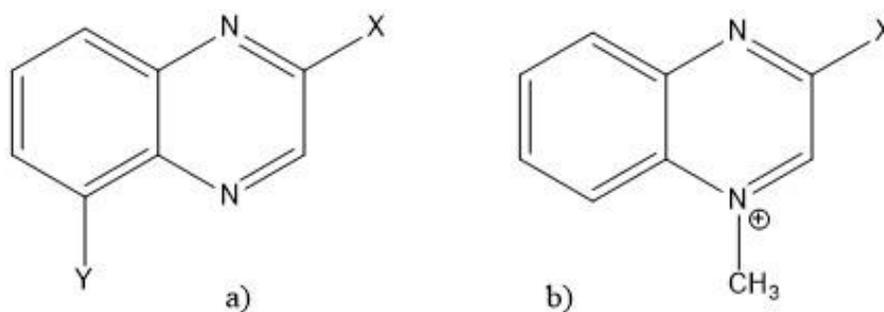


Figura 9. Estructuras derivadas de quinoxalina utilizadas por Vieira *et al.*, 2013.

El mismo año Parhi *et al.* publicó un estudio de diferentes derivados de quinoxalina probados en cuatro cepas bacterianas (*S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) y *E. faecalis* resistente a vancomicina (ERV) y *E. faecalis* sensible a vancomicina (ESV). El compuesto clasificado como 10a derivado de carboxamido relacionado con un sustituyente N-(2-aminoetilo) tuvo actividad significativa con una CMI de 4.0 µg/mL para *S. aureus* y 8.0 µg/mL para *E. faecalis*. Parhi *et al.* observó que la colocación de un sustituyente guanidino metilo en la posición 5 de una 2-(3-t-butilfenil) quinoxalina o 2-(4-t-butilfenil) quinoxalina (compuestos 11a y 12a respectivamente) daba como resultado una notable actividad antibacteriana con una CMI de 4.0 µg/mL para *S. aureus* (SASM y SARM) y de 8.0 a 16.0 µg/mL para *E. faecalis* (ERV y ESV) (Parhi *et al.*, 2013).



Compuesto	Y	X
10a	3-(40-t-Butyl-5-[carboxamido-N-(2-aminoethyl)]biphenyl)	H
11a	3-t-Butylphenyl	CH ₂ NC(NH ₂) ₂
12a	4-t-Butylphenyl	CH ₂ NC(NH ₂) ₂

Figura 10. Modelos de quinoxalina con actividad antibacteriana utilizados por Parhi *et al.*, 2013.

Por otro lado, Morales *et al.* (2012) observó una actividad antibacteriana contra algunas cepas gram-negativas y gram-positivas, para los compuestos 3f (R₁: Me; R₂: Br), 3g (R₁: Pyr; R₂: H), 3h (R₁: Pyr; R₂: Cl) y 3i (R₁: Pyr; R₂: Br) que tienen un grupo piridina en su estructura. La mayoría presentaron grandes zonas de inhibición y un amplio espectro frente a los organismos ensayados a excepción de *P. aeruginosa*. Los valores de CMI de los compuestos 3g (R₁: Pyr; R₂: H) y 3h (R₁: Pyr; R₂: Cl) variaron entre 0.025 μM / ml y 0.2 μM / ml para todas las cepas bacterianas, teniendo la actividad más alta. El compuesto 3h (R₁: Pyr; R₂: Cl) tuvo la mejor zona de inhibición de 19 mm frente a *P. mirabilis*, que fue la misma para el fármaco de referencia utilizado “amoxicilina” (Morales *et al.*, 2012).

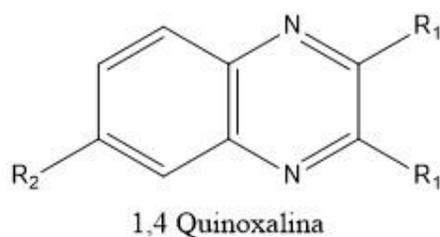


Figura 11. Modelo de la estructura de quinoxalina utilizada por Morales *et al.* (2012).

III. JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones bacterianas han estado presentes desde tiempos remotos, en el pasado eran una de las principales causas de muerte debido a la falta de tratamientos efectivos. Hasta hace unos años estas infecciones eran tratables con medicamentos convencionales, sin embargo, hoy en día han causado polémica debido a que diversas bacterias han desarrollado resistencia antibiótica. La incidencia de casos clínicos de bacterias multiresistentes ha ido en aumento, comprometiendo la salud tanto de humanos como animales.

Bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoneae* pueden llegar a ocasionar graves patologías como dermatitis severas, artritis, mastitis, enfermedades de vías respiratorias, enteropatías hasta meningoencefalitis, las cuales cada vez son más difíciles de tratar debido a la falta de tratamientos eficaces.

El control de esta problemática emergente a nivel mundial, ha sido un desafío para el área de Salud Pública, debido a la falta de opciones terapéuticas, por lo que se han visto obligados a implementar estrategias para la obtención de nuevos fármacos.

Existen diversas combinaciones ensayadas en el estudio de antimicrobianos. La molécula de quinoxalina ha sido utilizada en diversas investigaciones, las cuales han probado que es efectiva frente a una amplia variedad de trastornos, principalmente de origen bacteriano.

El presente estudio pretende ser una contribución a la caracterización de la actividad antibacteriana de derivados de quinoxalina, justificando la búsqueda de alternativas para extender el espectro de actividad y lograr minimizar las resistencias generadas en la actualidad. La actividad de estos compuestos fue ensayada frente a modelos procarióticos representativos gram-negativo y gram-positivo: se utilizaron cepas aisladas de casos clínicos de pacientes caninos del Hospital Veterinario de pequeñas especies de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de los cuales se obtuvieron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Así mismo, los compuestos fueron ensayados sobre cepas control de *S. aureus* CDBBB 1001, *P. aeruginosa* CDBBB 1021 y *P. mirabilis* CDBBB 1343.

IV. HIPÓTESIS.

Los derivados obtenidos a partir de quinoxalina, presentan actividad antimicrobiana de alto potencial y baja citotoxicidad en contraste con los fármacos de referencia probados (amoxicilina y ciprofloxacina).

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los efectos antibacterianos de distintos derivados de quinoxalina sobre cepas aisladas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y cepas control de *Staphylococcus aureus* CDBBB 1001, *Pseudomonas aeruginosa* CDBBB 1021 y *Proteus mirabilis* CDBBB 1343.

Objetivos específicos

- a. Determinar la actividad de los derivados de quinoxalina a una concentración de 100 μM sobre los microorganismos seleccionados.
- b. Comparar los efectos entre los distintos derivados de quinoxalina con los fármacos de referencia.
- c. Determinar la CMI de los compuestos derivados de quinoxalina que presenten la mejor actividad antibacteriana, mediante la técnica de dilución en microplaca.
- d. Determinar la viabilidad celular frente a él o los compuestos derivados de quinoxalina con mejor CMI por medio de un ensayo de curso de tiempo
- e. Determinar la actividad citotóxica sobre la línea celular de macrófagos murinos J774 de los derivados de quinoxalina.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente proyecto se realizó en conjunto con el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, donde se efectuó la síntesis de los compuestos derivados de quinoxalinas, los cuales fueron evaluados *in vitro* sobre cepas control proporcionadas por la misma institución y en cepas aisladas de casos clínicos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

El estudio para la evaluación de citotoxicidad celular se efectuó en el Laboratorio de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1 Derivados de quinoxalina

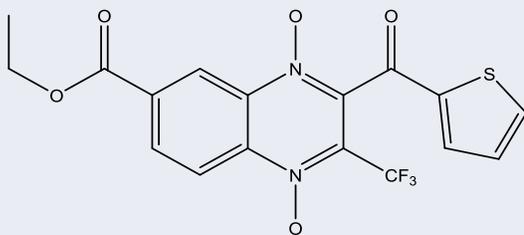
A cada compuesto se le asignó una clave para su identificación, se registró el aspecto, peso molecular, estructura y fórmula química.

Tabla 3. Características de cada compuesto derivado de quinoxalina

Clave	Fórmula química	Peso Molecular	Estado
AG1	$C_{17}H_{11}F_3N_2O_5S$	412.34	Sólido
AG2	$C_{18}H_{13}F_3N_2O_6$	392.29	Sólido
AG3	$C_{18}H_{11}F_3N_2O_5$	420.34	Sólido
AG4	$C_{14}H_{15}N_3O_5$	305.29	Sólido
AG5	$C_{20}H_{15}F_3N_2O_5$	410.30	Sólido

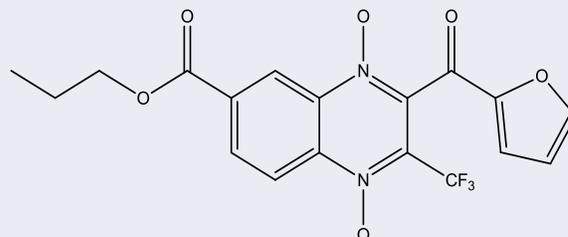
Tabla 4. Moléculas de derivados de quinoxalina

Estructuras moleculares



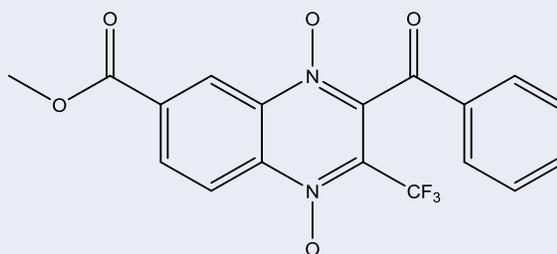
Ethyl 1,4-di(λ -oxidanyl)-3-(thiophene-2-carbonyl)-2-(trifluoromethyl)-1 λ^4 ,4 λ^4 -quinoxaline-6-carboxylate

AG1



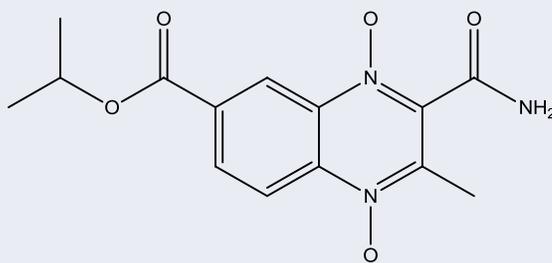
Propyl 3-(furan-2-carbonyl)-1,4-di(λ^1 -oxidanyl)-2-(trifluoromethyl)-1 λ^4 ,4 λ^4 -quinoxaline-6-carboxylate

AG2



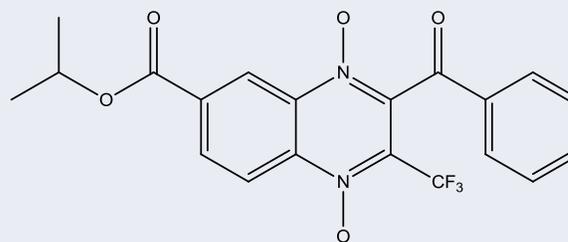
Methyl 3-benzoyl-1,4-di(λ^1 -oxidanyl)-2-(trifluoromethyl)-1 λ^4 ,4 λ^4 -quinoxaline-6-carboxylate

AG3



Isopropyl 3-carbamoyl-2-methyl-1,4-di(λ^1 -oxidanyl)-1 λ^4 ,4 λ^4 -quinoxaline-6-carboxylate

AG4



Isopropyl 3-benzoyl-1,4-di(λ^1 -oxidanyl)-2-(trifluoromethyl)-1 λ^4 ,4 λ^4 -quinoxaline-6-carboxylate

AG5

6.2 Preparación de microorganismos y controles

6.2.1 Activación de microorganismos

Los microorganismos al estar almacenados en congelación (-20°C) fueron activados sembrándolos en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con agar Infusión Cerebro Corazón (ICC; Becton Dickinson Bioxon, Estado de México, México) y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 h.

6.2.2 Selección del antibiótico a emplear como control positivo

Las cepas control de *S. aureus* CDBB B 1001, *P. aeruginosa* CDBB B 1021 y *P. mirabilis* CDBB B 1343, fueron proporcionadas por el Instituto Politécnico Nacional. Mientras que las cepas aisladas de casos clínicos fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cada una de las cepas fue sometida a un estudio de antibiograma utilizando el Kit de multidiscos del Laboratorio BIO RAD, para la cepa gram positivo se empleó el modelo CAT.71080480 y para las cepas gram negativo el CAT.71080580. En las Tablas 5 y 6 se muestran los antibióticos implementados para cada microorganismo.

Una vez activadas las cepas se procedió a tomar de 3 a 5 Unidades formadoras de colonias (UFC) y se inocularon en tubos de ensayo con 5 mL de caldo ICC, se incubaron a 37°C hasta obtener una turbidez ligera con una densidad óptica correspondiente al estándar 0.5 de McFarland (1×10^5 UFC).

Posteriormente, se prepararon cajas de Petri con agar Mueller Hinton y se utilizaron hisopos estériles para inocular las cajas. Los hisopos fueron humedecidos en la suspensión (0.5 estándar de McFarland), en seguida se realizó el sembrado por estría en distintas direcciones, con la finalidad de obtener un inóculo lo más uniforme posible. A continuación, se colocaron los multidiscos con cuidado y con la ayuda de una pinza estéril se presionó ligeramente cada uno de los discos para que estuvieran fijos y en contacto con la superficie. Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Una vez pasado el tiempo de incubación se prosiguió a medir los halos de inhibición por

medio de un vernier y los resultados fueron interpretados siguiendo los parámetros del Kit de multidiscos del laboratorio BIO RAD como Resistentes (R), Intermedias (I) o Sensibles (S). Los resultados obtenidos para cada fármaco empleado se muestran en las Tabla 5 y 6, determinando como control positivo a los antibióticos Ciprofloxacina y Amoxicilina.

6.2.3 Elaboración de controles positivos

La realización de los controles positivos (antibióticos de referencia) consistió en preparar soluciones a una concentración de 100 μM de Ciprofloxacina y Amoxicilina; estas soluciones fueron preparadas con Dimetil sulfóxido (DMSO) al 2% (Bio Basic Inc, distribuidor Probiotek, San Nicolás de los Garza, Nuevo León).

6.2.4 Elaboración del control negativo

Para la elaboración del control negativo se procedió a preparar una solución con 20 μL de DMSO concentrado y 880 μL de medio caldo Mueller Hinton (Becton Dickinson Bioxon, Estado de México, México), siendo ésta la solución de trabajo.

6.2.5 Elaboración del control de esterilidad y crecimiento para la CMI

Como control de esterilidad, se colocaron 200 μL solamente de medio de cultivo. Para el control de crecimiento se colocaron 100 μL de medio de cultivo y 100 μL del inculo con el microorganismo en cuestión (solución de trabajo, dilución 1:50).

6.2.6 Preparación de soluciones Stock

Fueron pesados en una balanza analítica (Sartorius, BL210S, Alemania) de 1.1 a 1.5 mg de cada compuesto, mismos que se disolvieron en 1500 μL de DMSO concentrado, en seguida se procedió a agitar en un vortex (Labnet VX100, Edison, Nueva Jersey; EE. UU.) y finalmente se realizaron diluciones hasta llegar a la concentración y porcentaje de DMSO (2%) requerida para cada ensayo.

6.2.7 Preparación de inóculos de microorganismo

Tras la reactivación de las cepas en placas de agar ICC se tomaron 5 UFC y se depositaron en 3 mL de medio de cultivo caldo Mueller Hinton, los inóculos se incubaron a 37 °C en un agitador mecánico (Labnet 211DS, Edison, Nueva Jersey; EE. UU.) a 120 rpm por 24 h, a partir del inóculo obtenido se tomaron 100 µL y se depositaron en 3 ml de caldo Mueller Hinton; se volvió a incubar a 37 °C esta vez por 2 a 4 h con una agitación constante de 120 rpm hasta lograr obtener un crecimiento referente a una turbidez de 0.5 del estándar de McFarland (0.085 a 0.100 de absorbancia a λ 625 nm), posteriormente se procedió a verificar la absorbancia por medio de un espectrofotómetro (Shimadzu UV1800, Kyoto, Japón).

6.3 Prueba de difusión en agar

Se determinó la sensibilidad de los compuestos sintetizados sobre los microorganismos, usando la técnica de difusión en agar de acuerdo al método de Kirby-Bauer. El cual permitió medir el halo de inhibición bacteriano, con el fin de evaluar la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos frente a los compuestos químicos con potencial antimicrobiano.

Procedimiento

1. Se obtuvo 1 mL de inóculo previamente preparado de cada microorganismo, a una densidad correspondiente a 1.5×10^6 /mL (0.5 según la escala de McFarland) y fueron transferidos en tubos con 20 mL de medio agar ICC estéril.
2. Rápidamente, mientras el agar aún se encontraba en estado líquido, se agitaron los tubos por medio de un vortex Labnet VX100, para homogeneizar el inóculo.
3. En seguida se vertió el contenido en cajas Petri de 90 mm de diámetro y se dejaron solidificar.
4. Una vez solidificado el medio, se realizaron los pocillos para cada compuesto y los controles; utilizando tubos Durham estériles.
5. A cada pocillo se le añadió 25 µL de solución Stock diluida con PBS para disminuir el porcentaje de DMSO hasta un 2%.

6. La concentración a la cual se probaron los compuestos como los controles fue de 100 μM .
7. Cada pocillo fue distribuido por toda la caja de Petri como se muestra en la Figura 13, respetando la distancia entre pocillo, la cual no fue menor de 3 mm.
8. Como control positivo se utilizaron dos medicamentos de referencia, Amoxicilina (AMX) y Ciprofloxacina (CPF). Para el control negativo se colocó un pocillo únicamente con DMSO al 2%.
9. Finalmente se incubó cada placa a 37°C durante 24 horas, posteriormente se realizó la lectura de los halos de inhibición (mm), cada cepa fue clasificada como susceptible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las directrices del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés). Cada bioensayo fue realizado por triplicado, para mayor confiabilidad.

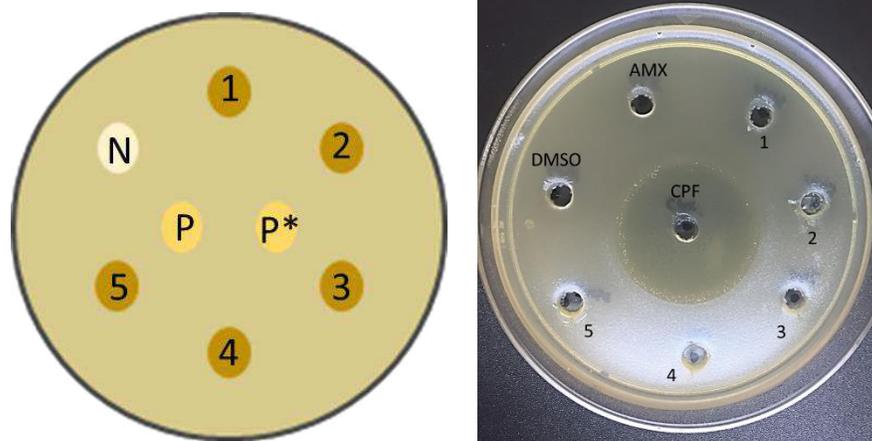


Figura 12. (Izq.) Distribución de pocillos; 1-5: derivados de quinoxalina; N: control negativo (DMSO al 2%); P: control positivo (Amoxicilina, AMX); P*: control positivo (Ciprofloxacina, CPF) y (der) ensayo de difusión en agar.

6.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los compuestos que fueron estudiados no tienen valores de referencia establecidos con respecto a su comportamiento sensible y resistente; por lo que se empleó el método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), establecida por el CLSI.

Procedimiento

1. Se emplearon microplacas de 96 pocillos con fondo plano de poliestireno (Corning incorporación, EE.UU.), a los cuales se les añadieron 100 μL de medio de cultivo caldo Mueller Hinton.
2. Posteriormente se transfirieron 100 μL de las soluciones preparadas de los compuestos a cada uno a los primeros pocillos de cada hilera (A1-A12), a partir de éstos pocillos se realizaron diluciones seriadas al doble, desechando los últimos 100 μL de cada hilera. Las concentraciones que se emplearon para cada compuesto fueron 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.6 μM (Figura 14).
3. En cada placa se añadió el control de esterilidad del medio, control de crecimiento de la cepa en cuestión, control negativo (caldo Mueller Hinton con DMSO al 2%), control positivo (fármacos de referencia).
4. Los controles positivos (fármacos de referencia) fueron probados a las mismas concentraciones de los compuestos evaluados.
5. Al realizar las diluciones se procedió a colocar 100 μL del inóculo correspondiente a 0.5 del estándar de McFarland (1×10^5 UFC) a cada uno de los pocillos que fueran utilizados. Así se obtuvo un volumen final por pocillo de 200 μL .
6. Para el control de humedad, las microplacas fueron colocadas en bolsas de plástico con algodón humedecido y se incubaron a 37°C durante 24 h.
7. Por la composición del medio empleado en el ensayo, no fue necesario aplicar soluciones de tipo tinción, por lo que la interpretación de los resultados se consideró como si existía presencia de turbidez en el pocillo era indicador de crecimiento bacteriano.
8. La CMI fue determinada según las normas del CLSI document M-100-S12, 2002, como la concentración más baja de los compuestos que inhiben el crecimiento

bacteriano, es decir, a partir de aquella concentración en la que no se presentó turbidez.

9. La ausencia o presencia de turbidez fue verificada, tomando una fracción del inoculo de cada pocillo y se recultivo en medio agar Mueller Hinton; incubándolas durante 24 horas por 37°C.
10. Los resultados obtenidos de ambos ensayos fueron comparados y realizados por triplicado.

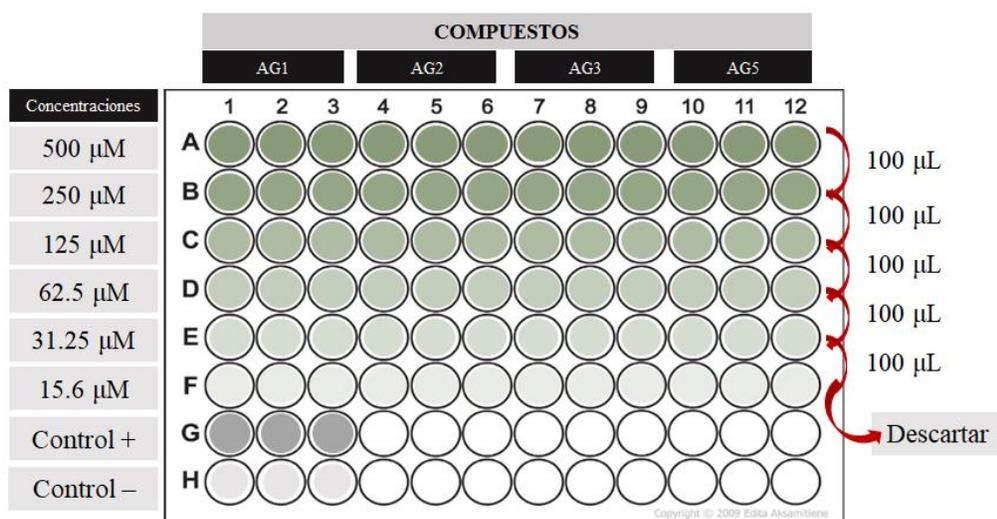


Figura 13. Técnica de microdilución seriada al doble en microplaca

6.5 Viabilidad celular

Con el fin de evaluar la reducción celular, se realizó el ensayo cuenta viable en placa, analizando la cepa bacteriana que fue susceptible a los compuestos derivados de quinoxalina, inhibiendo su crecimiento a determinada concentración por lo que previamente se determinó la CMI.

Procedimiento

1. Se utilizaron suspensiones bacterianas a una densidad de 0.5 McFarland en caldo Mueller Hinton.
2. Para la determinación de la viabilidad celular, se realizó un ensayo de curso de tiempo durante 24 h, probando la presencia de células viables y cuantificando las UFC/ml.

3. Como control positivo se utilizaron 100 μL del inóculo 0.5 McFarland, depositándolos sobre el medio de cultivo, como control negativo se usó el medio de cultivo solamente y finalmente se utilizó el inóculo con la CMI de cada derivado de quinoxalina.
4. La dilución óptima fue determinada por diluciones en serie con un factor de 10^{-3} , por lo cual fueron añadidos 1/10 del inóculo bacteriano y 9/10 de solución salina, hasta alcanzar la dilución deseada.
5. Cada dilución fue homogeneizada por resuspensión, lo cual consiste en subir y bajar la suspensión por 8 segundos, a través de las puntas de la micropipeta (Gilson™ Micropipetas PIPETMAN Classic™).
6. Los intervalos de tiempo a los cuales se cultivó la suspensión bacteriana fueron de 3 horas.
7. El ensayo se realizó por triplicado.

6.6 Evaluación de la actividad citotóxica

6.6.1 Ensayo de reducción del MTT

Con la finalidad de evaluar la actividad citotóxica de cada uno de los compuestos ensayados, se optó por utilizar el ensayo de reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium (MTT) el cual fue descrito por Mossman en 1983. Este ensayo consiste en medir por medio de un espectrofotómetro la reducción del MTT a cristales de formazán (producto púrpura) a una longitud de onda de 540 nm; el MTT es captado por la célula y la reacción de reducción celular se origina por la implicación de cofactores nucleótidos de piridina $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ y la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial, ocurriendo solamente en células viables. El producto resultado de la reacción, el formazán al ser impermeable a la membrana celular, queda retenido, acumulándose dentro de la célula. Los cristales pueden ser liberados mediante la solubilización de la célula. Esto es posible cuando se agrega un agente lisante, de esta manera es posible cuantificar el producto formado, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración de amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir al MTT establece un indicador sobre la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional se interpreta como una medida de viabilidad

celular. Esta herramienta nos permite obtener información acerca de la toxicidad de algún compuesto a evaluar al exponerlo a una línea celular. La absorbancia del producto es proporcional a la cantidad de células vivas (Mosmann, 1983; Heath, Bard, & Morrice, 2013).

Para llevar a cabo la evaluación de actividad citotóxica celular se realizó lo siguiente:

6.6.2 Mantenimiento de células

1. Se descongelaron viales con células y se transfirieron a una caja de cultivo celular (Celltreat, código de producto 229592, EE.UU.) con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) con 2% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina al 1%; y se introdujeron en una incubadora (Thermo Fisher Scientific modelo 3120, EE.UU.) a 37°C y 4% CO₂ por 24 horas.
2. Pasado el tiempo de incubación, se decantó el medio y se añadieron 2 mL de medio RPMI nuevo.
3. Se rasparon las células por medio de un Scraper (Corning incorporación costar, modelo 3010, México) con el fin de despegar las células.
4. Ya despegadas las células, los 2 mL se transfirieron a un tubo FalconTM estéril (Corning incorporación costar, modelo CLS430828-100EA, EE.UU.) y se depositó nuevo medio RPMI hasta llegar a la marca de 10 mL, se tomaron 50 µL para depositarlos en un tubo Eppendorf y el resto del contenido del tubo FalconTM se centrifugó por 10 minutos a 1700 rpm.
5. A las cajas de cultivo celular se les añadió 2 mL de medio RPMI y se volvieron a incubar a 37°C y 4% CO₂ por 24 horas, por si quedaron algunas células viables, estas se multiplicarán y pudieran ser aprovechadas.
6. Se revisó el crecimiento en el invertoscopio (Axiovert 40 CFL, ZEISS®, Alemania) que tuvieran un 80% de confluencia.

6.6.3 Conteo celular

1. Ya verificado el 80% de confluencia de las cajas de cultivo celular en el invertoscopio; se colocaron 50 µL del contenido del tubo FalconTM y 50 µL de PBS

en un tubo Eppendorf, se homogeneizó y se extrajeron 10 μ L para colocarlos en las cuadrículas de recuento de la cámara de Neubauer.

2. Posteriormente se contaron los cuatro cuadrantes de ambos lados de la cámara de Neubauer en el invertoscopio y se calculó la concentración de células en la suspensión por cada mililitro, la cual se determinó empleando la fórmula:

$$C = n \times 10^4 \times \text{FD}/\text{mL}.$$

Dónde:

C= concentración de células

n= promedio de células en cada cuadrante

10^4 = dilución de la cámara

FD= factor de dilución de la suspensión

6.6.4 Preparación de suspensión de células

Se preparó una suspensión de células J774 macrófagos murinos; en total se prepararon 9 mL para cada microplaca de 96 pocillos a usar. De dicha suspensión se tomaron 100 μ L y se depositaron en cada pocillo para tener 10,000 células en cada pocillo.

6.6.5 Preparación de las condiciones de trabajo

Para el sembrado de las células se utilizó una campana de flujo laminar (SEV^{MR} modelo CSB 120, México), se realizó la desinfección del área con alcohol al 70% y posteriormente se empleó luz UV; se desinfectó el material a utilizar con alcohol al 70% antes de introducirlo a la campana.

6.6.6 Preparación de compuestos derivados de quinoxalina

De cada compuesto a ensayar se preparó 1 mL a una concentración de 2000 μ M, esto se realizó disolviendo de 0.6 a 0.8 mg de compuesto, el cual se disolvió con 40 μ L de DMSO y 960 μ L de PBS. A partir de esta solución se realizaron diluciones 1:2 para obtener las concentraciones siguientes.

6.6.7 Preparación de control positivo

En cuanto al control positivo, se preparó 1 mL de una solución a 1000 μM de vincristina en medio de cultivo y se colocó 100 μL en tres pocillos; se utilizó otro control positivo en el cual tres pocillos se dejaron con las células, pero sin medio de cultivo.

6.6.8 Preparación de control negativo

En tres de los pocillos se colocaron 2 μL de DMSO en 98 μL de medio RPMI.

6.6.9 Procedimiento de la actividad citotóxica en microplaca

1. De la suspensión celular de 100,000 cel /mL se colocaron 100 μL a cada uno de los 96 pocillos de la microplaca de fondo plano, de manera que en cada pocillo se colocaron 10,000 células.
2. Las placas fueron incubadas a 37°C con 4% de CO₂ por 24 h.
3. Después de la incubación se agregaron 100 μL de la concentración más alta del compuesto a analizar en los primeros tres pocillos de la primera fila (A). Se homogeneizó la concentración pipeteando 3 veces.
4. En la siguiente fila (B) se agregaron 100 μL de la anterior fila (A) donde se encontraba la concentración más elevada del compuesto. Esto se realizó sucesivamente hasta colocar la última concentración. Como cada pocillo tenía 100 μL de medio con células, el hecho de agregar 100 μL de cada concentración originó una dilución 1:2, obteniendo concentraciones finales de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.1 μM (Figura 15).
5. En cada microplaca se agregaron en tres pocillos, 2 μL de DMSO (representando 2%) con 98 μL de medio de cultivo y en otros tres pocillos se colocó células con medio de cultivo solamente, ambos fueron usados como controles negativos. Esto es igual a la concentración más alta de este solvente en las muestras de cada compuesto. Para los controles positivos se utilizaron tres pocillos con células sin medio y otros tres pocillos con 20 μL de vincristina (Pisa Agropecuaria, Crivosin Vet®) (Figura 15).
6. Las microplacas fueron incubadas a 37°C con 4% de CO₂ durante 24 horas.

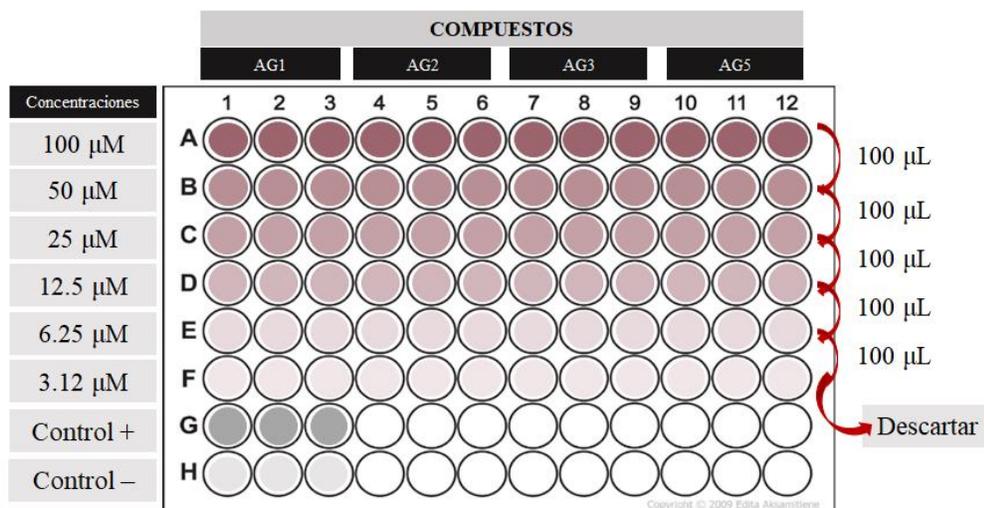


Figura 14. Distribución de microplaca de la actividad citotóxica en la línea celular J774 macrófagos murinos

7. Al pasar el tiempo de incubación se procedió a revisar el crecimiento en el invertoscopio, después se agregaron 100 μL de MTT (0.25 mg/mL) a cada pocillo y las placas fueron cubiertas con papel aluminio, colocándolas de nuevo en la incubadora por 3 horas en las mismas condiciones.
8. Retirar el sobrenadante de medio MTT y añadir 100 μL de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazán; se dejaron por 30 minutos en la incubadora a las mismas condiciones.
9. Se procedió a leer la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de λ 540 nm en un espectrofotómetro Epoch (Biotek instruments, EE.UU.). Se obtuvo el promedio de las absorbancias de cada concentración, y se relacionó con el promedio obtenido en los pocillos del control negativo, los cuales corresponden al 100% de viabilidad.
10. Los porcentajes de inhibición de las concentraciones obtenidos fueron graficados en función de la concentración y posteriormente se determinó la CC_{50} (concentración citotóxica media) con la ecuación de la recta; se calculó el promedio de la CC_{50} de las 3 placas, así como su desviación estándar y el coeficiente de variación (Mosmann, 1983).

6.6.10 Determinación del índice de selectividad

Se determinó obteniendo el cociente del valor de la IC₅₀ y el valor de la CMI; para lo que se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de selectividad} = \frac{\text{Valor de IC}_{50} \text{ del compuesto en macrófagos J774}}{\text{CMI del compuesto contra determinado microorganismo}}$$

Un valor entre 10 y 100 de índice de selectividad se considera efectivo contra un microorganismo y presenta una citotoxicidad de moderada a baja.

6.7 Análisis estadístico.

La presente investigación fue basada en un estudio experimental cuantitativo. Se utilizó el análisis estadístico de la prueba ANOVA (Análisis de varianza) propuesto por R.A. Fisher y la comparación de medias se realizó por el método de Tukey, estableciendo 0.05 de nivel de significancia. El IC₅₀ para cada compuesto se obtuvo a partir de la curva concentración/efecto calculada en el programa Calculadora IC50 de AAT Bioquest, con la finalidad de determinar el índice de selectividad.

VII. RESULTADOS

7.1 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana

7.1.1 Antibiograma

Cada cepa aislada fue sometida a una previa evaluación por el método de difusión en agar con discos de medicamentos de referencia ya estandarizados. En las tablas 5 y 6 se muestra el diámetro de las zonas de inhibición que presentó cada uno de los microorganismos. Se puede observar que hay una gran resistencia a la ampicilina (AM) y carbenicilina (CB). El aislado más resistente fue el de *Escherichia coli*.

Tabla 5. Prueba de sensibilidad de fármacos comerciales en cepas aisladas

Clave	Fármaco	Zona de inhibición (mm)				
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
AK	Amikacina	-	20	18	22	-
AM	Ampicilina	0	0	0	0	0
CB	Carbenicilina	0	0	0	0	-
CF	Cefalotina	0	10	8	0	12
CFX	Cefotaxima	0	24	20	6	14
CL	Cloranfenicol	0	20	14	8	-
CLM	Clindamicina	-	-	-	-	26
CPF	Ciprofloxacina	0	30	30	32	22
DC	Dicloxacina	-	-	-	-	0
E	Eritromicina	-	-	-	-	18
GE	Gentamicina	10	20	20	20	18
NET	Netilmicina	0	18	9	8	-
NF	Nitrofurantoína	14	18	0	0	-
NOF	Norfloxacina	0	22	26	28	-
PE	Penicilina	-	-	-	-	10
SXT	Sulfametoxazol trimetoprim	0	26	24	0	20
TE	Tetraciclina	-	-	-	-	26
VA	Vancomicina	-	-	-	-	12

Tabla 6. Prueba de sensibilidad de fármacos comerciales en cepas control

Clave	Fármaco	Zona de inhibición (mm)		
		<i>P. mirabilis</i> CDBB B 1343	<i>P. aeruginosa</i> CDBB B 1021	<i>S. aureus</i> CDBB B 1001
AK	Amikacina	20	18	-
AM	Ampicilina	0	0	0
CB	Carbenicilina	8	0	-
CF	Cefalotina	31	0	28
CFX	Cefotaxima	28	0	18
CL	Cloranfenicol	30	0	-
CLM	Clindamicina	-	-	28
CPF	Ciprofloxacina	34	28	26
DC	Dicloxacina	-	-	0
E	Eritromicina	-	-	22
GE	Gentamicina	22	20	20
NET	Netilmicina	8	10	-
NF	Nitrofurantoína	0	0	-
NOF	Norfloxacina	24	26	-
PE	Penicilina	-	-	26
SXT	Sulfametoxazol trimetoprim	24	0	20
TE	Tetraciclina	-	-	26
VA	Vancomicina	-	-	24

7.1.2 Prueba de difusión en agar

Se utilizaron las pautas del CLSI para antibióticos conocidos, debido a que las moléculas no tienen valores de referencia, dado a que son estructuras prácticamente nuevas. Para la interpretación de resultados se consideró que la ausencia de zona de inhibición para cada derivado probado, sería un indicador de que no hay actividad antibacteriana y viceversa.

La Tabla 7 y 8 muestran los resultados de actividad antibacteriana para cada cepa y compuesto probado. Todos los compuestos estudiados no mostraron actividad favorable frente a las cepas gram negativo. Sin embargo, los compuestos AG1, AG2, AG3 y AG5 presentaron actividad antibacteriana en la cepa gram positivo. Entre los cuatro compuestos, AG2 fue el que presentó una actividad mayor.

Tabla 7. Prueba de sensibilidad de compuestos derivados de quinoxalina y controles sobre cepas aisladas

Zona de inhibición (mm)						
Compuesto	Fórmula	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
AG1	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅ S	0	0	0	0	22
AG2	C ₁₈ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₆	0	0	0	0	24
AG3	C ₁₈ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅	0	0	0	0	20
AG4	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₅	0	0	0	0	0
AG5	C ₂₀ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₅	0	0	0	0	21
CPF	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	0	23	35	37	32
AM	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	0	0	19	0	24
DMSO	C ₂ H ₆ OS	0	0	0	0	0

Tabla 8. Prueba de sensibilidad de compuestos derivados de quinoxalina y controles sobre cepas control

Zona de inhibición (mm)				
Compuesto	Fórmula	<i>P. mirabilis</i> CDBB B 1343	<i>P. aeruginosa</i> CDBB B 1021	<i>S. aureus</i> CDBB B 1001
AG1	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅ S	0	0	17
AG2	C ₁₈ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₆	0	0	19
AG3	C ₁₈ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅	0	0	13
AG4	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₅	0	0	0
AG5	C ₂₀ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₅	0	0	18
CPF	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	40	22	30
AM	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	29	0	23
DMSO	C ₂ H ₆ OS	0	0	0

7.1.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Una vez realizado el *screening*, se determinó la CMI para cada compuesto que presentó actividad antibacteriana, en este caso se estudiaron solo en la cepa gram positivo y todos los compuestos a excepción de AG4 presentaron actividad favorable sobre *S. aureus*. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en donde la CMI más baja la obtuvo el compuesto AG2. Tomando en cuenta que la CMI, es la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de compuestos derivados de quinoxalina

Cepa	Compuesto	Fórmula	CMI ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
<i>S. aureus</i>	AG1	$\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	31.25
	AG2	$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$	15.6
	AG3	$\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	62.5
	AG5	$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	31.25
<i>S. aureus</i> CDBB B 1001	AG1	$\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	31.25
	AG2	$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$	15.6
	AG3	$\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	62.5
	AG5	$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	31.25

7.1.4 Viabilidad celular

Para valorar la actividad de los derivados de QNX contra la cepa *S. aureus*, se realizó un ensayo de cuenta viable en placa, en donde se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias tomadas de una muestra por intervalos de tiempo (3 h). En la Figura 15, se muestran agrupadas las imágenes de los resultados del ensayo para cada compuesto.

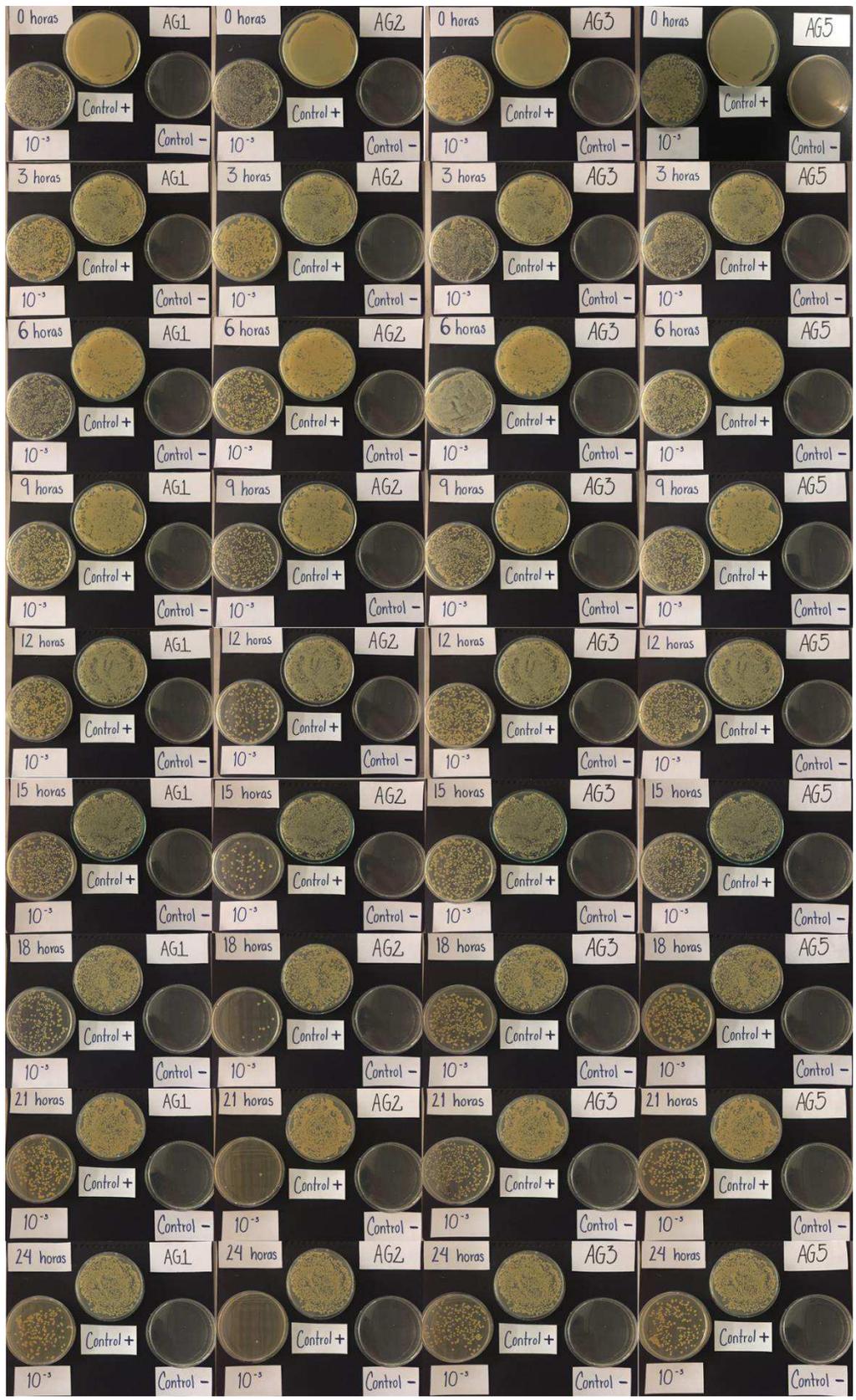


Figura 15. Cuenta viable en placa de derivados de quinoxalina

La Figura 16 muestra gráficamente los datos acumulados del comportamiento de reducción celular (UFC/mL) causado por el efecto de los compuestos químicos derivados de QNX en un periodo de 24 horas.

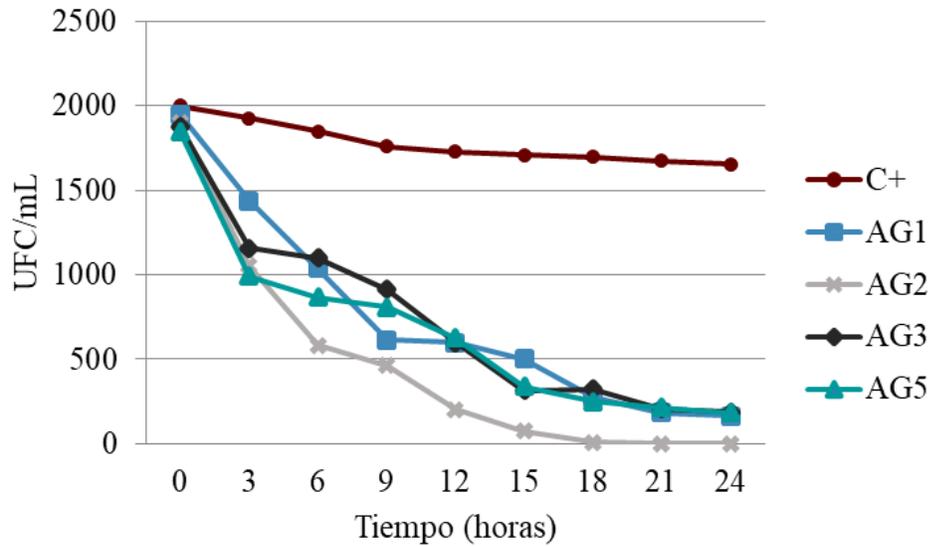


Figura 16. Reducción de Unidades Formadoras de Colonias de la cepa *S. aureus* frente a las CMI de los derivados de quinoxalina (AG1-AG5) y control positivo: cepa de *S. aureus* sin derivados (C+).

7.1.5 Actividad citotóxica

A continuación, en la figura 17, se muestra el efecto citotóxico de los compuestos derivados de QNX sobre la línea celular de macrófagos murinos J774, donde se puede observar que entre mayor es la concentración de los compuestos mayor es el porcentaje de citotoxicidad.

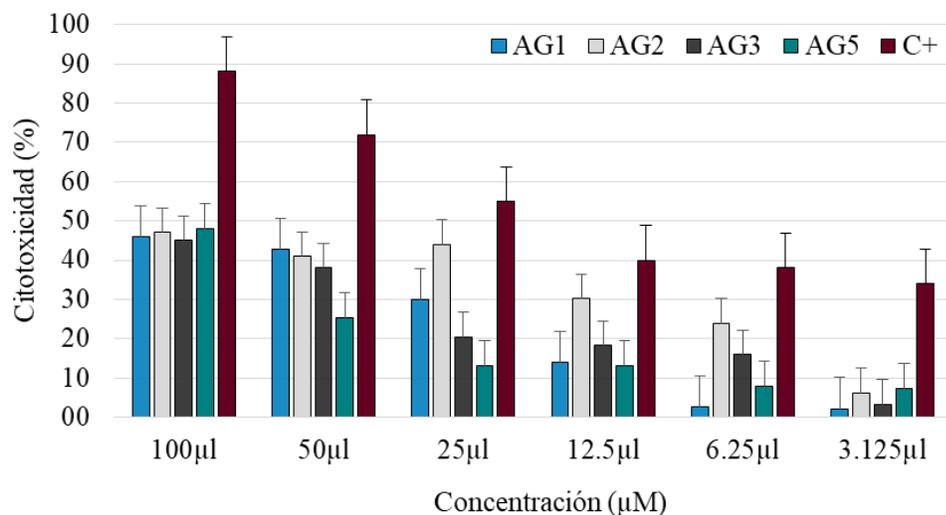


Figura 17. Porcentaje de citotoxicidad en Macrófagos murinos J774, (AG1-AG5) Derivados de quinoxalina, (C+) Control positivo: Sulfato de vincristina

El índice de inhibición máximo medio se refiere a la cantidad de un fármaco u otra sustancia necesaria para inhibir un proceso biológico dado a la mitad. Este valor fue determinado con la finalidad de saber la dosis media que induce la muerte celular en macrófagos murinos J774 (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de actividad citotóxica de los compuestos en línea celular macrófagos murinos J774

Compuesto	Fórmula	IC ₅₀
AG1	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅ S	123.872
AG2	C ₁₈ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₆	119.896
AG3	C ₁₈ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅	132.151
AG5	C ₂₀ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₅	103.678

Para determinar si los compuestos son selectivos, se determinó el índice de selectividad, que es la relación entre la IC₅₀ y la CMI. El índice muestra la efectividad del compuesto o sustancia contra un microorganismo y el grado de citotoxicidad, de tal manera que un valor entre 10 y 100 es considerado selectivo contra un microorganismo y presenta una citotoxicidad de moderada a baja, respectivamente.

Tabla 11. Resultados de Índice de selectividad

Compuesto	Fórmula	Índice de selectividad
AG1	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅ S	4.0
AG2	C ₁₈ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₆	7.7
AG3	C ₁₈ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₅	0.5
AG5	C ₂₀ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₅	3.3

VIII. DISCUSIÓN

En las últimas décadas se han reportado una gran variedad de cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos, siendo participes de uno de los fenómenos globales más importantes. Según la OMS este acontecimiento representa un riesgo para la medicina moderna, ya que puede comprometer la vida de pacientes en una simple intervención quirúrgica. Esto ha hecho que investigadores se den a la tarea de buscar nuevas alternativas y diseño de compuestos químicos que puedan cubrir el requerimiento de nuevos fármacos (OMS, 2017). Investigaciones han reportado que compuestos heterocíclicos derivados de mono-óxido y di-óxido de quinoxalina presentan diversas actividades biológicas, siendo la antibacteriana una de las más destacables (Palos & Rivera, 2016).

El enfoque de esta investigación se centró en evaluar nuevos compuestos derivados de quinoxalina, mediante la realización de ensayos *in vitro* sobre cinco especies bacterianas aisladas de casos clínicos veterinarios y en cepas control.

Se realizó un antibiograma con multidiscos comerciales (Tabla 5 y 6) a todos los microorganismos estudiados en la presente investigación, con la finalidad de seleccionar el antibiótico que correspondería al control positivo. Los resultados muestran una gran resistencia por parte de *E. coli*, la ciprofloxacina tuvo buena respuesta ante las demás cepas bacterianas, por lo que se seleccionó como control positivo, además de presentar cierta similitud estructural a la quinoxalina. Por otro lado la amoxicilina no se encontraba presente en los sensidiscos, sin embargo, se optó por incluirla debido a que es una de las penicilinas semisintéticas más utilizadas en la terapia inicial de infecciones en medicina humana y veterinaria; además que en previos estudios fue utilizada como control positivo (Morales *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014).

Con el fin de seleccionar los compuestos que tuvieran actividad frente a las cepas se realizó un *cribado* mediante la prueba de difusión en agar. Los resultados mostraron que las cepas gram negativo no fueron susceptibles a ningún compuesto, esto podría deberse a la doble membrana celular que poseen en su estructura y/o a la capacidad de generar

bombas de flujo que no permiten ejercer la actividad de algunos antibióticos (Morales *et al.*, 2012). Por otro lado, la cepa gram positivo mostró sensibilidad a cuatro de los cinco compuestos probados. El compuesto que presentó mayor zona de inhibición fue AG2 (Figura 19) con un diámetro de 19 a 24 mm para la cepa *S. aureus* control y aislada respectivamente. Por otro lado, el compuesto AG4 (Tabla 4) no presentó actividad en ninguna de las cepas ensayadas. Dicha estructura presentaba ciertas diferencias en comparación con el resto de las moléculas, como la ausencia de un anillo aromático en la posición 2 y falta de un grupo trifluorometilo en la posición 3. Así, se puede considerar que los anillos aromáticos y el grupo trifluorometilo dan la actividad antibacteriana al resto de las moléculas.

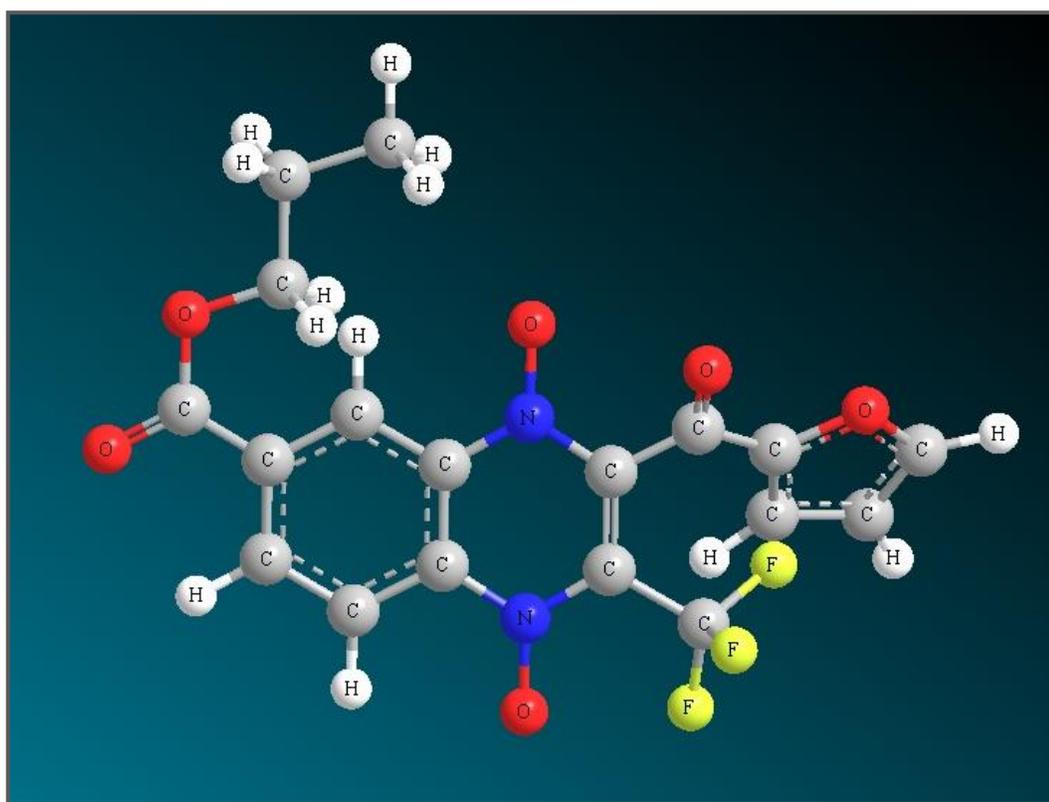


Figura 18. Compuesto AG2: *Propil 3-(furan-2-carbonil)-1,4-di (λ1-oxidanil)-2-(trifluorometil)-1λ4,4λ4-quinoxalina-6-carboxilato*

En un estudio realizado por Morales *et al.* (2012) dos estructuras con un grupo piridina y un halógeno (*6-Cloro-2,3-dipiridin-2-il-quinoxalina* y *6-Bromo-2,3-dipiridin-2-il-quinoxalina*), presentaron un halo de inhibición de 16 mm frente a *S. aureus* siendo los mayores diámetros frente a esta cepa. La actividad puede ser atribuida al carácter lipófilo proporcionado por el grupo piridina.

Teja *et al.* (2016) sintetizaron *tiadiazolo [2',3':2,3] imidazo [4,5-b] quinoxalina* a partir de o-fenilendiamina y fueron probados frente a bacterias gram negativo (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y gram positivo (*S. aureus* y *B. cereus*). Se encontró que los compuestos con anillo fenilo no sustituido o con grupos donadores de electrones mostraba una mejor actividad antibacteriana que los que tenían grupos de extracción de electrones en el anillo fenilo.

Los resultados de la Tabla 9 muestran los valores de CMI de derivados de QNX, de los cuales el compuesto AG2 presentó una concentración de inhibición favorable de 15.6 $\mu\text{M}/\text{ml}$, mientras que en las demás estructuras la CMI oscilaba entre 31.25 a 62.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$. El compuesto AG3 tuvo la concentración más elevada.

Estudios realizados por Vieira *et al.* (2014) presentaron valores de CMI desde 500 a 800 $\mu\text{g}/\text{L}$ solo en cepas de *E. coli*, mientras que Morales *et al.* (2012) obtuvo CMI de 0.05 $\mu\text{M}/\text{mL}$ en *S. aureus*. Parhi *et al.* (2017) obtuvo CMI de 12.5 y 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ contra *P. aeruginosa* y *S. pyogenes* comparables a los fármacos de referencia utilizados.

Ishikawa *et al.* (2012) sintetizó derivados de 2,3 bis (bromometil) quinoxalina con sustituyentes en las posiciones 6 y 7, el compuesto que tenía un grupo trifluorometilo en la posición 6 fue el más activo frente a las cepas gram positivo estudiadas (*B. subtilis* y *S. aureus*), presentando una CMI más baja (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación al resto de los compuestos. La actividad se le atribuye al grupo trifluorometilo que es un atractor de electrones y altamente lipófilo.

Los resultados obtenidos tanto en la prueba de difusión en agar como la CMI sugieren que la capacidad atractora de electrones como la lipofilidad de los sustituyentes en la posición 2 y 3 generan una actividad antibacteriana más elevada, a diferencia de la estructura AG4 el cual carece de estos. En general, la propiedad lipofílica de un compuesto es sumamente importante ya que le permite impregnar la membrana de la célula bacteriana.

En cuanto a la viabilidad celular para cada compuesto que presentó actividad (Figura 16 y 17), los resultados muestran que dentro de las primeras horas el número de UFC/mL es elevado. A partir de las 6 horas comienzan a disminuir las UFC/mL hasta las 18 horas en donde el compuesto AG2 eliminó el 99.9% de UFC. Vieira *et al.* (2014) reportó resultados similares en donde las UFC comienzan a disminuir a partir de las 3 horas y después de 24 horas no se visualiza crecimiento de UFC.

La actividad citotóxica de cada uno de los compuestos con actividad, fue ensayada frente a macrófagos murinos J774-A1, en donde se obtuvieron valores de IC_{50} entre 103.678 a 132.152 μ M. Los compuestos ensayados al ser estructuras nuevas, no se tienen registros de valores determinados, sin embargo, se han reportado investigaciones como la de Kaplum *et al.* (2016), en la cual realizaron ensayos de citotoxicidad sobre la misma línea celular de dos estructuras derivadas de quinoxalina (*6,7-dicloro-2,3-difenilquinoxalina* y *2,3-di-(4-metoxifenil) quinoxalina*) mostrando IC_{50} de 203.0 y 589.6 μ M, respectivamente. Estos resultados son superiores a los obtenidos, por lo que se sugiere que las dosis son más limitadas para las estructuras reportadas en este estudio.

Otro parámetro evaluado fue el índice de selectividad que es la relación entre la IC_{50} y la CMI para un compuesto determinado. Este índice determina la efectividad contra un microorganismo dado. Los resultados mostraron que el compuesto más efectivo con mejor actividad antibacteriana y moderada citotoxicidad fue el compuesto AG2. El resto de los compuestos no presentaron selectividad competitiva, indicando que presentan valores de CMI alto y valores bajos de IC_{50} , siendo tóxico tanto para la cepa bacteriana como para el macrófago, lo cual limita su uso.

IX. CONCLUSIÓN

En conclusión, entre los diferentes derivados de quinoxalina evaluados en la presente investigación solo se obtuvo actividad antibacteriana frente a cepas gram positivo. Esto puede deberse a la composición estructural de la doble membrana celular que presentan las bacterias gram negativo, además de tener la capacidad de generar mecanismos de resistencia como bombas de flujo.

Los resultados revelaron que de los compuestos estudiados AG2 tuvo la mejor actividad antibacteriana (halo de inhibición 24 mm y CMI 15.65 $\mu\text{M}/\text{mL}$) y una citotoxicidad moderada frente a la línea celular macrófagos murinos J774 (IC_{50} 119.896 y IS 7.7). A pesar que los valores mostrados de IS no llegan a superar el 10, no se descarta esta molécula para estudios futuros ya que podría ser la base de una molécula con mejor potencial antibacteriano y con bajos niveles citotóxicos.

Otro punto destacable es que los resultados demostraron que las moléculas con un grupo trifluorometilo en la posición tres y la adición de un anillo aromático en la posición dos aumentaron la actividad antibacterial en la cepa *S. aureus*, siendo competentes frente al fármaco de referencia utilizado (amoxicilina).

X. PERSPECTIVAS

Experimentar con otros microorganismos gram positivos de importancia para medicina humana y veterinaria, como *Streptococcus* spp, *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, entre otros.

Realizar más estudios de citotoxicidad en diferentes líneas celulares para verificar que la o las moléculas puedan utilizarse como medicamentos orales, tópicos, inyectables o como desinfectantes de superficies.

Diseñar un posible mecanismo de acción por medio de estudios experimentales como *in silico*, *in vivo* y *ex vivo*.

Utilizar el resultado de este estudio para contribuir al diseño de nuevas moléculas para cubrir la demanda requerida de nuevos fármacos antimicrobianos.

XI. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, G., and B. Garcı. (2008). derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. 43:1737–1741. doi:10.1016/j.ejmech.2007.10.031.

Aguirre, G., H. Cerecetto, D. Maio, M. Gonz, M. Alfaro, and M. Angel. (2004). Quinoxaline N, N 0 -dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure – activity relationships. 14:3835–3839. doi:10.1016/j.bmcl.2004.04.088.

Armbruster C., Mobley H. & Pearson M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection, EcoSal Plus 2018; doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.

Armbruster C.E. & Mobley H.L. (2012). La fusión de la mitología y la morfología: el estilo de vida multifacético de *Proteus mirabilis*. Revisiones de la naturaleza. Microbiología, 10 (11), 743–754. doi: 10.1038 / nrmicro2890.

Bagley S., Seidler R. J., Brenner D. J. (1981). *Klebsiella planticola* sp. nov.: una nueva especie de enterobacterias que se encuentra principalmente en ambientes no clínicos. Curr. Microbiol. 6: 105 - 109.

Baird-Parker, A.C. (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive *Staphylococcus* J. Appl. Bacteriol. 25: 12-19.

Behera, S., Mishra, R., Pati, P., & Sahu, M. K. (2016). Antibioqram of Microbes Associated with Otitis in Canines. 17, 280–282.

Benitez, D., M. Cabrera, P. Hern, L. Boiani, M.L. Lavaggi, R. Di Maio, G. Yalu, E. Serna, S. Torres, M.E. Ferreira, N.V. De Bilbao, E. Torres, B. Solano, E. Moreno, I. Aldana, L. Adela, H. Cerecetto, M. Gonz, and A. Monge. (2011). 3-trifluoromethylquinoxaline N, N 0-dioxides as anti-Trypanosomatid agents.

Identification of optimal anti- *T. cruzi* agents and mechanism of action Studies. 3624–3636.

Biberstein E.L, y Zee Chung Y., (1994). Tratado de microbiología veterinaria. Acribia S.A., Zaragoza, pp. 105-117, 257-262, 325-329.

Bouzari, S., Jafari, A., & Aslani, M. M. (2012). *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. Iranian Journal of Microbiology, 4(3), 102–117.

Bullen J. J., Rogers H. J., Griffiths E. (1978) Papel del hierro en la infección bacteriana. Curr. Parte superior. Microbiología e Inmunología 80: 1 - 35.

Burguete, A., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Ancizu, S., Villar, R., Solano, B., *et al.* (2011). Synthesis and biological evaluation of new quinoxaline derivatives as antioxidant and anti-inflammatory agents Chem Biol Drug Des, 77 (4) pp. 255-267

Burguete, A., Y. Estevez, D. Castillo, G. González, R. Villar, B. Solano, E. Vicente, S.P. Silanes, I. Aldana, A. Monge, M. Sauvain, and E. Deharo. (2008). Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1- (1, 4-di- N -oxide quinoxalin-2-yl) -2-propen-1-one derivatives. 103:778–780.

Burwen D. R., Banerjee S. N., Gaynes R. P. (1994) Resistencia a la ceftazidima entre bacilos gramnegativos nosocomiales seleccionados en los Estados Unidos. J. Infect. Dis. 170: 1622 – 1625.

Carta, A., M. Loriga, G. Paglietti, A. Mattana, P. Luigi, P. Mollicotti, L. Sechi, and S. Zanetti. (2004). activities of 2-substituted-6, 7-difluoro-3-methylquinoxaline 1 , 4-dioxides. 39:195–203. doi:10.1016/j.ejmech.2003.11.008.

Carta, A., Paglietti, G., Nikookar, M.E.R., Sanna, P., Sechi, L., Zanetti, S. (2002) Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with *in vitro* antimycobacterial and anticandida activity Eur J Med Chem, 37 (5) pp. 355-366.

Carta, A., S. Piras, G. Loriga, and G. Paglietti. (2006). Chemistry, biological properties and SAR analysis of quinoxalinones. 1179–1200.

Celia, P., Mariana, R., & Claudia, C. (2017). Diagnóstico de infección urinaria en canino macho. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Tandil. pp. 1, 2 y 3.

Cheeseman, G.W.; Cookson, R.F. (1979). Condensed pyrazines. in the chemistry of the heterocyclic compounds; pp. 1–27, 35–38.

Chemotherapeutika, A., V. Zytostatika, I. Aldana, A. Monge, E. Deharo, and M. Sauvain. (2005). ArzneimittelForschDrugRes Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives. 761:754–761.

Cheol, K., Hiki, O., Young, M., Park, D., & Kaspar, C. W. (2013). Prevalent and persistent *Escherichia coli* O157: H7 strains on farms are selected by bovine passage. Veterinary Microbiology, 162(2–4), 912–920. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.034>.

Chethana GS, Hari VKR, Mirzaei F, Gopinath SM. (2013). Review on multidrug resistance bacteria and its implication in medical sciences. Journal of Biological and Scientific Opinion. 1(1):32-37.

Clegg S., Gerlach G. F. (1987) Fimbrias enterobacterianas. J. Bacteriol. 169: 934 – 938.

Clegg S., Murphy C., Mulvey A.M., Stapleton E.A. & Klumpp J.D. (2016). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *microbiolspec* 4(1): doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.

Cordeiro, D.S., R. Fernandes, J.A. Pereira, A.M. Pessoa, M. Nat, and C. Prud. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry Quinoxaline, its derivatives and applications: A State of the Art review. 97:664–672. doi:10.1016/j.ejmech.2014.06.058.

Davies J, Davies D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3): 417-433.

De Astorza, B., Cortés, G., Crespí, C., Saus, C., Rojo, JM, y Albertí, S. (2004). C3 promueve la eliminación de *Klebsiella pneumoniae* por las células epiteliales A549. *Infección e inmunidad*, 72 (3), 1767–1774. doi: 10.1128 / IAI.72.3.1767-1774.2004

De Clercq E. (1997) Development of resistance of human immunodeficiency virus (HIV) to anti-HIV agents: how to prevent the problem? *Int J Antimicrob Agents*, 9 (1) pp. 21-36.

De la Fuente-Salcido, D., Margarita, N., Ma, J., León, D., Fuente-salcido, N. M. De, Villarreal-prieto, J. M., León, D. (2016). Evaluation of the activity of antimicrobial agents against the challenge.

Dixit, A. A., Sharma, V., Roy, K., & Husbandry, A. (2011). Microbiological study in canine otitis externa. 6(4), 47–49.

Duque-Montaña, B.E., L.C. Gómez-Caro, M. Sanchez-Sanchez, A. Monge, E. Hernández-Baltazar, G. Rivera, and O. Torres-Angeles. (2013). Synthesis and *in vitro* evaluation of new ethyl and methyl quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide

against *Entamoeba histolytica*. *Bioorganic Med. Chem.* 21:4550–4558. doi:10.1016/j.bmc.2013.05.036.

El-attar, M.A.Z., O.G. Shaaban, R.Y. Elbayaa, N.S. Habib, A.E.A. Wahab, I.A. Abdelwahab, and S.A.M. El-hawash. (2017). Studies of some new quinoxaline Dderivatives targeting dihydropteroate. *Bioorg. Chem.* doi:10.1016/j.bioorg.2017.12.017.

Fernández M.A., Silveira P. E., López O. F. (2006). ISSN 1695-7504 Las infecciones uterinas en la hembra bovina. *Redvet*, VII (10), 1–138.

Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. 159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.

Gomes, TA, Elias, WP, Scaletsky, IC, Guth, BE, Rodrigues, JF, Piazza, RM, Martínez, MB (2016). *Escherichia coli* diarreogénica. *Revista brasileña de microbiología: [publicación de la Sociedad Brasileña de Microbiología]*, 47 Suppl 1 (Suppl 1), 3–30. doi: 10.1016 / j.bjm.2016.10.015.

González, M., H. Cerecetto, and M. Gonza. (2012). Expert opinion on therapeutic patents quinoxaline derivatives: a patent review (2006-present) 3776. doi:10.1517/13543776.2012.724677.

Gradelski, E., Kolek, B., Bonner, D.P., Valera, L., Minassian, B., Fung-Tomc, J. (2001) Activity of gatifloxacin and ciprofloxacin in combination with other antimicrobial agents *Int J Antimicrob Agents*, 17 (2) pp. 103-107.

Greene E.C. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat*. Elsevier Saunders. 4th ed. U.S.A. pp: 353.

Gyles L.C., Prescott F.J., Songer G., Thoen O.C. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Wiley-Blackwell: Iowa, pp. 268-.

H. Landsberg (1949). Prelude to the discovery of penicillin. *Isis* 40 (3): 225-227. doi:10.1086/349043.

Hernández, A., Yagüe, G., García Vázquez, E., Simón, M., Moreno Parrado, L., Canteras, M., & Gómez, J. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 31(2), 123–130.

Hossain, M.M., Muhib, M.H., Mia, M.R., Kumar, S., Wadud, S.A. (2012). *In vitro* antioxidant potential study of some synthetic quinoxalines. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 38 (2) pp. 47-50.

H. Ishikawa, T. Sugiyama, K. Kurita, A. Yokoyama (2012). Synthesis and antimicrobial activity of 2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline derivatives. *Bioorg.Chem.*, 41–42 1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.12.002>

Jacoby G. A., Han P. (1996) Detección de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 908 - 911.

Kaplum, V., Cogo, J., Sangi, D. P., Ueda-Nakamura, T., Corrêa, A. G., & Nakamura, C. V. (2016). *In vitro* and *in vivo* activities of 2,3-diarylsubstituted quinoxaline derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3433–3444. <https://doi.org/10.1128/AAC.02582-15>

Kenneth J.R. y C. George R. (2011). *Sherris Microbiología Médica*. McGraw-Hill: México, D.F. pp. 444-453.

Khan, S.A. (2011). Synthesis of novel steroidal oxazolo quinoxaline as antibacterial agents. Arab. J. Chem. 4:349–354. doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.058.

Khan, S.A., K. Saleem, and Z. Khan. (2007). Synthesis, characterization and *in vitro* antibacterial activity of new steroidal thiazolo quinoxalines. 42:103–108. doi:10.1016/j.ejmech.2006.07.006.

Khimji P. L., Millas A. A. (1978) Microbianos quelantes de hierro y su acción sobre las infecciones de *Klebsiella* en la piel de cobayas. Br. J. Exp. Pathol. 59: 137 - 147

Kleim, J., R. Bender, U. Billhardt, C. Meichsner, G. Riess, M. Rosner, I. Winkler, and A. Paessens. (1993). Activity of a novel quinoxaline derivative against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and viral replication. 37:1659–1664.

Kolenda, R., Burdukiewicz, M., & Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 5, 23. doi:10.3389/fcimb.2015.00023.

Marques, C., Belas, A., Franco, A., Aboim, C., Gama, LT, y Pomba, C. (2017). Aumento de la resistencia a los antimicrobianos y aparición de importantes linajes clonales internacionales de alto riesgo en perros y gatos con infección del tracto urinario: estudio retrospectivo de 16 años. El Diario de la quimioterapia antimicrobiana, 73 (2), 377-384. doi: 10.1093 / jac / dkx401.

McVey D.S., Kennedy M. & Chengappa M.M. (2013). Veterinary Microbiology. 3rd edition. Ed. Wiley-Blackwell. New Delhi, India. pp: 148-150.

Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. Annual Rev Food Sci Technol. 2:299-329.

Moellering R.C. (2011) Discovering new antimicrobial agents Int J Antimicrob Agents, 37 (1) pp. 2-9.

Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R (2007). Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle; Vet Microbiol. 125(1-2): 128 -140.

Morales-Castellanos, J.J., K. Ramírez-Hernández, N.S. Gómez-Flores, O.R. Rodas-Suárez, and J. Peralta-Cruz. 2012. Microwave-assisted solvent-free synthesis and *in vitro* antibacterial screening of quinoxalines and pyrido[2, 3b]pyrazines. Molecules. 17:5164–5176. doi:10.3390/molecules17055164.

Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa, LF, Isselo, D., Méndez, JL, Rodriguez, C, Cravioto, A. (2017). Análisis de huellas dactilares e identificación de cepas ST309 como un clon de alto riesgo potencial en una población de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de niños con bacteriemia en la Ciudad de México. Fronteras en microbiología, 8 , 313. doi: 10.3389 / fmicb.2017.00313.

Moreira, L., B. Solano, E. Vicente, M. Sauvain, I. Aldana, A. Monge, and E. Deharo. (2008). Antiplasmodial structure–activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives. 118:25–31. doi:10.1016/j.exppara.2007.05.009.

Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., & Lewis, K. (2013). Biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* en la enfermedad. Ecología microbiana, 68 (1), 1–12. doi: 10.1007/s00248-013-0297-x.

Murray R.P., Rosenthal S.K. & Pfaller A.M. (2009). Microbiología Médica. Elsevier. Madrid, pp. 313.

Nagasawa, Y., Kiku Y., Sugawara K., Tanabe F. & Hayashi T. (2017). Exfoliation rate of mammary epithelial cells in milk on bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is associated with bacterial load. (June). <https://doi.org/10.1111/asj.12886>.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos. Comunicado de prensa. GINEBRA. 20 de septiembre. www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms.

Paczosa, M. K. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>.Address.

Palos I. and Rivera G. (2016). 1, 4-Di-oxido de quinoxalina; Una opción viable para el desarrollo de fármacos antituberculosos. Rev. Mex. Ciencias Farm. 46:17–23.

Parhi, A. K., Zhang, Y., Saionz, K. W., Pradhan, P., Kaul, M., Trivedi, K., Lavoie, E. J. (2013). Antibacterial activity of quinoxalines, quinazolines, and 1,5-naphthyridines. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23(17), 4968–4974. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.048>.

Parhi, A.K., Y. Zhang, K.W. Saionz, P. Pradhan, M. Kaul, K. Trivedi, D.S. Pilch, and E.J. Lavoie. (2013). Antibacterial activity of quinoxalines, quinazolines, and 1,5-naphthyridines. Bioorganic Med. Chem. Lett. 23:4968–4974. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.048.

Patel, N.B., J.N. Patel, A.C. Purohit, V.M. Patel, D.P. Rajani, R. Moo-Puc, J.C. Lopez-Cedillo, B. Noguera-Torres, and G. Rivera. 2017. *In vitro* and *in vivo* assessment of newer quinoxaline–oxadiazole hybrids as antimicrobial and antiprotozoal agents. Int. J. Antimicrob. Agents. 50:413–418. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.04.016.

Peraman, R., R. Kuppusamy, S.K. Killi, and Y.P. Reddy. (2016). New conjugates of quinoxaline as potent antitubercular and antibacterial agents.

Pérez-silanes, S., E. Torres, L. Arbillaga, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, A. Azqueta, and E. Moreno-viguri. (2016). Bioorganic & medicinal chemistry letters synthesis and biological evaluation of quinoxaline di-N-oxide derivatives with *in vitro* trypanocidal activity. 26:903–906. doi:10.1016/j.bmcl.2015.12.070.

Perry Romanowski. «How Products Are Made: Antibiotics». Consultado el 31 de agosto de 2018.

Pietschmann, S., Meyer, M., Voget, M., y Cieslicki, M. (2013). La acción conjunta *in vitro* de polimixina B y miconazol contra patógenos asociados con la otitis externa canina de tres países europeos. Dermatología veterinaria, 24(4), 439-e97. doi: 10.1111 / vde.12037.

Podder, MP, Rogers, L., Daley, PK, Keefe, GP, Whitney, HG y Tahlan, K. (2014). Especies de *Klebsiella* asociadas con mastitis bovina en Terranova. PloS one, 9 (9), e106518. doi: 10.1371 / journal.pone.0106518.

Ponce de León R.S., Hernández A.R. & López V.Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Simposio Gaceta Médica de México. Septiembre. 151:681-9. www.anmm.org.mx.

Pontiki, E., D. Hadjipavlou-litina, E. Moreno, E. Torres, S. Pe, I. Aldana, and A. Monge. (2011). Synthesis and biological evaluation of new quinoxaline derivatives as antioxidant and anti-Inflammatory agents. 255–267. doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01076.x.

Porter, A.E. (1984). An efficient protocol for the synthesis of quinoxaline derivatives at room temperature using molecular iodine as the catalyst. In Comprehensive

heterocyclic Chemistry; Katritzky, A.R., Rees, C.W., Eds.; Pergamon: New York, NY, USA, Volume 3, pp. 157–197.

Pulido, A., Casta, R., & Linares, M. (2010). Diagnóstico clínico-microbiológico de otitis externa en caninos de Bogotá – Colombia Clinical - microbiological diagnostic of external otitis in canines. 15(3), 2215–2222.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (2001). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st edition. Editorial Blackwell Science. UK. pp: 109-112, .

Sader, H.S. (2002). Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica: ¿Cómo estamos?. Revista chilena de infectología, 19 (Supl.1), S5-S13. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019100001>.

Sánchez L. M., González C. C., Castañeda R., Pulido V.A., Guáqueta M. H., Aranda M., Rueda V. M. (2011). Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar). 16(3), 2711–2720.

Santivañez-veliz, M., E. Moreno-viguri, and A. Monge. 2013. Quinoxalinas como potenciales agentes antimycobacterium tuberculosis : una revisión. 79:272–285.

Schaffer N.J., Pearson M.M., Mulvey A.M., Stapleton E.A. & Klumpp J.D. (2015). *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. microbiolspec 3(5): doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.

Soler M., Tello M., Moreso M.J. & Riera L. (2000). Otitis externa en perros y gatos: aislamiento microbiológico y antibioterapia. Avepa. 20(3): 72-74.

Sukkua, K., Manothong, S., & Sukhumungoon, P. (1999). Original article seroprevalence and molecular epidemiology of EAST1 gene-carrying *Escherichia coli* from diarrheal patients and raw meats. <https://doi.org/10.3855/jidc.6865>.

Taibo, R. (2003). *Otología: Temas de clínica y cirugía*. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina) pp: 3-197.

Tariq, S., Somakala, K., & Amir, M. (2017). Quinoxaline: An insight into the recent pharmacological advances. SC. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.064>.

R. Teja, S. Kapu, S. Kadiyala, V. Dhanapal, A.N. Raman (2016). Heterocyclic systems containing bridgehead nitrogen atom: Synthesis and antimicrobial activity of thiadiazolo[2',3':2,3]imidazo[4,5-B]quinoxaline. *J. Saudi Chem. Soc.* 20 S387–S392. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.011>

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.

Treacy, J., Jenkins, C., Paranthaman, K., Jorgensen, F., Mueller-doblies, D., Anjum, M., & Kaindama, L. (2019). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 linked to raw drinking milk resolved by rapid application of advanced pathogen characterisation methods, England, August to October 2017.

Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. 11(4), 589–603.

Umale, M. J., & Rode, A. M. (2015). Evaluation of etiology and antibiogram in otitis - A clinical study of 40 Dogs, *16*, 325–329.

Van Epps HL (2006). René Dubos: unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.* 203 (2): 259. PMID 16528813.

Versalovic J., Carroll C.K., Funke G., Jorgensen H.J., Landry L.M., Warnock W.D. (2011). *Manual of clinical microbiology* 10th Edition. Edit ASM press. Washington, DC. pp: 659-657.

Vicente, E., L.M. Lima, E. Bongard, S. Charnaud, R. Villar, B. Solano, I. Aldana, L. Vivas, and A. Monge. (2008). Synthesis and structure e activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1, 4-di-N-oxide derivatives as antimalarial agents. 43:1903–1910. doi:10.1016/j.ejmech.2007.11.024.

Vicente, E., P.R. Duchowicz, D. Benítez, E.A. Castro, H. Cerecetto, M. González, and A. Monge. (2010). Bioorganic & medicinal chemistry letters anti- *T. cruzi* activities and QSAR studies of 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile di-N-oxides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20:4831–4835. doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.101.

Vidal, J. E., & Canizález-román, A. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. 49(5).

Vieira, M., Pinheiro, C., Fernandes, R., Noronha, J. P., & Prudêncio, C. (2014). Antimicrobial activity of quinoxaline 1,4-dioxide with 2- and 3-substituted derivatives. *Microbiological Research*, 169(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.015>.

Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GW, Cao XY, Shen JZ (2008). Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis; *Vet Microbiol.* 130(1-2): 118-125.

Waring, M.J., Ben-Hadda, T., Kotchevar, A.T., Ramdani, A., Touzani, R., Elkadiri, S., *et al.* (2002). 2, 3-Bifunctionalized quinoxalines: synthesis, DNA interactions and

evaluation of anticancer, anti-tuberculosis and antifungal activity *Molecules*, 7 (8) pp. 641-656.

Wenner J.J. & Rettger F.L. (1919). Un estudio sistemático del grupo *Proteus* de las bacterias. *Revista de bacteriología*, 4 (4), 331–353.

Williams P., Lambert P. A., Brown M. RW, Jones R. J. (1983) El papel de los antígenos O y K en la determinación de la resistencia de *Klebsiella aerogenes* a la destrucción del suero y la fagocitosis. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2181 – 2191.

Yang SC. Lin CH, Sung CT, Fang JY. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 5: 241.

Zanetti, S., Sechi, L.A., Molicotti, P., Cannas, S., Carta, A., Bua, A., *et al.* (2005) *In vitro* activity of new quinoxalin 1,4-dioxide derivatives against strains of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 25 (2) pp. 179-181.

Zarenezhad, E., M. Hossein, and A. Alborzi. (2014). Efficient synthesis of 3, 4-dihydro-1 H -quinoxalin-2-ones and 1 H - quinolin-2- ones and evaluation of their anti-bacterial activity. 38:337–340.

Zhao, Y., G. Cheng, H. Hao, Y. Pan, Z. Liu, M. Dai, and Z. Yuan. (2016). *In vitro* antimicrobial activities of animal- used quinoxaline 1, 4-di-N-oxides against mycobacteria, mycoplasma and fungi. 1–14. doi: 10.1186/s12917-016-0812-7.