

Evaluación del Potencial de Compuestos Naturales para Modular la Toxicidad y La Resistencia a Antibióticos en Cepas de Staphylococcus Aureus Meticilina Resistentes

Silvia Ximena Barrios Martínez

**Trabajo de Investigación para Optar al Título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

Director

Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Co-Directora

Dra. Raquel E. Ocazonez.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Departamento de Ciencias Básicas

Bucaramanga

2017

Contenido

Introducción	11
1. Marco Teórico.....	13
1.1 Staphylococcus aureus	13
1.2 Mecanismo de acción de antibióticos β -lactámicos.....	13
1.3 Resistencia microbiana a antibióticos	14
1.4 Base genética de la resistencia en a antibióticos β - lactámicos en S. aureus.....	15
1.5 Respuesta SOS en S. aureus.....	17
1.6 Modulación de la resistencia a antibióticos bloqueando la inducción de a respuesta SOS. ...	18
1.7 Desarrollo de alternativas terapéutica para el control de microorganismos resistente a antibióticos.....	19
1.8 Actividad antibacteriana de extractos de plantas y su actividad moduladora de la toxicidad de antibióticos	20
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo general.....	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Materiales y Métodos.....	23
3.1 Compuestos Químicos	23
3.2 Medio de cultivo	23
3.3 Aceites esenciales	23
3.4 Estirpes bacterianas.....	24
3.5 Comprobación de genotipo de las cepas de S. aureus	25
3.6 Condiciones de cultivo y conservación de las cepas de S. aureus	26
3.7 Ensayos de actividad antibacteriana de AE, terpenos y antibióticos	26
3.8 Ensayos de modulación de la actividad de antibióticos.....	27

3.9 Inducción de mutantes resistentes a ampicilina en MSSA y su modulación por AE y terpenos.....	28
3.10 Análisis de la relación entre la inducción de resistencia a ampicilina y la respuesta SOS en MSSA.....	29
3.11 Análisis estadístico.....	31
4. Resultados.....	31
4.1 Cinética de crecimiento de las cepas de S. aureus MSSA y MRSA.....	31
4.2 Caracterización del perfil de resistencia de las cepas S. aureus MRSA y MSSA	32
4.3 Actividad antibacteriana de AE y terpenos.....	34
4.4 Potenciación de la actividad antibiótica con AE y terpenos en MRSA	37
4.5 Inducción de resistencia a antibióticos en S. aureus MSSA	38
4.6 Análisis de la relación entre la inducción de resistencia a ampicilina y la respuesta SOS en MSSA.....	40
5. Discusión.....	43
6. Conclusiones.....	45
7. Recomendaciones	46
Bibliografía	47
Apéndices.....	57

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura básica de antibióticos β -lactámicos.....	13
Figura 2. Modelo de activación de la Respuesta SOS por antibióticos β -lactámicos modificado del planteado por Kohanski et al., (2007).	15
Figura 3. A. Representación esquemática de la proteína de membrana BLAR1 que está implicado en la regulación de la PBP 2 (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005). B. Modelo de activación de la traducción de las Proteínas β -lactamasas y PBP2 (McCallum et al., 2010).	16
Figura 4. (A) Cinética de crecimiento de las cepas MSSA y MRSA. (B) Se presentan los valores de la pendiente μ o constante de velocidad máxima de crecimiento para la zona de ajuste lineal de la curva de crecimiento.	32
Figura 5. Electroforesis de agarosa al 0.8% en buffer TBE correspondiente a la amplificación usando los cebadores específicos para el gen <i>mecA</i> en cepas de <i>S. aureus</i> . De izquierda a derecha: M (Ladder 1 kp) CNA (control de no amplificación), cepa MRSA y cepa MSSA.	32
Figura 6. Actividad de los antibióticos penicilina G, meticilina y ampicilina, expresado como porcentaje de inhibición del crecimiento, en las cepas <i>S. aureus</i> MSSA (símbolos vacíos) y MRSA (símbolos rellenos). Las flechas indican la mínima concentración de los antibióticos que inhiben el 100% del crecimiento celular (CMI) en cada cepa.	33
Figura 7. Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los AE estudiados. Se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento para las cepas de <i>S. aureus</i> MSSA (A) y MRSA (B). 35	
Figura 8. Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los compuestos terpenos carvacrol y timol. Se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento para las cepas de <i>S. aureus</i> MSSA (símbolos vacíos) y MRSA (símbolos rellenos).	36
Figura 9. Amplificación de los genes <i>lexA</i> , <i>recA</i> y 16S rRNA mediante la RT-PCR en los tratamientos T1 (cultivo sin tratar con ampicilina) y T2 (cultivo tratado con ampicilina). A) Curvas de amplificación de cada gen. B) Curvas “melting” de cada gen.....	41
Figura 10. Expresión relativa del gen <i>RecA</i> en los tratamientos T1 (cultivo sin tratar con ampicilina), T2 (cultivo tratado con ampicilina), T5 (cultivo tratado con ampicilina y con una concentración no tóxica del terpeno carvacrol) y T9 (cultivo tratado con una concentración no tóxica del terpeno carvacrol).....	42

Lista de Tablas

Tabla 1. Aceites esenciales de plantas y compuestos con propiedad antibacteriana y potenciadora de la toxicidad de antibióticos en <i>S. aureus</i>	21
Tabla 2. Lista de las plantas estudiadas. Se incluye el código del Herbario Nacional Colombiano (CNH) y el sitio de colecta.....	24
Tabla 3. Lista de cebadores usados en el análisis de expresión de los genes implicados en la resistencia a antibióticos β -lactámicos con sus secuencias.....	30
Tabla 4. Co-ensayos de antibióticos β -lactámicos (ampicilina, meticilina y penicilina) con AE y terpenos usando la cepa MRSA. Se presentan la CMI de los antibióticos en los co-ensayos. Entre corchetes, se indica el número de veces que se recude la CMI del antibiótico en los co-ensayos.	37
Tabla 5. Ensayos in vitro de inducción de resistencia al antibiótico ampicilina en <i>S. aureus</i> MSSA. Para los diferentes tratamientos, se presentan los valores de número de células/mL, la frecuencia de mutantes y sus correspondientes errores estándar; obtenidos para las dos condiciones de selección usadas (con y sin ampicilina).	39

Lista de Apéndices

Apéndice A. Alineamiento de la secuencia del gen <i>mecA</i> de cepas de <i>S. aureus</i> (rojo) contra una secuencia de referencia KX139524 (negro) disponibles en la base de datos NCBI.	57
Apéndice B. Actividad antibacteriana de AE. Se presentan la CMI de los AEs en las cepas de <i>S. aureus</i> MSSA y MRSA. NI: No inhibición.	58
Apéndice C. Actividad antibacteriana de terpenos. Se presentan la CMI de los terpenos en las cepas de <i>S. aureus</i> MSSA y MRSA. NI: No inhibición.....	59
Apéndice D. Actividad potenciadora de la actividad antibiótica con AE en MRSA. Co-ensayos de los AE con los antibióticos β -lactámico con: A. Penicilina. B. Meticilina. C. Ampicilina	60
Apéndice E. Actividad potenciadora de la actividad antibiótica con terpenos en MRSA. Co-ensayos de los AE con los antibióticos β -lactámico con: A. Penicilina. B. Meticilina. C. Ampicilina.....	62

Resumen

Título: Evaluación del potencial de compuestos naturales para modular la toxicidad y la resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes*

Autor: Silvia Ximena Barrios Martínez**

Palabras Clave: *Staphylococcus aureus*, resistencia, Aceite esencial, Terpenos, antibiótico, mutaciones.

Descripción:

Staphylococcus aureus tiene una alta capacidad de adaptación a condiciones ambientales de estrés producida por antibióticos. Particularmente, las cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), son causa de infecciones hospitalarias en todo el mundo. La resistencia a antibióticos se desarrolla a través de mutaciones o mediante la adquisición de islas genómicas de resistencia. Ambos mecanismos se encuentran estrechamente relacionados con un mecanismo de emergencia celular en bacterias denominado, respuesta SOS. En este contexto, los aceites esenciales (AE) obtenidos de plantas, y sus metabolitos secundarios, han demostrado su potencial como antibacterianos y como potenciadores de otros agentes antibacterianos. En este estudio, se evaluó la actividad antibacteriana y potenciadora de la toxicidad de antibióticos de 23 AE y 18 compuestos terpenos. Adicionalmente, se evaluó si los AE y terpenos promisorios pueden inhibir el desarrollo de resistencia bacteriana y la inducción de la respuesta SOS en *S. aureus*. Los AE de *Psidium sartorianum* COL578359 (WC = 390 µg / mL) y *Turnera diffusa* COL578361-04E (WC = 780 µg / mL), mostraron actividad antibacteriana moderada y baja, respectivamente. Los co-tratamientos de células de MRSA con AE promisorios y antibióticos β-lactámicos, disminuyeron los valores de CMI de los antibióticos como sigue: meticilina (2 a 8 veces), penicilina (4 a 16 veces) y ampicilina (65 a 263 veces). Los co-tratamientos de células MRSA con compuestos terpenos y antibióticos, disminuyeron la CMI de antibióticos de la siguiente manera: meticilina (1.6 veces), penicilina (2 a 4 veces) y ampicilina (128 a 263 veces). Adicionalmente, los AE de *T. diffusa* y *P. sartorianum*; así como, los terpenos carvacrol y timol, redujeron significativamente la tasa de mutación inducida por la exposición a concentraciones sub-tóxicas de ampicilina. Además, el carvacrol inhibió significativamente la expresión del gen *recA* inducido por tratamiento con ampicilina. Nuestros resultados indicaron que tanto los AE de *P. sartorianum* y *T. diffusa*, como los terpenos timol y carvacrol, tienen potencial para la terapéutica con antibióticos en infecciones bacterianas de MRSA.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Salud. Departamento de Ciencias Básicas. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Co-director: Dra. Raquel E. Ocazonez.

Abstract

Title: Evaluation of potential natural compounds to modify toxicity and resistance to antibiotics in *Staphylococcus aureus* methicillin resistant*

Author: Silvia Ximena Barrios Martínez**

Keywords: *Staphylococcus aureus*, resistance, Essential oil, Terpenes, antibiotic, mutations.

Description:

Staphylococcus aureus has a high ability to adapt to environmental conditions produced by antibiotics. **In particular**, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are the cause of hospital-acquired infections worldwide. Antibiotic resistance develops through mutations or acquisition of resistance genomic islands. Both mechanisms are closely related with a cellular emergency mechanism in bacteria called, the SOS response. In this context, essential oils (AEs) obtained from plants, and their secondary metabolites, show their potential as antibacterials and as enhancers of other anticicrobial agents. In this study, were evaluated the antimicrobial activity and potentiator of the antibiotic toxicity of 23 AE and 18 terpenes. In addition, we evaluated if promising AE and terpenes may inhibit the development of bacterial resistance and the induction of SOS response in *S. aureus*. The AE of *Psidium sartorianum* COL578359 (WC = 390 µg / mL) and *Turnera diffusa* COL578361-04E (WC = 780 µg / mL) showed moderate and low antimicrobial activity, respectively. Co-treatments of MRSA cells with promising AEs and β-lactam antibiotics decreased MIC values of antibiotics as follows: methicillin (2 to 8 fold), penicillin (4 to 16 fold) and ampicillin (65 to 263 fold). Co-treatments of MRSA cells with terpene compounds and antibiotics decreased antibiotic MIC as follows mode: methicillin (1.6 fold), penicillin (2 to 4 fold) and ampicillin (128 to 263 fold). In addition, the AE of *T. diffusa* and *P. sartorianum*; As well as, terpenes carvacrol and thymol, significantly reduced the rate of mutation induced by exposure to sub-toxic concentrations of ampicillin. In addition, carvacrol significantly inhibited the expression of the recA gene induced by ampicillin treatment. Our results indicated that both AE *P. sartorianum* and *T. diffusa*, such as, the terpenes thymol and carvacrol, have potential for antibiotic therapy in bacterial MRSA infections.

* Research Work

** Faculty of Health. Department of Basic Sciences. Master in Basic Biomedical Sciences. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Co-director: Dr. Raquel E. Ocazonez.

Introducción

Los antibióticos han demostrado ser poderosos fármacos para el control de enfermedades infecciosas. Sin embargo, su uso extensivo y sin restricciones ha impulsado el desarrollo de resistencia bacteriana, limitando drásticamente los tratamientos con antibióticos convencionales (Bitu *et al.*, 2014; Fuda, Fisher, y Mobashery 2005). Aproximadamente, el 50% de las infecciones nosocomiales (hospitalarias) en todo el mundo son causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. De hecho, enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes, siguen siendo una de las causas más importantes de mortalidad en humanos (Abreu, Mcbain, y Sim 2012).

La bacteria *Staphylococcus aureus* se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y forma parte de la flora bacteriana humana (Fitzgerald 2014). Este microorganismo puede causar desde infecciones de piel hasta endocarditis infecciosa poniendo en peligro la vida humana. En especial, las cepas de *S. aureus* resistente a la Meticilina (MRSA, de sus siglas en inglés) se han convertido en un grave problema de salud pública; dado que su incidencia en ambientes hospitalarios se asocia con morbilidad y mortalidad (Fitzgerald 2014; Nuño *et al.*, 2016). Dado que, las cepas de MRSA presentan gran capacidad de adaptación y que han desarrollado resistencia a múltiples clases de antibióticos, las opciones terapéuticas para combatir este microorganismo actualmente son limitadas (Barreto *et al.*, 2014; Fitzgerald 2014; Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; Goldstein *et al.*, 2007; Klitgaard *et al.*, 2008).

La búsqueda de nuevos antimicrobianos capaces de superar los problemas de resistencia bacteriana, ha sido durante mucho tiempo una la prioridad de la investigación de la industria farmacéutica (Abreu, Mcbain, y Sim 2012). Nuevos hallazgos sobre la base genética de los procesos de resistencia a antibióticos, indican que dicha resistencia está estrechamente relacionada con la respuesta SOS; una respuesta inducible relacionada con el daño genético en bacterias (Beaber, Hochhut, y Waldor 2004; Bollenbach *et al.*, 2009; Cirz *et al.*, 2005; Couce y Blázquez 2009; Cuirolo, Plata, y Rosato 2009; Fitzgerald 2014; Goldstein *et al.*, 2007; Hanssen y Ericson 2006; Kelman y Kelman 2004; Kohanski *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007; Maiques *et*

al.,2006; McCallum, Berger-Bächli, y Senn 2010; Miller *et al.*,2003; Rosato *et al.*,2014; Wright 2007; Yam, Hamilton-Miller, y Shah 1998). Estos hallazgos, abren nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias antibacterianas que permitan un control efectivo de las cepas MRSA (Plata *et al.*,2013; Rosato *et al.*,2014).

Las plantas proporcionan una nueva fuente de moléculas con actividad biológica con potencial valor terapéutico sobre infecciones bacterianas. Estudios recientes, han demostrado que los aceites esenciales de plantas y sus constituyentes químicos presentan actividad antibacteriana. De hecho, se ha demostrado que sustancias naturales, derivadas de extractos o aceites esenciales de plantas pueden usarse para modificar la toxicidad de los antibióticos, aumentando su eficacia terapéutica en cepas de MRSA (Abreu, Mcbain, y Sim 2012; Barreto *et al.*,2014; Bitu *et al.*, *et al.*,2014; Cos *et al.*,2006; Hendry *et al.*,2009; Lavor *et al.*,2014; Morais-braga *et al.*,2016; Vidal *etal.*, 2016; Qiu *et al.*,2011).

Con base en los fundamentos genéticos que relacionan la inducción de resistencia a antibióticos con la respuesta SOS en bacterias (Mo *et al.*, 2016), el presente trabajo tiene como hipótesis que los aceites esenciales de plantas que inhiben la respuesta SOS en MRSA pueden ser una fuente de moléculas interesantes para inhibir la inducción de resistencia a antibióticos. Adicionalmente, que los aceites esenciales con actividad antibacteriana, baja toxicidad en humanos y bajos costo de producción (Bruna, Galvao, y George 2016); pueden resultar en formulaciones que combinan antibióticos y aceites esenciales, con mayor efectividad y espectro de acción. El presente proyecto, tiene como objetivo identificar aceites esenciales originarios de la diversidad botánica colombiana y sus constituyentes, que muestren potencial modulador de la toxicidad de antibióticos β -lactámicos y de la resistencia a estos antibióticos en *S. aureus*.

1. Marco Teórico

1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno Gram-positivo, anaerobio facultativo no esporulado, que hace parte de la microflora humana, habitando mayoritariamente la piel y los tractos nasofaríngeo, uro-genital y gastrointestinal (Fitzgerald 2014). Bajo determinadas condiciones, este microorganismo puede producir infecciones como abscesos superficiales en piel, septicemia, osteomielitis, bacteriemia, neumonía necrotizante, osteomielitis, choque tóxico y endocarditis (Fitzgerald 2014; Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; J. Qiu *et al.*,2011). *S. aureus* tiene una alta capacidad de adaptación evolutiva, siendo una de las especies microbianas con más alto número de cepas multiresistentes. En particular, las cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos, son serio un problema de salud pública (Baharoglu, Garriss, y Mazel 2013; Cirz *et al.*,2005; DeLeo, Diep, y Otto 2009; López *et al.*,2007; Slager *et al.*,2014).

1.2 Mecanismo de acción de antibióticos β -lactámicos

En la actualidad existen tres tipos principales de blancos terapéuticos para los fármacos antibacterianos: la biosíntesis de la pared celular, la síntesis proteica, y la replicación del ADN bacteriano. Dentro de los antibióticos que afectan la biosíntesis de la pared celular, se encuentran los antibióticos β -lactámicos (Figura 1), los cuales contienen en su estructura molecular un anillo β -lactámico (Kohanski, DePristo, y Collins 2010; Plata et al. 2013; T. R. Walsh 2006; Wright 2007).

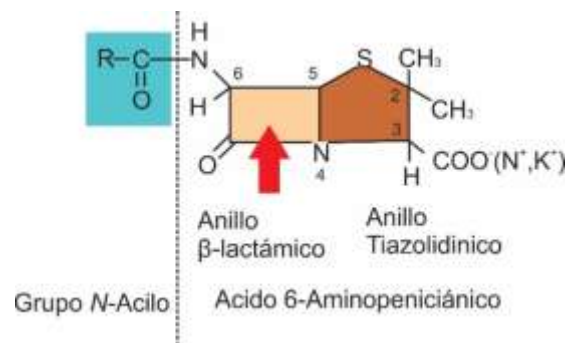


Figura 1. Estructura básica de antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son potentes inhibidores de la síntesis de la pared celular. Cuando los antibiótico β -lactámico se unen a las proteínas de unión de la penicilina (PBP), estas proteínas ya no pueden catalizar la reacción de transpeptidación, impidiendo el entrecruzamiento de las nuevas cadenas de péptidoglicanos y debilitamiento de la pared celular. Además, el complejo de antibiótico-PBP estimula la liberación de autolisinas que digieren la pared celular existente. Eventualmente, las diferencias de presión osmótica entre el interior y el exterior generarán la lisis celular (Madigan, Martinko, y Parker 2004).

1.3 Resistencia microbiana a antibióticos

Según la Organización mundial de la salud, la resistencia a los antibióticos se define como: la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable; de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten incrementando el riesgo de propagación.

La evolución microbiana hacia cepas resistentes a antibióticos es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se exponen a fármacos antimicrobianos. El uso indiscriminado de estos fármacos acelera este fenómeno natural (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005). Durante los últimos 60 años, los seres humanos se han convertido en la fuerza impulsora detrás de la acelerada evolución de la resistencia antibacteriana de las bacterias. En la década de 1940, la expectativa de vida de los pacientes infectados con *S. aureus* mejoró con el desarrollo de la Penicilina. Sin embargo, dos años después surgen las primeras cepas resistentes a Penicilina. Ocho años después, más del 50% de todos los aislamientos de estafilococos en todo el mundo eran resistentes a la penicilina (Fitzgerald 2014; Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; Goldstein *et al.*, 2007; McCallum, Berger-Bächli, y Senn 2010). Como respuesta al desafío que representa la resistencia a Penicilina en *S. aureus*, en 1959 se desarrolla una penicilina semisintética denominada Meticilina; pero en 1961 aparece la primera cepa MRSA en el Reino Unido. El fenómeno de propagación de esta cepa fue tan acelerado en la década de 1980 que el MRSA se convierte en un fenómeno mundial (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005).

1.4 Base genética de la resistencia en a antibióticos β - lactámicos en *S. aureus*

S. aureus tiene una extraordinaria capacidad de adaptarse a las diversas condiciones ambientales, desarrollando rápidamente resistencia a casi todos los antibióticos (Fitzgerald 2014; Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; Goldstein *et al.*, 2007; McCallum, Berger-Bächli, y Senn 2010). Es bien conocido, que la inducción de dicha resistencia se encuentra estrechamente relacionada con la inducción de la respuesta SOS; una respuesta de emergencia celular inducible por daño en el ADN (López *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2016.; Plata *et al.*, 2013). La Figura 3 muestra el mecanismo por el cual los antibióticos β -lactámicos pueden activar la respuesta SOS (Kohanski en el 2007). Se cree, que los antibióticos producen un deterioro del ciclo del ácido tricarboxílico (CAT), caracterizado por un marcado agotamiento del NADH y formación de radicales Hidroxilo (OH^{\cdot}). Estos radicales producen roturas del ADN que terminan en regiones de simple cadena, que en últimas inducen la respuesta SOS (Kohanski *et al.*, 2007; Rosato *et al.*, 2014).

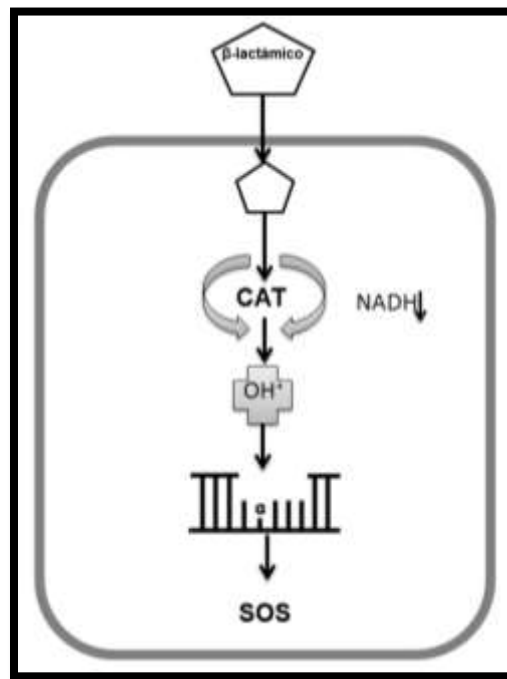


Figura 2. Modelo de activación de la Respuesta SOS por antibióticos β -lactámicos modificado del planteado por Kohanski *et al.*, (2007).

La resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus* es adquirida principalmente a través de dos estrategias: (i) adquisición de secuencias de ADN de otros organismos mediante

transferencia horizontal de genes (HGT) que codifican resistencia, (ii) pequeños cambios locales en las secuencias de nucleótidos del genoma de los genes que codifican proteínas de unión a antibióticos (López *et al.*, 2007).

En la primera estrategia, la resistencia a antibióticos β -lactámicos es la adquisición de elementos móviles a través HGT, cuya expresión y transferencia se encuentran reguladas por la respuesta SOS. Dichos elementos móviles codifican proteínas que confieren resistencia tales como: *i*) lactamasas (codificada en el gen *blaZ*), la cual escinde los anillos β -lactámicos y *ii*) proteína de unión a la penicilina PBP2a (codificada en el gen *mecA*). Esta última proteína, tiene un sitio activo con afinidad disminuida a los antibióticos β -lactámicos (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; Goldstein *et al.*, 2007); aunque conserva su capacidad de la biosíntesis de peptidoglucano mediante su dominio transglicosilasa (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; Klitgaard *et al.*, 2008; McCallum *et al.*, 2010) La expresión de las enzimas lactamasas y PBP2a es controlada por el sistema BlaR1/MecR1 (Figura 2A). En *S. aureus*, las proteínas BlaR1 y MecR1 son receptores transmembrana que constan de dos dominios. El primero, es un dominio N-terminal con cuatro segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4) interconectados por tres bucles (L1, L2, L3). L1 y L3 están expuestos al citoplasma y L2 al exterior de la célula. El dominio C-terminal, está ubicado en la superficie citoplasmática y cumple la función censora (McCallum *et al.*, 2010).

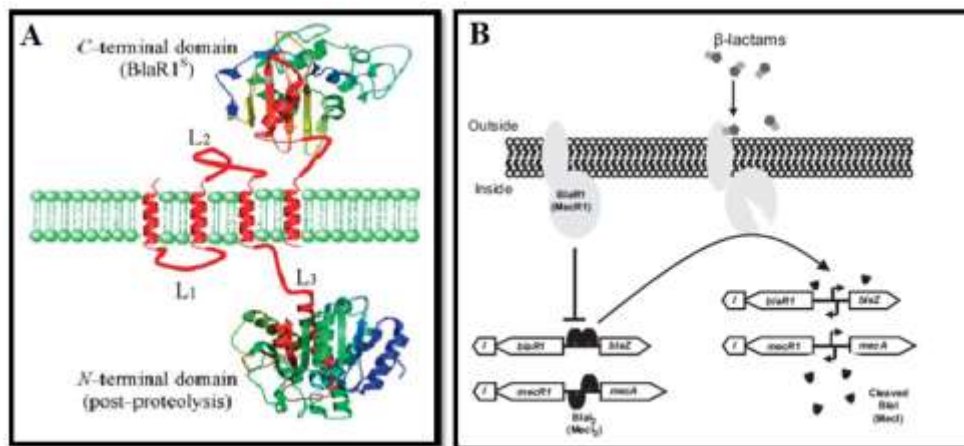


Figura 3. A. Representación esquemática de la proteína de membrana BLAR1 que está implicado en la regulación de la PBP 2 (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005). B. Modelo de activación de la traducción de las Proteínas β -lactamasas y PBP2 (McCallum et al., 2010).

El sistema BlaR1/MecR1, actúa de la siguiente manera: Los antibióticos β -lactámicos en el medio extracelular reaccionan con la serina del sitio activo del dominio C-terminal de BlaR1 y MecR1 realizando una reacción de acilación. Esto, inicia una cascada de señalización que consta de 4 eventos (Figura 2B): *i*) la formación de acil-enzima en la serina del dominio sensor, *ii*) la alteración de la conformación de la proteína en respuesta a la formación de la acil-enzima estable con la transmisión de una señal a través de la membrana, *iii*) la proteólisis represor y, *iv*) la expresión de los genes *blaZ* y *mecA* (Fuda, Fisher, y Mobashery 2005; McCallum *et al.*, 2010).

En la segunda estrategia, la adquisición de resistencias a antibióticos β -lactámicos es independiente de los genes *MecA* y *BlaZ*. En ella, la mutagénesis inducida por estrés celular juega un papel central. Rosato *et al.* (2014), demostraron que la exposición de MRSA a concentraciones sub-inhedoras de antibióticos β -lactámicos, puede incrementar la tasa de mutación celular, produciendo cepas altamente resistentes a este tipo de antibiótico; aunque también se estimula la formación de mutantes resistentes a una amplia gama de antibióticos. Otros autores (Couce y Blázquez 2009; Rosenberg 2001) plantean que las cepas MRSA adquieren su multi-resistencia mediante eventos de mutación adaptativas. Dichos eventos de mutaciones adaptativas son producidos, por polimerasas bajo la regulación SOS como son: Pol II (gen *polB/dinA*), Pol IV (gen *dinB*) y Pol V (operón *umuDC*). Estos trabajos evidencian la estrecha relación entre la respuesta SOS en bacterias y la generación de resistencia a antibióticos en MRSA.

1.5 Respuesta SOS en *S. aureus*

La respuesta SOS es una respuesta de emergencia celular característica de bacterias que son expuestas a estrés genotóxico que daña su genoma y bloquea su replicación. Durante esta respuesta, se inducen un grupo de aproximadamente 40 genes regulados bajo el circuito de las proteínas *RecA/LexA*; entre cuyas funciones se encuentran: la reparación del daño genético, la restauración de la replicación del genoma, el aumento de la variabilidad genética y el control de la división celular (Couce y Blázquez 2009; Cuirolo, Plata, y Rosato 2009; Plata *et al.*, 2013).

La proteína LexA es el regulador negativo (represor) de todos los genes SOS (Brent y Ptashne 1981). Esta proteína se une en forma de dímeros a la secuencia operadora localizada dentro de la región promotora de cada gen SOS; incluyendo los genes *recA* y *lexA* (Kim 1992; Little 1982; Wade *et al.* 2005). De esta forma, el represor LexA impide la unión de la RNA polimerasa; y por tanto, la transcripción de los genes SOS. El análisis de las secuencias operadora/promotora de los diferentes genes SOS reveló que éstos comparten una secuencia consenso de unos 20 pares de bases (5'-TACTG(TA)₅CAGTA-3'), conocida como "caja SOS" (Walker 1984). La afinidad del represor LexA por esta secuencia varía de un gen a otro. La proteína RecA es el regulador positivo del circuito, ésta muestra una alta afinidad por regiones de cadena simple en el ADN (ADNsc) (López *et al.*, 2007). Se cree que las regiones de ADNsc constituyen la señal inductora de la respuesta SOS (Cirz *et al.*, 2005). Las regiones de ADNsc son generadas como consecuencia de la replicación discontinua del ADN dañado o por actividad exonucleasa del complejo RecBCD (Rosenberg 2001). Cuando la proteína RecA se une a estas regiones de simple, forma un nucleofilamento helicoidal de RecA (complejo RecA-ADNsc) que promueve la auto-digestión intramolecular del represor LexA (Kim 1992; Little 1982); liberando así la caja SOS del represor y permitiendo se inicie la transcripción de los genes SOS. Una vez son removidos los daños en el ADN, los niveles de regiones ADNsc se reducen y por ende los del complejo RecA-ADNsc; permitiendo así que la proteína LexA de nuevo síntesis una a las secuencias operadora/promotora de los diferentes genes SOS (Little 1982).

1.6 Modulación de la resistencia a antibióticos bloqueando la inducción de a respuesta SOS.

Cirz *et al.* (2005), mostraron que bloqueando la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli*, se limita la capacidad bacteriana de desarrollar resistencia *in vitro* a los antibióticos ciprofloxacina o rifampicina. Los autores explican este hallazgo, argumentando que un bloqueo de la respuesta SOS impide la expresión de las polimerasas proclives a error como Pol II, Pol IV y Pol V, y por ende, de los eventos de mutación adaptativas que generan la resistencia. Por otra parte, se ha identificado que altos niveles de recombinación genética intracromosómica en *E. coli* son inducidos por ciprofloxacina se deben a la activación de la respuesta SOS. Este hallazgo, sugirió nuevas posibilidades terapéuticas para el control de bacterias con resistencia a antibióticos.

Estudios previos (López *et al.*, 2007; Plata *et al.*, 2013; Thi *et al.*, 2011), además mostraron que la inactivación de los genes que regulan la respuesta SOS (*recA* y *lexA*), reduce significativamente la inducción de la mutagénesis inducida por concentraciones subletales de antibióticos como la ampicilina, ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina, trimetoprima y sulfamethoxazola, aumentando la susceptibilidad de estas bacterias a antibióticos. Mo *et al.* (2016), proponen que inhibiendo la respuesta SOS se puede reducir significativamente la inducción de evento de resistencia bacteriana a antibióticos; esto, debido a que se bloquean todas las posibles vías de inducción de la resistencia: la mutación adaptativa, la transferencia horizontal de genes y la recombinación homóloga (Couce y Blázquez 2009; López *et al.*, 2007).

1.7 Desarrollo de alternativas terapéutica para el control de microorganismos resistente a antibióticos

El desarrollo de nuevos medicamentos para combatir microorganismos con multi-resistencia a antibióticos, es una tarea a largo plazo (C. Walsh 2003). Actualmente, la tendencia principal continua siendo desarrollar análogos estructurales a los antibióticos existentes, lo cual tiene la ventaja de conocer un mecanismo de acción ya comprobado. En muchos casos, se optimizan aspectos como la solubilidad y la afinidad introduciendo modificaciones menores en la estructura química del fármaco que no alteran su mecanismo de acción (C. Walsh 2000). Algunos de los nuevos análogos para antibióticos como tetraciclina, β -lactámicos y Vancomicina, pueden llegar a ser hasta 100 veces más potente que el compuesto original (Madigan, Martinko, y Parker 2004).

Los antimicrobianos naturales con nuevas estructuras son mucho más difíciles de identificar; dado que, se espera que estos actúen en nuevos blancos del metabolismo bacteriano; o que sean estructuralmente diferentes a los compuestos existentes. Esto evitaría, la aparición de mecanismos de resistencia ya conocidos. En tal sentido, las tecnologías informáticas y de métodos de biología estructural pueden ser un área trabajo promisoría para el desarrollo de nuevos antibióticos dirigidos a nuevos blancos bacterianos (Madigan, Martinko, y Parker 2004; Walsh 2000).

La terapia con bacteriófagos, constituye una alternativa novedosa para el control de microorganismos patógenos. Esta consiste, en usar virus bacterianos para controlar infecciones producidas por microorganismos resistentes a antibióticos. La terapia con bacteriófagos se inició hace más de 80 años, aunque de forma limitada, para tratar infecciones en animales; pero hoy se usa como procedimiento experimental en humanos para control de infecciones superficiales y quemaduras (Madigan, Martinko, y Parker 2004; Merril, Scholl, y Adhya 2003). La eficacia de la terapia con bacteriófagos en tratamiento de infecciones microbianas en humanos es poco conocida y su uso algo controversial. Un reto importante para la consolidación de este tipo de terapia, es el hecho de que las bacterias pueden adquirir resistencia a los bacteriófagos a través de mutaciones que alteran sus receptores de reconocimiento o que reducen la susceptibilidad de la pared celular a las enzimas de los bacteriófagos (Merril, Scholl, y Adhya 2003; Skurnik y Strauch 2006; Weber-Dabrowska, Mulczyk, y Górski 2000).

1.8 Actividad antibacteriana de extractos de plantas y su actividad moduladora de la toxicidad de antibióticos

En la actualidad, los productos naturales son una fuente innovadora de agentes terapéuticos para diferentes condiciones, incluyendo las enfermedades infecciosas persistentes causadas por microorganismos resistentes (Aguiar *et al.*, 2015; Bitu *et al.*, et al. 2014; Chaves *et al.*, 2014; Cos *et al.*, 2006; Gibbons 2004; Hendry *et al.*, 2009; Lavor *et al.*, 2014; Medeiros Barreto *et al.*, 2014; Nicolson, Evans, y O'Toole 1999; Shimizu, Shiota, y Mizushima 2001; Shiota *et al.*, 2000; Yam, Hamilton-Miller, y Shah 1998). La investigación actual sobre productos naturales, se centra principalmente en las plantas con uso etnomédico.

Las investigaciones dirigidas a identificar compuestos naturales derivados de plantas con actividad antibacteriana, tienen ya más de 4 décadas. Sin embargo, solo recientemente se ha evidenciado que muchos de estos compuestos pueden potenciar la actividad antibacteriana de los antibióticos. Por ejemplo, Bitu *et al.* (2014) encontraron que el aceite esencial de *Lippia gracilis* reduce la concentración mínima inhibitoria de diferentes antibióticos en *Escherichia coli* y *S. aureus*. Por su parte, Mendeiros *et al.* (2014) mostraron que los extractos de *Lippia origanoides* potencia la actividad de antibióticos en MRSA. La Tabla 1, resume algunos

ejemplos de compuestos derivados de las plantas con propiedades antibacterianas y efecto sinérgico con antibióticos.

Los constituyentes mayoritarios de la gran parte de las especies de plantas presentadas en la Tabla 1, son compuestos terpénicos. Los terpenos son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno, que poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *S. aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Bacillus cereus* (Barreto *et al.*, 2014; Bueno, Martinez, y Stashenko 2009; Cantrell, Franzblau, y Fischer 2001; Gao *et al.*, 2009; Gibbons 2004; Yam, Hamilton-Miller, y Shah 1998). Se cree que la actividad antibacteriana de estos compuestos está relacionada con su lipofilia. Los terpenos pueden intercalarse en la bicapa lipídica de la membrana celular bacteriana, incrementando su permeabilidad y produciendo disipación de la fuerza protón-motriz, fuga de iones inorgánicos, y finalmente, lisis y la muerte celular (Barreto *et al.*, 2014).

Tabla 1.

Aceites esenciales de plantas y compuestos con propiedad antibacteriana y potenciadora de la toxicidad de antibióticos en S. aureus.

Familia	Origen del compuesto	Actividad potenciadora de antibiótico	Fuente
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A.	Imipenem	(Cristo <i>et al.</i> , 2016)
Euphorbiaceae	<i>Croton campestris</i>	Amikasina Gentamicina Neomicina	(Lavor <i>et al.</i> , 2014)
Euphorbiaceae	<i>Croton rhamnifolioides</i>	Amikacina	(Vidal <i>et al.</i> , 2016)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	<i>Clorhexidina</i> digluconato	(Hendry <i>et al.</i> , 2009)
Verbenaceae	<i>Lippia gracilis</i>	Amikasina Gentamicina Neomicina	(Bitu <i>et al.</i> , 2014)
Verbenaceae	<i>Lippia Origanoides</i>	Amikasina Neomicina	(Barreto <i>et al.</i> , 2014)
Lygodiaceae	<i>Lygodium venustum</i>	Gentamicina	(Morais-Braga <i>et al.</i> , 2015)
Lamiaceae	<i>Melissa Officinalis</i> L.	Gentamicina	(Sousa <i>et al.</i> , 2016)
Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum Plectranthus amboinicus</i>	Amikasina y Gentamicina	(Aguiar <i>et al.</i> , 2015)
Apiaceae Lamiaceae	<i>Pituranthos chloranthus</i> , <i>Teucrium</i>	Amoxicilina	(Bedoui y Chekirghedira 2016)
Anacardiaceae	<i>ramosissimum Pistacia lentiscus</i>	Tetraciclina Piperacilina	

		Ofloxacina Oxacilina Novobiocina	
Lamiaceae Myrtaceae	Plectranthus amboinicus Lour Psidium guajava Psidium brownianum	Clorhexidina Gentamicina	(Santos <i>et al.</i> , 2016) (Morais-braga <i>et al.</i> 2016)
Compuestos			
	Corilagina	Oxacilina Cefmetazol	(Shimizu, Shiota, y Mizushima 2001)
	1,8-Cineol Linalool	Chlorhexidinea digluconato Ciprofloxacina	(Hendry <i>et al.</i> , 2009) (Silva <i>et al.</i> 2015)

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar aceites esenciales (AE) originarios de la diversidad botánica colombiana y sus constituyentes, que muestren potencial modulador de la toxicidad de antibióticos β -lactámicos y de la resistencia a estos antibióticos en *S. aureus*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar aceites esenciales y compuestos terpénicos con actividad antimicrobiana frente a cepas de MSSA Y MRSA
- ✓ Evaluar la toxicidad de diferentes antibióticos β -lactámicos en MRSA.
- ✓ Evaluar la modulación de la toxicidad de los antibióticos β -lactámicos por AE y compuestos terpénicos en MRSA.
- ✓ Evaluar si los AE y terpenos pueden inhibir el desarrollo de resistencia a antibióticos β -lactámicos en MSSA.
- ✓ Determinar la relación de la resistencia a antibióticos β -lactámicos y la inducción de la respuesta SOS en MSSA mediante qRT-PCR.

3. Materiales y Métodos

3.1 Compuestos Químicos

Los terpenos Acetato de geraniol (97%), Acetato de Nerilo (97%), Carvacrol (98%), β -cariofileno (98%), *p*-Cimeno (99%), Citral (95%), Dihidrocarvona (97%), Estragol (96%), Geraniol (98%), Limoneno (97%), Mirceno (95%), Nerol (97%), 3-Octanona (98%), Oxido de limoneno (97%), R(+)-Carvona (96%), S(-)-Carvona (96%), Timol (99.5%), α -Terpineol (90%) y los antibióticos (ampicilina, meticilina y penicilina g), fueron obtenidos de la casa comercial SIGMA ALDRICH (St. Louis, Mo, USA). Las soluciones stock de todos los terpenos fueron preparadas con metanol a una concentración de 50 mg/ml y los antibióticos con agua destilada estéril a las siguientes concentraciones: ampicilina (10mg/ml), Meticilina (10mg/ml) y penicimina G de sodio (1mg/ml).

3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo Mueller Hinton (infusión de carne 300g/L, peptona ácida de caseína 17.5g/L, almidón 1.5 g/L) fue adquirido de la casa comercial MERCK S.A. (Darmstadt, Alemania).

3.3 Aceites esenciales

Se estudiaron veintiocho AE extraídos de veintidós especies de plantas previamente identificados en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia). Las plantas utilizadas en este trabajo fueron colectadas en diferentes municipios y departamentos de Colombia (Tabla 2), en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012. La extracción de los AE se realizó mediante la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas como indican Stashenko *et al.* (1998). Con el fin de evitar daño por humedad en los aceites, estos fueron deshidratados utilizando sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), el cual fue posteriormente retirado de las muestras para su

almacenamiento en viales ámbar a 4 °C. Se preparó una solución stock de los AE en metanol a una concentración de 10 mg/ml.

Tabla 2.

Lista de las plantas estudiadas. Se incluye el código del Herbario Nacional Colombiano (CNH) y el sitio de colecta.

No.	Familia	Nombre científico (CNH)	Sitio de colecta
1	Asteraceae	<i>Ageratina aff. popayanensis</i> (COL 579422)	Zapatoca, Santander
2		<i>Wedelia calycina</i> (COL 578353)	Zapatoca, Santander
3		<i>Wedelia calycina</i> (COL 582605)	Dagua, Valle del C.
4		<i>Calea sessiliflora</i> (COL 582602)	Dagua, Valle del C.
5		<i>Wedelia calycina</i> (COL 583911)	Dagua, Valle del C.
6		<i>Baccharis trinervis</i> (COL 582811)	Dagua, Valle del C.
7		<i>Baccharis decussate</i> (COL 582606)	La Cumbre, Valle del C.
8		<i>Ageratina popayanensis</i> (COL 582600)	Zapatoca, Santander
9		<i>Calea glomerata</i> (COL 583912)	Yumbo, Valle del C.
10	Boraginaceae	<i>Cordia curassavica</i> (COL 559446)	Girón, Santander
11	Fabaceae	<i>Zornia brasiliensis</i> (COL 582604)	Tame, Arauca
12	Graminaceae	<i>Cymbopogon nardus</i> (COL 582309)	Dagua, Valle del C.
13	Labiatae	<i>Hyptis brachiata</i> (COL 582531)	Tame, Arauca
14		<i>Hyptis dilatata</i> (COL 582530)	Cravo Norte, Arauca
15	Myrtaceae	<i>Calycolpus moritzianus</i> (COL 578360)	Zapatoca, Santander
16		<i>Psidium sartorianum</i> (COL 578359)	Zapatoca, Santander
17		<i>Calycolpus moritzianus</i> (COL 578360)	Zapatoca, Santander
18	Piperaceae	<i>Piper subflavum</i> (COL 582361)	Dagua, Valle del C.
19		<i>Piper médium</i> (COL 582360)	Palmira, Valle del C.
20		<i>Piper holtonii</i> (COL 582357)	Palmira, Valle del C.
21		<i>Piper marginatum</i> (COL 578365)	Zapatoca, Santander
22	Turneraceae	<i>Turnera diffusa</i> (COL 578361-04E)	Girón, Santander
23		<i>Turnera diffusa</i> (COL 578361-06E)	Girón, Santander
24		<i>Turnera diffusa</i> (COL 578361-08E)	Girón, Santander
25	Verbenaceae	<i>Lippia alba</i> (COL 582597)	Dagua, Valle del C.
26		<i>Lantana cámara</i> (COL 582528)	Dagua, Valle del C.
27		<i>Lantana colombiana</i> (COL 582328)	La Cumbre, Valle del C.
28		<i>Chromolaena odorata</i> (COL 583919)	Yumbo, Valle del C.

3.4 Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas usadas en el trabajo son cepas certificadas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de sus siglas en inglés); las cuales fueron obtenidas de la casa comercial OXOID LTD (Basingstoke, Inglaterra). Estas estirpes son: *Staphylococcus aureus* ATCC®25923 sensible a meticilina (MSSA, de sus siglas en inglés) y *S. aureus* ATCC®33592 (MRSA). La resistencia a meticilina de la cepa *S. aureus* MRSA está directamente relacionada con la

presencia en su genoma del casete cromosómico estafilocócico (SCCmec, tipo III); el cual contiene el gen *mecA*.

3.5 Comprobación de genotipo de las cepas de *S. aureus*

Para la comprobación del genotipo de las cepas en estudio, se constató la presencia del gen *mecA* en la cepa MRSA o su ausencia en la cepa MSSA; usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés). A partir de cultivos crecidos durante toda la noche en medio Mueller Hinton (MHB) con agitación (170 rpm) y a una temperatura controlada (37 °C), se realizaron extracciones de ADN genómico de las cepas MRSA y MSSA usando el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, (1989) con las modificaciones propuestas por Liu (2009). La concentración y pureza de las muestras de ADN fueron analizadas espectrofotométricamente (relación A_{260}/A_{280}) y usando el método electroforético. La PCR se desarrolló usando los cebadores siguientes: Forward: GGAGGATATTGATGAAAAAG, Reverse: GCTTCACTGTTTTGTTATTC; los cuales fueron previamente descritos por Goldstein *et al.* (2007). En la mezcla de reacción (25 μ l) se usaron 2,42 μ L de 10X DreamTaq Buffer, 2,42 μ L de dNTPs (2mM), 1 μ L de primer forward (100 μ M), 1 μ L de primer reverse (100 μ M), 0,27 μ L de DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas, USA), 16,69 μ l de agua grado molecular y 2,5 μ L del ADN molde (5ng/ μ L).

La reacción se llevó a cabo en un Termociclador MasterCycler® Pro-Realplex4 (Eppendorf, Alemania) usando el siguiente programa: 94°C/3min seguido de 35 ciclos de 94°C/45s, 55°C/1min, 72°C/1min, y una fase final de extensión de 72°C/5min. Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% usando el colorante fluorescente EZVISION (Amresco, USA) y se documentaron usando un Sistema para Análisis de Geles (Syngene, USA). Los productos amplificados con el tamaño esperado (~2000 bp), fueron purificados y secuenciados usando el servicio SSiGmol del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia). Se realizó el ensamblaje de la secuencia consenso entre las secuencias 5' y 3' en el programa Genomics Workbench (Workbench 2010). La secuencia consenso fue alineada con la base de datos del NCBI con el programa SeaView version 4 (Gouy M. 2010).

3.6 Condiciones de cultivo y conservación de las cepas de *S. aureus*

Con el propósito de establecer las condiciones óptimas para el cultivo de las cepas de MSSA y MRSA, se desarrollaron curvas de crecimiento celular para cada una de las cepas. A partir de cultivos overnight en MHB a 37°C, se inocularon 500 µl del cultivo de cada cepa en 250 ml de medio MHB fresco y se incubaron a 37°C. Fueron tomadas alícuotas de 1 ml del cultivo cada 30 minutos para medir densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro tipo Multiskan GO (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, se graficaron los datos de DO versus Tiempo, identificando en cada gráfica el rango de tiempo donde la fase exponencial de crecimiento es lineal; esto, con el fin de calcular la pendiente μ o constante de velocidad máxima de crecimiento celular. Finalmente, se seleccionó el tiempo de incubación óptimo, en donde las cepas se encuentran en fase exponencial de crecimiento y μ es contante, para los posteriores ensayos de actividad antibacteriana.

La conservación de las estirpes bacterianas se realizó a partir de un cultivo overnight crecido en MHB con agitación (170 rpm) y a 37°C. Se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram y observación microscópica según el manual del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental. Seguidamente, se mezcló el cultivo con glicerol estéril, de tal forma que la concentración final de glicerol en el medio fuera del 30% (Maniatis *et al.*, 1989). Finalmente, se vertieron 300 µL de la mezcla en crioviales con 0.5 mg de Zeolita previamente esterilizada. Los aislados conservados fueron almacenados a una temperatura de -80°C .

3.7 Ensayos de actividad antibacteriana de AE, terpenos y antibióticos

Para evaluar el efecto antimicrobiano de AE, terpenos y antibióticos se determinó su concentración inhibitoria mínima (CMI) en las cepas MSSA Y MRSA, mediante el método de microdilución en placa y usando como medida de crecimiento bacteriano la turbidez expresada en unidades de DO. Se definió la CMI como la concentración más baja capaz de inhibir cualquier crecimiento bacteriano visible (Cos *et al.*,2006).

Los ensayos de actividad antibacteriana se desarrollaron en placas microplacas de 96 pozos Brand (Wertheim, Alemania). Para ello, cultivos crecidos overnight de las cepas MSSA y MRSA se inocularon (500 μ l) en 50 ml de MHB fresco y se incubaron a 37°C y 170 rpm durante 3 horas, hasta una DO a 600_{nm} de 0,23 y 0,25, respectivamente. En cada pocillo, se dispensó 100 μ l del cultivo y 100 μ l de diluciones de la muestra a evaluar. Estas diluciones de las muestras se prepararon en diferentes rangos de concentración a partir de la correspondiente solución stock como sigue: AE entre 3,12 - 0,02 mg/ml; antibióticos entre 5 - 0,0001 mg/ml y terpenos entre 10 - 0,0002 mg/ml. Cada placa fue sellada con adhesivo plástico estéril, para evitar la evaporación o contaminación durante el periodo de incubación a 37°C durante 18 horas. Finalmente, se realizó la lectura de DO a 600_{nm} usando un espectrofotómetro con lector de microplacas del tipo Multiskan GO (Thermo Scientific, USA). Para cada tratamiento, se desarrollaron 4 ensayos independientes con dos réplicas cada uno (Hendry *et al.*, 2009). En todos los ensayos se incluyó un blanco (medio MHB), un control negativo de crecimiento (tetraciclina 0,15 mg/ml) y un control positivo de crecimiento (agua).

3.8 Ensayos de modulación de la actividad de antibióticos

Los AE y terpenos con actividad antibacteriana fueron seleccionados para estudiar si estos modulan la toxicidad de los antibióticos β -lactámicos usados. Para ello, y usando la cepa MRSA, se determinó la CMI para los co-tratamientos AE-antibióticos (ampicilina, meticilina y penicilina G) o terpenos-antibióticos. Los antibióticos se ensayaron en un rango de concentraciones entre 0.002-1.3 mg/ml, dependiendo del antibiótico. Los AE y terpenos se ensayaron siempre a concentraciones no tóxicas y menores a su CMI en la cepa MRSA. Para cada ensayo, se diluyó el antibiótico mezclando en tubos Eppendorff 300 μ l de la dilución del antibiótico con 300 μ l de AE o terpeno a una única concentración. En cada pocillo, se mezclaron 100 μ l del cultivo de MRSA y 100 μ l que contenía la mezcla antibiótico-AE o antibiótico-terpeno. Las placas se sellaron con adhesivo, se incubaron a 37°C durante 18 horas y finalmente se realizó la lectura de DO a 600_{nm} usando el lector de microplacas Multiskan GO antes mencionado. Se consideró, que un aceite o terpeno tiene efecto modulador de la actividad antibiótica, si reduce significativamente la CMI del antibiótico evaluado. En todos los ensayos se incluyó un blanco (medio MHB), un control

negativo de crecimiento (tetraciclina 0,15 mg/ml), un control positivo de crecimiento (agua), y un control de la muestra (AE o terpeno).

3.9 Inducción de mutantes resistentes a ampicilina en MSSA y su modulación por AE y terpenos.

Con el fin de conocer si los AE y terpenos pueden inhibir el desarrollo de resistencia en MSSA, se desarrollaron ensayos de inducción de resistencia *in vitro* siguiendo la metodología descrita por Kohanski *et al.*(2010) con pequeñas modificaciones como sigue: Un cultivo overnight de *S. aureus* MSSA, se diluyó (1:10.000) en 50 mL de medio MHB fresco y se incubó durante a 37°C con agitación (170 rpm) por 3 horas para alcanzar su en fase exponencial de crecimiento. Seguidamente, el cultivo se sometió a 4 tipos de tratamientos: i) cultivo no tratado con ampicilina, ii) cultivo tratado con ampicilina, iii) cultivo tratado con una concentración no tóxica s de aceite y/o terpenos y, iv) cultivo tratados con ampicilina y con una concentración no tóxica s de AE o terpenos. Los cultivos en cada tratamiento se sembraron inoculando 1 ml de cultivo con 3 ml de medio MHB fresco e incubando a 37°C con agitación (170 rpm) durante 24 horas. Para cada tratamiento, el procedimiento se repitió diariamente por 7 días consecutivos por duplicado; pero a los tratamientos *ii* y *iv* se les duplicó diariamente la concentración de ampicilina hasta llegar a una concentración tóxica en el último día. Así, esta concentración constituyó la presión de selección para los mutantes resistentes inducidos en los mencionados tratamientos.

Los tratamientos mantuvieron siempre una única concentración no tóxica s de AE y terpenos. Pasados los 7 días, se desarrollaron diluciones seriadas de los tratamientos en solución salina estéril (0,7%) y se sembraron en cajas de Petri con MHB-agar y MHB agar suplementado con concentraciones selectivas (tóxicas para *S. aureus* MSSA) de ampicilina. Para determinar el número de mutantes resistentes inducidos, se realizaron conteo de colonias resistentes usando la aplicación CFU scope (Sánchez *et al.*,2016). Cada experimento se desarrolló por triplicado. Adicionalmente, cada colonia mutante inducida fue replicada en medio MHB líquido suplementado con ampicilina a concentraciones tóxica s, confirmada su pureza por microscopia y conservada a -80°C con el protocolo antes descrito.

3.10 Análisis de la relación entre la inducción de resistencia a ampicilina y la respuesta SOS en MSSA

Con el fin de conocer, si el efecto modulador estudiado en los ensayos del acápite 1.6 está relacionado con la inhibición de la respuesta SOS en *S. aureus* MSSA, se estudió para los cuatro tratamientos arriba indicados la expresión de los genes *lexA* y *recA*. Las proteínas LexA y RecA, son los reguladores negativo y positivo de la respuesta SOS en bacterias, respectivamente.

A tales fines, se realizó la extracción de ARN de 4 tratamientos. En este caso: i) cultivo no tratado con ampicilina, ii) cultivo tratado con ampicilina, iii) cultivo tratado con una concentración no tóxica s del terpeno carvacrol y, iv) cultivo tratados con ampicilina y con una concentración no tóxica s del terpeno carvacrol. La extracción del ARN se desarrolló usando el procedimiento de purificación de ARN GeneJETTM RNA Purification Kit (Fermentas, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cada extracción de ARN se realizó por triplicado e independiente.

La concentración de todas las muestras de ARN se determinó espectrofotométricamente según lo indicado por Maniatis *et al.*, (1989). La calidad de las muestras fue analizada espectrofotométricamente (relación A_{260}/A_{280}) y usando el método electroforético. Las muestras de ARN en los geles de agarosa al 1% fueron teñidas usando el colorante 2X RNA (Amresco, USA) y documentadas usando un sistema foto-documentador para análisis de geles (Syngene, USA).

Las secuencias cebadoras usadas para la amplificación de los genes *lexA*, *recA* y 16S rRNA (House Kipping) durante la reacción RT-PCR, son presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3.

Lista de cebadores usados en el análisis de expresión de los genes implicados en la resistencia a antibióticos β -lactámicos con sus secuencias.

No.	Nombre de los cebadores	Secuencia	Origen
Cebadores implicados en la respuesta SOS en <i>S. aureus</i>			
1	<i>LexA</i> -F	GCACGTAGCGTATCAACAGCT	(Cuirolo et al., 2009)
2	<i>LexA</i> -R	AGAGAATTTAGCATATGGTC	(Cuirolo et al., 2009)
3	<i>RecA</i> -F	GAAATCTTTTCGGTAAAGGTGCC	(Cuirolo et al., 2009)
4	<i>RecA</i> -R	CGCCTAATGCTTGAGCATATTC	(Cuirolo et al., 2009)
Cebadores del gen House Kipping			
5	16S 530F	GTCCCAGCMGCCGCGG	(Wani et al., 2006)
6	16S 1490R	GGTTACCTTGTTACGACTT	(Wani et al., 2006)

Primeramente, se comprobó la efectividad de los cebadores usando una PCR estándar según lo descrito en el acápite 2.3 y usando un gradiente de temperatura entre los 49.9 y 61.6 °C. Con base en el gradiente se escogió la temperatura de alineamiento que se usó en la RT-PCR. La RT-PCR se realizó usando un protocolo tipo “touchdown PCR” (Korbie y Mattick, 2008) y el Kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Quiagen, USA) en un Termociclador MasterCycler® Pro-Realplex4 (Eppendorf, Alemania). La mezcla de reacción (25 μ l) consistió en: 7,8 μ l de agua libre de RNAsa, 12,8 μ l de 2X mix, 1 μ l de cebador Fw, 1 μ l del cebador Rv, 0,25 μ l del RT mix y 2,5 μ l de cada muestra de RNA. El programa utilizado para la amplificación fue como sigue: una fase inicial de transcripción inversa de 50°C/30min, con una inactivación inicial de la PCR a 95°C/15min, seguido de 10 ciclos con disminución gradual de temperatura de alineamiento, que inicia con 94°C/60s, 94°C/15s, 66-55°C/45s (-1°C/ciclo), 72°C/30s con lectura de fluorescencia, seguido de 25 ciclos de 94°C/15s, 55°C/30s, 72°C/30s con lectura de fluorescencia, para terminar, una fase extensión de 72°C/5min y una curva melting. Para cada tratamiento, se amplificaron tres muestras de ARN independientes.

La determinación de la expresión relativa de los genes se desarrolló usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, según lo indicado por (Livak y Schmittgen 2001). Brevemente, este método consiste en calcular el cambio relativo en la expresión del gen diana con respecto a un gen “HouseKeeping” de expresión constitutiva, en nuestro caso el gen 16S rRNA, usando la siguiente ecuación: $2^{\Delta\Delta Ct} = 2^{((Ct_{Gen\ diana} - Ct_{HouseKeeping})_{Tratamiento} - (Ct_{Gen\ diana} - Ct_{HouseKeeping})_{control\ negativo})}$; donde, Ct es el ciclo de amplificación umbral (threshold cycle, de sus siglas en inglés) y $2^{\Delta\Delta Ct}$ es la relación de la expresión de los genes diana en los tratamiento con respecto al cultivo no tratado.

3.11 Análisis estadístico

Se calcularon los valores promedio y sus correspondientes errores estándar de los valores de CMI para los ensayos de actividad antibacteriana y moduladora de actividad antibiótica. Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para probar la normalidad de los datos y una prueba de F-máxima para probar la homogeneidad de varianza. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron aplicando una prueba de Tukey. Para todos los análisis estadísticos, se considerará una $p < 0,05$. Todos los análisis se realizarán con el programa R (R Core Team 2013).

4. Resultados

4.1 Cinética de crecimiento de las cepas de *S. aureus* MSSA y MRSA

En la Figura 4A se presentan las cinéticas de crecimiento microbiano para las cepas de *S. aureus* MSSA y MRSA en MHB; la cual se caracterizó por tres fases del crecimiento microbiano: latencia, exponencial y estacionaria. La fase exponencial mostró un ajuste lineal en el rango de incubación entre 1.5 y 3.5 horas tanto para la cepa MSSA ($R = 0.97$) como para la MRSA ($R = 0.98$). A partir de esta zona lineal, se pudo calcular los valores de pendiente μ o constante específica de velocidad de crecimiento para ambas cepas; la cual fue de 0.8 generaciones/horas. Como se puede constatar, este valor fue contante dentro el periodo de incubación indicado (Figura 4B). Considerando que ambas cepas muestras crecimiento exponencial dentro del rango del mencionado período de tiempo de incubación, se estableció un tiempo de incubación de 3 horas (180 min) para las cepas en el ensayo de micro-dilución.

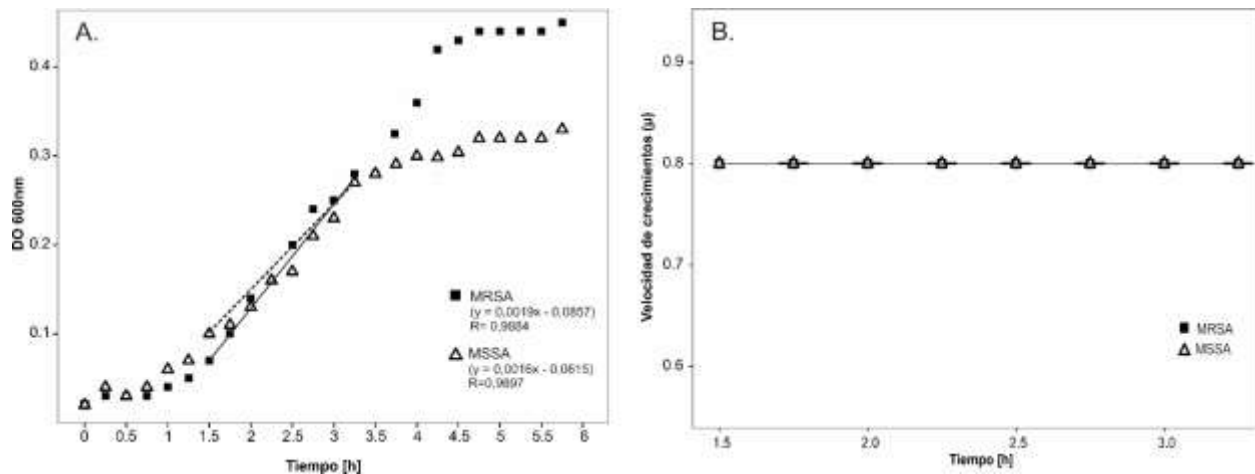


Figura 4. (A) Cinética de crecimiento de las cepas MSSA y MRSA. (B) Se presentan los valores de la pendiente μ o constante de velocidad máxima de crecimiento para la zona de ajuste lineal de la curva de crecimiento.

4.2 Caracterización del perfil de resistencia de las cepas *S. aureus* MRSA y MSSA

Previo a caracterizar el perfil de resistencia de las cepas frente a antibióticos β -lactámicos se comprobó su genotipo constatando la presencia del gen *mecA* en la cepa MRSA o su ausencia en la cepa MSSA, mediante una reacción PCR (Figura 5).

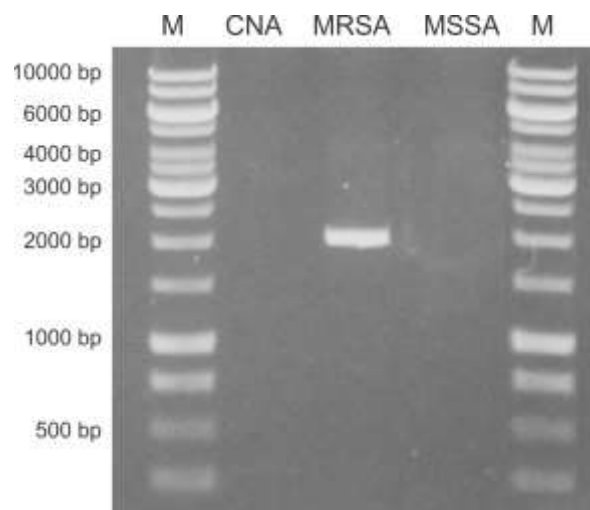


Figura 5. Electroforesis de agarosa al 0.8% en buffer TBE correspondiente a la amplificación usando los cebadores específicos para el gen *mecA* en cepas de *S. aureus*. De izquierda a derecha: M (Ladder 1 kp) CNA (control de no amplificación), cepa MRSA y cepa MSSA.

Como se puede constatar en la Figura 5, solo la muestra correspondiente a la cepa MRSA mostró un fragmento amplificado de aproximadamente 2000 pb. La secuenciación del mencionado fragmento usando el método de Sanger, mostró que dicho fragmento presenta un 98% de homología de secuencia con el gen *mecA* de cepas de *S. aureus* disponibles en la base de datos NCBI (ver suplemento No. 1).

En el presente estudio se usaron las cepas MSSA (ATCC[®]25923) y MRSA (ATCC[®]33592). La información del baucher de la cepa MSSA indica susceptibilidad al antibiótico ampicilina; pero no muestra información para los antibióticos penicilina G y meticilina. Por el contrario, el baucher de la cepa MRSA indica resistencia a los antibióticos gentamicina y meticilina, pero no a la ampicilina y penicilina G. Por ello, en el estudio se comprobó la sensibilidad de ambas cepas a estos tres antibióticos del tipo β -lactámico (penicilina G, meticilina y ampicilina).

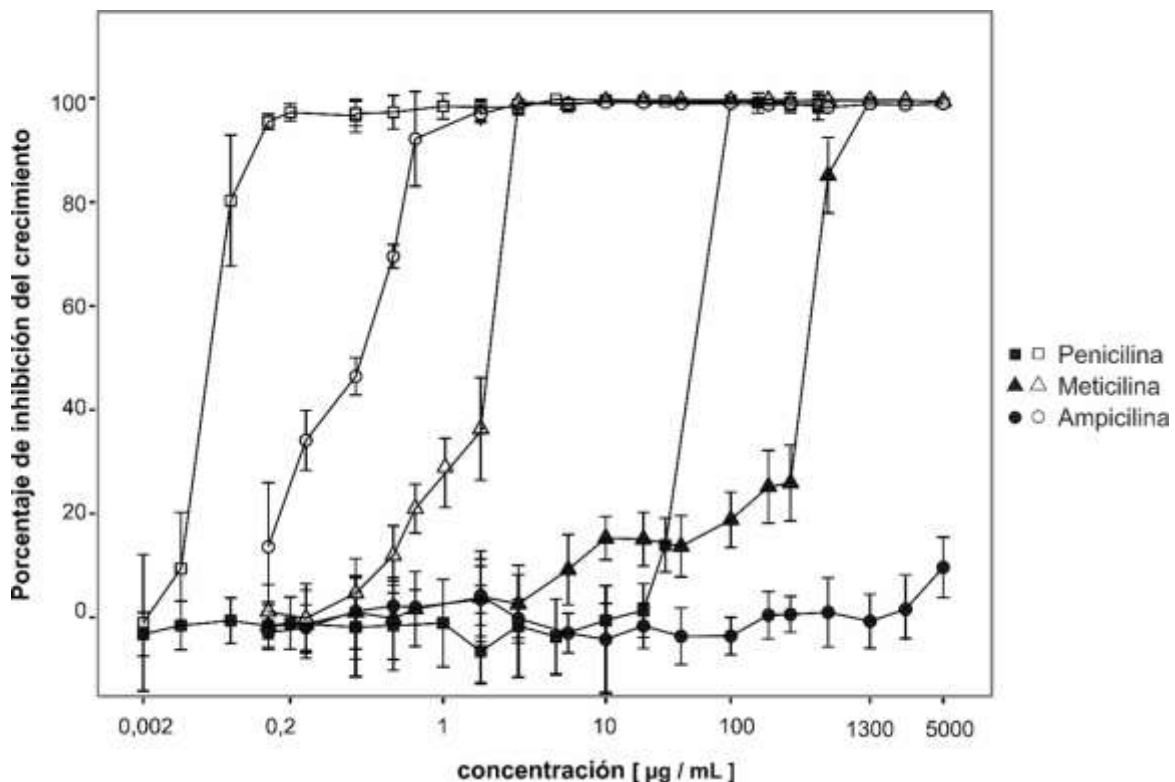


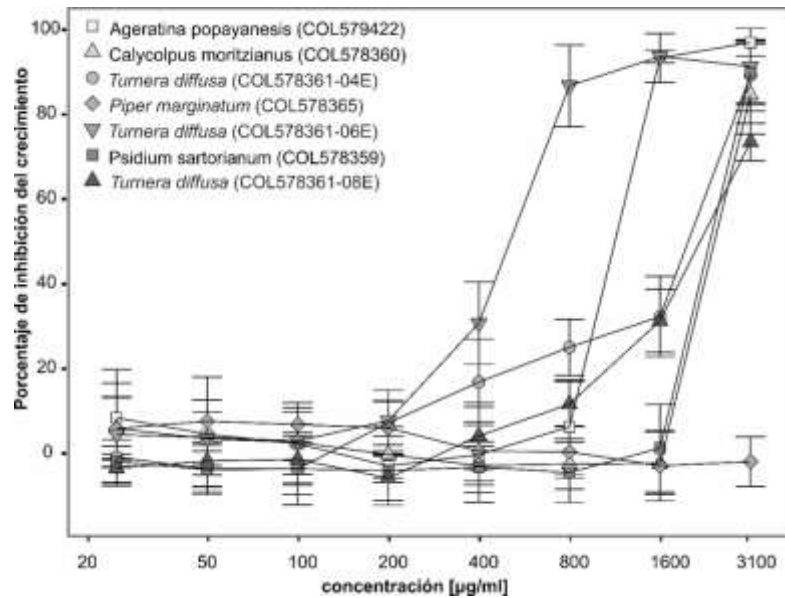
Figura 6. Actividad de los antibióticos penicilina G, meticilina y ampicilina, expresado como porcentaje de inhibición del crecimiento, en las cepas *S. aureus* MSSA (símbolos vacíos) y MRSA (símbolos rellenos). Las flechas indican la mínima concentración de los antibióticos que inhiben el 100% del crecimiento celular (CMI) en cada cepa.

En la Figura 6 se muestra el perfil de susceptibilidad/resistencia de las cepas MSSA y MRSA para los tres antibióticos. La cepa MSSA inhibió totalmente su crecimiento (100%) en presencia de los antibióticos β -lactámicos como sigue: penicilina G (CMI = 0.03 $\mu\text{g/mL}$) ampicilina (CMI = 0.61 $\mu\text{g/mL}$) y meticilina (CMI = 2.4 $\mu\text{g/mL}$). Por su parte, la cepa MRSA inhibió totalmente su crecimiento en presencia de los antibióticos β -lactámicos como sigue: penicilina G (CMI = 125 $\mu\text{g/mL}$) y meticilina (CMI = 1250 $\mu\text{g/mL}$). El antibiótico ampicilina no mostró inhibición del crecimiento celular para el rango de concentración evaluado (0.02 a 5000 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados muestran que la cepa MRSA es 4166 veces más resistente a penicilina y 521 veces más resistente a la meticilina, que la cepa MSSA. Esto nos indica, que la cepa MRSA presenta un perfil de resistente a antibióticos β -lactámicos (MRSA); mientras que la cepa MSSA presenta un perfil sensible a antibióticos β -lactámicos (MSSA).

4.3 Actividad antibacteriana de AE y terpenos

La evaluación de la actividad antibacteriana de 28 AE en las cepas MSSA y MRSA, son presentados en la Figura 7. De los AE evaluados, 7 presentaron actividad antibacteriana, los restantes 21 AE no presentaron actividad antibacteriana a las concentraciones evaluadas. La CMI de 7 AE promisorios por su bio-actividad fue como se indica a continuación. En la cepa MSSA: *Turnera diffusa* COL578361-04E (CMI = 780 $\mu\text{g/mL}$) > *Ageratina popayanesis* COL579422 (CMI = 1560 $\mu\text{g/mL}$) > *Psidium sartorianum* COL578359 (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$) = *Calycolpus moritzianus* COL578360 (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$) = *Turnera diffusa* COL578361-06E (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$) = *Turnera diffusa* COL578361-08E (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$). En la cepa MRSA: *Psidium sartorianum* COL578359 (CMI = 390 $\mu\text{g/mL}$) > *Turnera diffusa* COL578361-04E (CMI = 780 $\mu\text{g/mL}$) = *Ageratina popayanesis* COL579422 (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$) = *Piper marginatum* COL578365 (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$) = *Turnera diffusa* COL578361-06E (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$) = *Turnera diffusa* COL578361-08E (CMI = 3120 $\mu\text{g/mL}$). Con la excepción de los AE de *C. moritzianus* COL578360 y *P. marginatum* COL578365, estos AE mostraron actividad en ambas cepas. Esto sugiere que el efecto inhibitorio del crecimiento producido por estos AE es independiente del fenómeno de resistencia a antibióticos *S. aureus*. Ninguno de los restantes AE estudiados mostró efecto inhibitorio del crecimiento de estas cepas de *S. aureus* (ver Suplemento No. 2).

A.



B.

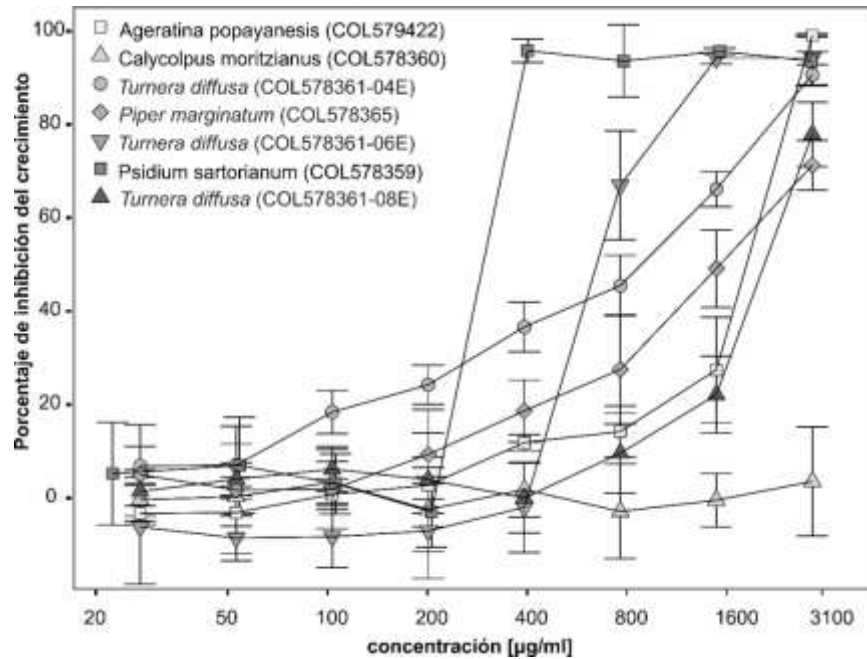


Figura 7. Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los AE estudiados. Se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento para las cepas de *S. aureus* MSSA (A) y MRSA (B).

Se ha indicado que la actividad antibacteriana de extractos de plantas es relevante o alta para $CMI \leq 100 \mu\text{g/mL}$, actividad moderada para CMI entre 100 y $500 \mu\text{g/mL}$, actividad baja para CMI entre 500 y $1000 \mu\text{g/mL}$ y no activos para $CMI > 1000 \mu\text{g/mL}$ (Cos *et al.*, 2006; Medeiros-

Barreto *et al.*, 2014). Según este criterio, solo los AE de las plantas *Psidium sartorianum* COL578359 (CMI = 390 $\mu\text{g/mL}$) y *Turnera diffusa* COL578361-04E (CMI = 780 $\mu\text{g/mL}$) mostraron actividad antibacteriana moderada y baja, respectivamente. Los restantes aceites, no resultaron activos.

En la Figura 8, se puede constatar que de los 18 compuestos terpenos evaluados en el presente estudio (ver suplemento No. 3), solo dos, carvacrol y timol, inhibieron el crecimiento microbiano en las cepas MSSA y MRSA.

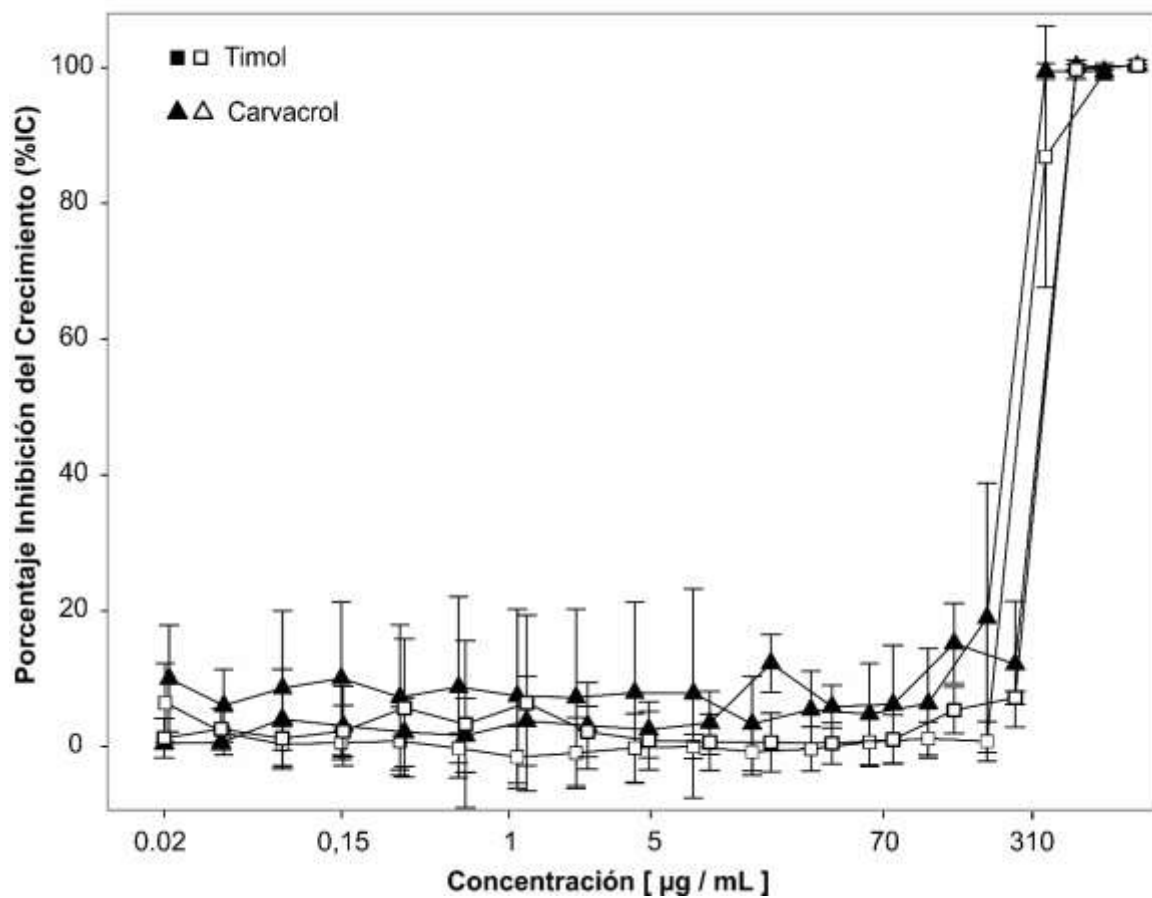


Figura 8. Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los compuestos terpenos carvacrol y timol. Se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento para las cepas de *S. aureus* MSSA (símbolos vacíos) y MRSA (símbolos rellenos).

Estos compuestos mostraron una CMI = 630 $\mu\text{g/mL}$ (4000 μM), en ambas cepas. Aunque esta concentración no es indicativo de una actividad antibacteriana relevante ($\leq 25 \mu\text{M}$) (ver Cos *et al.* 2006), se decidió usarlos en los estudios de potenciación de la toxicidad de antibióticos β -lactámicos (ver siguiente acápite).

4.4 Potenciación de la actividad antibiótica con AE y terpenos en MRSA

Los aceites esenciales de las especies *P. sartorianum* COL578359 y *T. diffusa* COL578361 y los 2 terpenos (carvacrol y timol) que mostraron actividad antibacteriana en la cepa MRSA, se seleccionaron para evaluar su efecto potenciador de la actividad de los antibióticos β -lactámicos (ampicilina, meticilina y penicilina). Para ello, se realizaron co-tratamientos usando la CMI de los antibióticos y concentraciones no inhibitorias o sub-tóxicas de los AE y terpenos (Tabla 4).

Tabla 4.

Co-ensayos de antibióticos β -lactámicos (ampicilina, meticilina y penicilina) con AE y terpenos usando la cepa MRSA. Se presentan la CMI de los antibióticos en los co-ensayos. Entre corchetes, se indica el número de veces que se reduce la CMI del antibiótico en los co-ensayos.

AE o terpenos	Concentración del AE o terpenos en los co-ensayos	CMI de la penicilina en los co-ensayos	CMI de la ampicilina en los co-ensayos	CMI de la meticilina en los co-ensayos
<i>P. sartorianum</i> COL578359	200 $\mu\text{g/mL}$	31 $\mu\text{g/mL}$ [4.0]	38 $\mu\text{g/mL}$ [131.6]	312 $\mu\text{g/mL}$ [4.0]
<i>T. diffusa</i> COL578361-04E	400 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$ [8.3]	77 $\mu\text{g/mL}$ [64.9]	77 $\mu\text{g/mL}$ [16.2]
<i>T. diffusa</i> COL578361-06E	50 $\mu\text{g/mL}$	31 $\mu\text{g/mL}$ [4.0]	77 $\mu\text{g/mL}$ [64.9]	156 $\mu\text{g/mL}$ [8.0]
<i>T. diffusa</i> COL578361-	190 $\mu\text{g/mL}$	31 $\mu\text{g/mL}$ [4.0]	19 $\mu\text{g/mL}$ (263.2)	77 $\mu\text{g/mL}$ [16.2]

08E				
Timol	310 µg/mL	31 µg/mL [4.0]	39 µg/mL [128.2]	390 µg/mL [3.2]
Carvacrol	310 µg/mL	62 µg/mL [2.0]	19 µg/mL [263,2]	390 µg/mL [3.2]

Las CMI para los tratamientos con solo antibióticos fue: Penicilina G (125 µg/mL) y meticilina (1250 µg/mL). Como el antibiótico ampicilina no mostró inhibición del crecimiento celular en la cepa MRSA y se consideró como CMI la concentración más alta estudiada (5000 µg/mL).

De acuerdo con los resultados de la Tabla 4, concentraciones no tóxicas de los AE y terpenos aquí estudiados reducen significativamente los valores de CMI de los antibióticos; indicando que estos AE y terpenos potencian su actividad. Así, el AE de *T. diffusa* COL578361-04E mostró los mejores resultados, potenciando en 8.3 veces la actividad de la penicilina G. Adicionalmente, los AE de *P. sartorianum* COL578359 y *T. diffusa* COL578361-08E incrementaron 131.6 y 263.2 veces la actividad de la ampicilina, respectivamente. Por último, los AE de *T. diffusa* COL578361-04E y *T. diffusa* COL578361-08E mostraron los mejores resultados, potenciando en 16.2 veces la actividad de la meticilina. Estos resultados presentan al AE de *T. diffusa* COL578361-04E como el más promisorio para potenciar la actividad de antibióticos β-lactámicos. Por otra parte, el terpeno timol incremento en 4 veces la actividad de la penicilina, el carvacrol incremento 263.2 veces la actividad de la ampicilina y ambos incrementaron en 3.2 veces la actividad de la meticilina. Las cinéticas completas de inhibición para cada uno de los co-ensayos presentados en la Tabla 4, pueden encontrarse en el Suplemento No. 4.

4.5 Inducción de resistencia a antibióticos en *S. aureus* MSSA

Con el fin de conocer si los AE y terpenos pueden afectar la inducción de resistencia a antibióticos en *S. aureus*, se desarrollaron ensayos de inducción de resistencia *in vitro* para diferentes tratamientos celulares (Tabla 5). Estos fueron: *i*) cultivo no tratado con ampicilina, *ii*) cultivo tratado con ampicilina, *iii*) cultivo tratado con una concentración no tóxica s de aceite y/o terpenos y, *iv*) cultivo tratados con ampicilina y con una concentración no tóxicas de AE o terpenos. Para los ensayos se seleccionaron aquellos AE (*T. diffusa* COL578361-04E y *P. sartorianum* COL578359) y terpenos (carvacrol y timol) que mostraron resultados promisorios en el acápite 3.4.

Como se esperaba, la exposición de MSSA a concentraciones creciente de ampicilina (T1), produjo mutantes resistentes al antibiótico con un valor promedio de $1.7 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$ células mutantes/mL con un porcentaje del 0.36 ± 0.12 . Por el contrario, cuando estas células fueron tratadas simultáneamente con antibiótico y concentraciones no tóxicas de los AE y terpenos (T3 – T6); no hubo crecimiento bajo las condiciones de presión de selección ($1.22 \mu\text{g/mL}$ de ampicilina) y la frecuencia de mutantes inducidos fue cero en todos los casos. Esto indica que los extractos (*T. diffusa* COL578361-04E y *P. sartorianum* COL578359) y terpenos (carvacrol y timol), pueden inhibir la inducción de mutantes resistentes a ampicilina en MSSA. Dicha inhibición de mutantes resistentes al antibiótico no estuvo relacionada con eventos de muerte celular; dado que un número importante de la población celular sobrevive cuando estos tratamientos se cultivan sin presión de selección al antibiótico ($2.3 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^4$ células/mL). En los tratamientos celulares a concentraciones no tóxicas de AE y terpenos (T3 – T10) se observó un crecimiento celular abundante en el orden de entre 10^7 y 10^8 células/mL; evidenciando que estos AE y terpenos tienen un efecto mayormente bacteriostático y no bactericida.

Tabla 5.

Ensayos in vitro de inducción de resistencia al antibiótico ampicilina en S. aureus MSSA. Para los diferentes tratamientos, se presentan los valores de número de células/mL, la frecuencia de mutantes y sus correspondientes errores estándar; obtenidos para las dos condiciones de selección usadas (con y sin ampicilina).

No. TRATAMIENTOS	Número de células/mL		Frecuencia de mutantes [†] (%)
	Sin presión de selección en MHB	Con presión de selección en MHB + ampicilina ($1.22 \mu\text{g/mL}$)	
T1 Control negativo (Sin ampicilina)	$2.3 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^4$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T2 Control de ampicilina ($0.02 - 1.22 \mu\text{g/mL}$) [‡]	$5.4 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^6$	$1.7 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$	0.36 ± 0.12
T3 <i>T. diffusa</i> COL578361 ($190 \mu\text{g/mL}$) + ampicilina [‡]	$1.3 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^4$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T4 <i>P. sartorianum</i> COL578359 ($190 \mu\text{g/mL}$) + ampicilina [‡]	$2.2 \times 10^5 \pm 6.4 \times 10^4$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T5 Carvacrol ($80 \mu\text{g/mL}$) + ampicilina [‡]	$1.1 \times 10^6 \pm 6.9 \times 10^5$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T6 Timol ($80 \mu\text{g/mL}$) + ampicilina [‡]	$7.8 \times 10^4 \pm 5.6 \times 10^4$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T7 <i>T. diffusa</i> COL578361 ($190 \mu\text{g/mL}$)	$1.7 \times 10^8 \pm 3.8 \times 10^8$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

T8	<i>P. sartorianum</i> COL578359 (190 µg/mL)	$4.9 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^7$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T9	Carvacrol (80 µg/mL)	$2.7 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T1 0	Timol (80 µg/mL)	$5.3 \times 10^8 \pm 6.5 \times 10^7$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

‡, Los tratamientos con ampicilina se cultivaron durante toda la noche durante 7 días consecutivos, iniciando con una concentración de 0.02 µg/mL y terminando a 1.22 µg/mL; concentración usada como condición de selección de mutantes resistentes a ampicilina inducidos en los tratamientos.

†, La frecuencia de mutantes se calcula dividiendo el número de células/mL observadas en los tratamientos con presión de selección a ampicilina respecto a los tratamientos sin presión de selección a ampicilina; y esta se expresó como un porcentaje.

4.6 Análisis de la relación entre la inducción de resistencia a ampicilina y la respuesta SOS en MSSA

Con el fin de conocer si el efecto inhibitorio de la resistencia a antibióticos evidenciado en el acápite anterior está relacionado con la inhibición de la respuesta SOS en *S. aureus* MSSA, inicialmente se probó la eficacia de los cebadores de los genes *RecA*, *LexA* y 16S rDNA durante la corrida de RT-PCR en los tratamientos T1 y T2 (Figura 9).

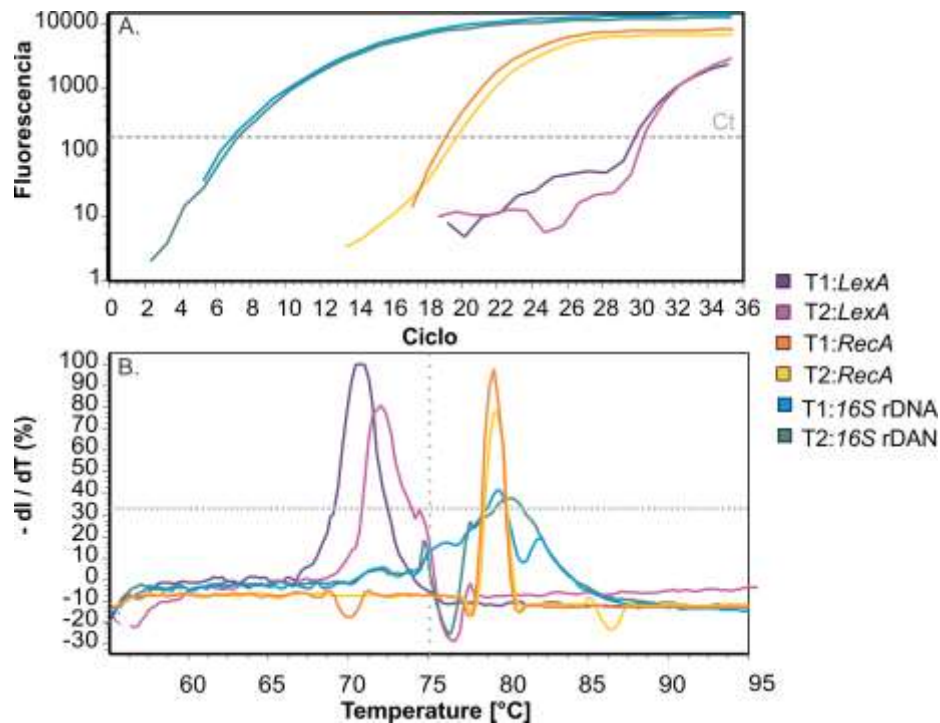


Figura 9. Amplificación de los genes *lexA*, *recA* y *16S rRNA* mediante la RT-PCR en los tratamientos T1 (cultivo sin tratar con ampicilina) y T2 (cultivo tratado con ampicilina). A) Curvas de amplificación de cada gen. B) Curvas “melting” de cada gen.

Los genes *16S rRNA*, *recA* y *lexA* sobrepasan el umbral de amplificación a partir de ciclo 7, 19 y 30, respectivamente. Adicionalmente, los *16S rRNA* y *recA* mostraron curvas “melting” con picos únicos a altas temperaturas, indicando la alta especificidad de los cebadores para estos genes. Por el contrario, el gen *lexA* mostró un pico a una temperatura baja, inferior a los 70 °C y un Ct tardío (dentro de los últimos 6 ciclos de amplificación), sugiriendo la formación de posibles productos inespecíficos o dímeros del cebador durante la amplificación (Real-time PCR handbook n.d.). Basados en estos resultados, se escogieron los genes *recA* y *16S rRNA* o “house keeping” para continuar con los análisis. Así, se estudió la expresión del gen *recA* en cuatro de los tratamientos indicados en la Tabla 4. Estos son: T1) cultivo no tratado con ampicilina, T2) cultivo tratado con ampicilina, T5) cultivo tratado con ampicilina y con una concentración no tóxica del terpeno carvacrol, y T9) cultivo tratado con una concentración no tóxica del terpeno carvacrol (Figura 10).

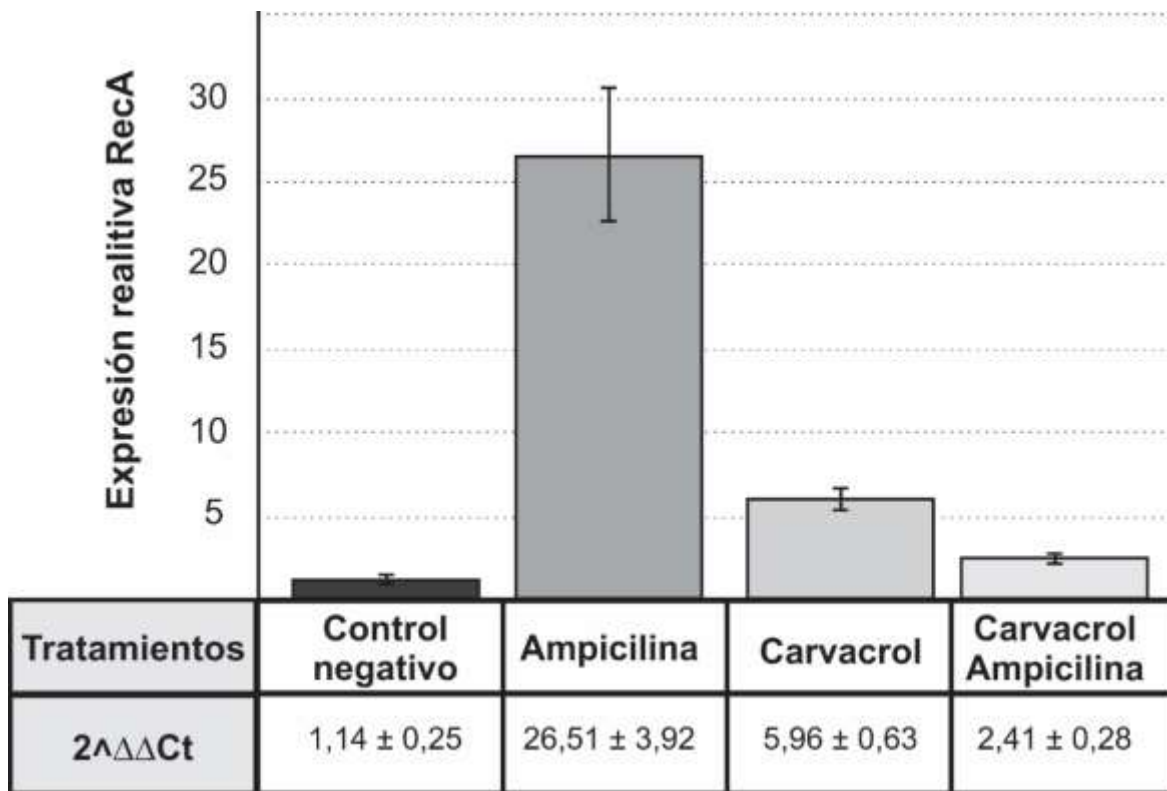


Figura 10. Expresión relativa del gen *RecA* en los tratamientos T1 (cultivo sin tratar con ampicilina), T2 (cultivo tratado con ampicilina), T5 (cultivo tratado con ampicilina y con una concentración no tóxica del terpeno carvacrol) y T9 (cultivo tratado con una concentración no tóxica del terpeno carvacrol).

Con relación al control negativo (tratamiento T1), las células tratadas con ampicilina (tratamiento T2) mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.95$, en una prueba de Tukey) del valor de expresión relativa del gen *recA*; indicando que la exposición a concentraciones sub-tóxicas de este antibiótico induce la respuesta SOS en MSSA. Por el contrario, cuando las células fueron expuestas a co-tratamientos con carvacrol y ampicilina (tratamiento T5) o solo al terpeno carvacrol (tratamiento T9), se inhibió significativamente la expresión del gen *recA* respecto al tratamiento T2 ($p \leq 0.95$, en una prueba de Tukey) y no presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento T1 ($p = 0.34$ y 0.96 , respectivamente en una prueba de Tukey). Esto indica, que en los tratamientos T5 y T9 se inhibe la respuesta SOS en MSSA. Estos resultados sugieren que la inhibición de inducción de mutantes resistentes en los tratamientos T5 y T9, están relacionada con la inhibición de la respuesta SOS en MSSA. That shows, the SOS response

is inhibited in the T6 and T10 treatments. These results suggest that the inhibition of induction of resistant mutants in the T6 and T10 treatments are related to the inhibition of the SOS response in MSSA.

5. Discusión

En este estudio, se evaluó el potencial antimicrobiano de AE obtenidos de 23 especies de plantas que habitan en Colombia. Los AE de las plantas *P. sartorianum* y *T. diffusa* mostraron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* moderada y baja, respectivamente. Los restantes aceites, no resultaron activos. Dos constituyentes terpenos, Timol y Carvacrol, resultaron con actividad antibacteriana frente a *S. aureus* a concentraciones no relevantes. Adicionalmente, estos AE y terpenos mostraron un potente efecto modulador de la actividad de antibióticos β -lactámicos en MRSA.

Estudios previos han mostrado el potencial antibacteriano de los terpenos Timol y Carvacrol, frente a una amplia gama de microorganismos, incluido *S. aureus* (Burt 2004; Oliveira *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2012). Su citotoxicidad ha sido asociada con su capacidad lipofílica (Liolios *et al.*, 2009), permeabilizando las membranas y permitiendo su entrada a la célula. Sin embargo, poco se conoce sobre la actividad antibacteriana de los AE de *T. diffusa* y *P. sartorianum*. Por ejemplo, los AE de *T. diffusa* mostraron actividad antibacteriana frente a diferentes especies de *Mycobacterium* (Bueno, Martinez y Stashenko 2009) y sus extractos frente a una amplia gama de especies bacterianas, incluyendo *S. aureus* (Szewczyk y Zidorn 2014). Adicionalmente, el extracto etanólico de *Turnera ulmifolia* potencia la actividad de antibióticos aminoglicósidos como gentamicina y kanamicina en MRSA (Coutinho *et al.*, 2009). Por otra parte, los extractos de especies del género *Psidium* como *P. guajava* y *P. brownianum*, potencia la actividad del fluconazol en especies del género *Candida* (Morais-braga *et al.*, 2016a) y el extracto de *P. guajava* tiene actividad antibacteriana frente a una amplia gama de microorganismos patógenos (Morais-braga *et al.*, 2016b). Todos estos hallazgos, claramente indican que las especies de los

géneros *Psidium* y *Turnera* son fuentes importantes de compuestos con actividad antibacteriana que además potencian la actividad de antibióticos en MRSA.

Los tratamientos con los aceites esenciales de *P. sartorianum* COL578359 y *T. diffusa* COL578361; así como, con los terpenos timol y carvacrol, redujeron significativamente la tasa de mutación generada por dosis sub-tóxicas de ampicilina. El carvacrol, además inhibió significativamente la expresión del gen *recA*, el regulador positivo de la respuesta SOS en *S. aureus*. Estos hallazgos, sugieren que tanto los aceites esenciales como sus constituyentes terpenos podrían ser usados para el desarrollo de formulaciones con antibióticos-terpenos que eviten la inducción de resistencia bacteriana a antibióticos.

Previos trabajos han demostrado que la inactivación de la expresión de genes SOS como *lexA* y *recA*, reduce significativamente la inducción de mutantes resistentes a diferentes tipos de antibióticos; revelando así nuevas estrategias terapéuticas que potencian el uso de los antibióticos (Miller *et al.*, 2004; Thi *et al.*, 2011; Plata *et al.*, 2013; Mo *et al.*, 2016). Otros autores han mostrado que el bloqueo de la expresión de otros genes SOS que codifican polimerasas proclives a error y proteínas para la recombinación, también reduce la inducción de mutantes resistentes a antibióticos (López *et al.*, 2007; Cirz *et al.*, 2006). Todos estos estudios, claramente demostraron que el tratamiento bacteriano con concentraciones sub-letales de antibióticos que inducen daño en el ADN, incluido los β -lactámicos, producen resistencia bacteriana; y que esta resistencia se inhibe totalmente cuando son bloqueada la expresión de genes que regulan la respuesta SOS (*recA/lexA*), participan en la mutagénesis SOS (*umuDC*, *polB/dinA*, *dinB*), o en la recombinación homóloga vía RecBCD (*recB*) y RecFOR (*recF*).

Los resultados del presente trabajo ratifican que el gen *recA* constituye un blanco genético esencial en la búsqueda de nuevos antimicrobianos que bloqueen la inducción de resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos. Adicionalmente, y de acuerdo con nuestro conocimiento, este constituye el primer trabajo que evidencia que la inducción de mutantes resistentes a antibióticos puede ser bloqueada químicamente, usando aceites o compuestos que inhiban la expresión de la respuesta SOS. En tal sentido, el trabajo abre nuevas alternativas en la terapéutica con antibióticos. Así, los aceites esenciales de *P. sartorianum* COL578359, *T. diffusa*

COL578361, y aquellos con alto contenido en carvacrol y timol, (Stashenko *et al.*, 2013); se convierten en fuentes de compuestos naturales que pueden ser usados en la formulación de tales terapéuticos.

6. Conclusiones

- 1- Los aceites esenciales de las plantas *P. sartorianum* y *T. diffusa* mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Cuando estas se aplicaron en co-tratamientos con antibióticos β -lactámicos, potenciaron la toxicidad de estos antibióticos en MRSA. Estos datos sugieren que estos aceites esenciales son fuentes de compuestos naturales promisorios en la investigación y desarrollo de fármacos capaces de inhibir la resistencia a antibióticos.
- 2- Los terpenos, timol y carvacrol mostraron actividad antibacteriana a concentraciones no relevantes ($> 25 \mu\text{M}$) contra las cepas de *S. aureus* MRSA y MSSA. Estos compuestos mostraron su potencial para incrementar la actividad de antibióticos β -lactámicos; evidenciando la relevancia de estos compuestos en la terapéutica con antibióticos.
- 3- Los aceites esenciales de las plantas *P. sartorianum* COL578359 y *T. diffusa* COL578361 y los terpenos timol y carvacrol, reducen significativamente la tasa de mutación generada por dosis sub-tóxicas de ampicilina; demostrando que estos aceites esenciales y terpenos podrían ser usados en la terapéutica con antibióticos para evitar la aparición de resistencia.
- 4- El terpeno, carvacrol inhibió significativamente la expresión del gen *recA* en MSSA expuesto a dosis sub-tóxicas de ampicilina. Esto indica, que el carvacrol puede inhibir la expresión de la respuesta SOS, y por ende, bloquear la inducción de resistencia bacteriana a antibióticos y soporta su uso como adyuvante en durante la terapia con antibióticos.

7. Recomendaciones

- Profundizar en los mecanismos de acción de los aceites esenciales y compuestos promisorio del presente trabajo, para esclarecer los mecanismos por los cuales potencian la toxicidad de antibióticos bactericidas.
- Estudiar otros genes SOS para profundizar en los mecanismos de inhibición de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en *S. aureus* y en otros modelos bacterianos.
- Estudiar la toxicidad y genotoxicidad de los aceites esenciales y terpenos promisorios en modelos *in vivo e in vitro*; que permita llegar a conclusiones acerca de la inocuidad y seguridad de estos compuestos en humanos.

Bibliografía

- Abreu, Ana Cristina, J Mcbain, and Manuel Sim. 2012. "Plants as Sources of New Antimicrobials and Resistance-Modifying Agents." *Natural product reports*, 29(9), 1007-1021.
- Aguiar, José J.S. et al. 2015. "Antibacterial and Modifying-Antibiotic Activities of the Essential Oils of *Ocimum Gratissimum* L. and *Plectranthus Amboinicus* L." *European Journal of Integrative Medicine* 7(2): 151–56.
- Baharoglu, Zeynep, Geneviève Garriss, and Didier Mazel. 2013. "Multiple Pathways of Genome Plasticity Leading to Development of Antibiotic Resistance." *Antibiotics* 2(2): 288–315. <http://www.mdpi.com/2079-6382/2/2/288/htm>.
- Barreto, Humberto Medeiros et al. 2014. "Effect of *Lippia Origanoides* H.B.K. Essential Oil in the Resistance to Aminoglycosides in Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*." *European Journal of Integrative Medicine* 6(5): 560–64.
- Beaber, John, Bianca Hochhut, and Matthew Waldor. 2004. "SOS Response Promotes Horizontal Dissemination of Antibiotic Resistance Genes." *Nature* 427(6969): 72–74.
- Bedoui, Ahmed, and Leila Chekir-ghedira. 2016. "Reversal of Resistance in Bacteria Underlies Synergistic Effect of Essential Oils with Conventional Antibiotics." *Microbial pathogenesis*, 106, 50-59.
- Bitu, Vanessa de Carvalho Nilo et al. 2014. "Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia Gracilis* Schauer Leaves and Its Potential as Modulator of Bacterial Resistance." *Natural Product Research* 28(6): 399–402.
- Bollenbach, Tobias, Selwyn Quan, Remy Chait, and Roy Kishony. 2009. "Nonoptimal Microbial

- Response to Antibiotics Underlies Suppressive Drug Interactions.” *Cell* 139(4): 707–18.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.025>.
- Brent, R, and M Ptashne. 1981. “Mechanism of Action of the *lexA* Gene Product.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(7): 4204–8.
- Bueno-Sanchez, Juan, Jairo Martinez-Morales, and Elena Stashenko. 2009. “Actividad Antimicrobiana de Terpenos.” *Salud UIS* (51): 231–35.
- Burt, Sara. 2004. “Essential Oils : Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods — a Review.” 94: 223–53.
- Cantrell, Charles L, Scott G Franzblau, and Nikolaus H Fischer. 2001. “Review Antimycobacterial Plant Terpenoids Incentive due to the Predominance of Disease in the Developing World . The Very Slow Growth and Highly Contagious Nature of M . Tuberculosis Have Also Served to Discourage the Drug Discovery Effort . Nonetheless.” 67(5): 685–94.
- Chaves, Thiago P et al. 2014. “Antibiotic Resistance Modulation by Natural Products Obtained from *Nasutitermes corniger* (Motschulsky , 1855) and Its Nest.” . *Saudi journal of biological sciences*, 22(4), 404-408.
- Cirz, Ryan T. et al. 2005. “Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance.” *PLoS Biology* 3(6): 1024–33.
- Cirz, R. T., & Romesberg, F. E. 2006. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(1), 220-225.
- Cos, Paul, Arnold J. Vlietinck, Dirk Vanden Berghe, and Louis Maes. 2006. “Anti-Infective Potential of Natural Products: How to Develop a Stronger in Vitro ‘Proof-of-Concept.’”

Journal of Ethnopharmacology 106(3): 290–302.

Couce, Alejandro, and Jesús Blázquez. 2009. “Side Effects of Antibiotics on Genetic Variability.” *FEMS Microbiology Reviews* 33(3): 531–38.

Coutinho, Henrique D M et al. 2009. “BMC Complementary and Herbal Therapy Associated with Antibiotic Therapy: Potentiation of the Antibiotic Activity against Methicillin – Resistant Staphylococcus Aureus by Turnera Ulmifolia L.” 4: 1–4.

Cristo, J. S. et al. 2016. “HPLC Profile and Antibiotic-Modifying Activity of Azadirachta Indica A. Juss., (Meliaceae).” *Industrial Crops and Products*, 94, 903-908.

Cuirolo, Arabela, Konrad Plata, and Adriana E. Rosato. 2009. “Development of Homogeneous Expression of Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Clinical Strains Is Functionally Associated with a β -Lactam-Mediated SOS Response.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(1): 37–45.

DeLeo, Frank R, Binh An Diep, and Michael Otto. 2009. “Host Defense and Pathogenesis in Staphylococcus Aureus Infections.” *Infectious disease clinics of North America* 23(1): 17–34.

Fitzgerald, J. Ross. 2014. “Evolution of Staphylococcus Aureus during Human Colonization and Infection.” *Infection, Genetics and Evolution* 21: 542–47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.020>.

Fuda, C.C.S., J.F. Fisher, and S. Mobashery. 2005. “ β -Lactam Resistance in Staphylococcus Aureus: The Adaptive Resistance of a Plastic Genome.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(22): 2617–33.

Gao, Xueyan, Wenquan Wang, Shengli Wei, and Weidong Li. 2009. “Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza Radix and Its Bioactive Compounds.” *Zhongguo*

Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica 34(21): 2695–2700.

Gibbons, Simon. 2004. “Anti-Staphylococcal Plant Natural Products.” *Natural product reports* 21(2): 263–77.

Goldstein, Fred et al. 2007. “Identification and Phenotypic Characterization of a Beta-Lactam-Dependent, Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strain.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(7): 2514–22.

Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. 2010. “SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building.” *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-.

Hanssen, Anne, and Johanna Ericson. 2006. “SCCmec in Staphylococci: Genes on the Move.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46(1): 8–20.

Hendry, E. R., T. Worthington, B. R. Conway, and P. a. Lambert. 2009. “Antimicrobial Efficacy of Eucalyptus Oil and 1,8-Cineole Alone and in Combination with Chlorhexidine Digluconate against Microorganisms Grown in Planktonic and Biofilm Cultures.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(6): 1219–25.

Kelman, Lori M., and Zvi Kelman. 2004. “Multiple Origins of Replication in Archaea.” *Trends in Microbiology* 12(9): 399–401.

Kim B, Little JW. 1992. “Dimerization of a Specific DNA-Binding Protein on the DNA.” *Science* 255:203–206.

Klitgaard, Janne, Marianne Skov, Birgitte Kallipolitis, and Hans Kolmos. 2008. “Reversal of Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus by Thioridazine.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62(6): 1215–21.

- Kohanski, Michael et al. 2007. "A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics." *Cell* 130(5): 797–810.
- Kohanski, Michael a., Mark a. DePristo, and James J. Collins. 2010. "Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis." *Molecular Cell* 37(3): 311–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>.
- Korbie, Darren J, and John S Mattick. 2008. "Touchdown PCR for Increased Specificity and Sensitivity in PCR Amplification." *Nature protocols* 3(9): 1452–56.
- Lavor, Anne Karyzia L S et al. 2014. "Association between Drugs and Herbal Products: In Vitro Enhancement of the Antibiotic Activity by Fractions from Leaves of *Croton Campestris* A. (Euphorbiaceae)." *European Journal of Integrative Medicine* 6(3): 301–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.002>.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. 2009 Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food chemistry*, 112(1), 77-83.
- Little JW, Mount DW. 1982. "The SOS Regulatory System of *Escherichia Coli*." *Cell* 29:11–22.
- Livak, Kenneth J, and Thomas D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method." 408: 402–8.
- López, Elena, Marina Elez, Ivan Matic, and Jesús Blázquez. 2007. "Antibiotic-Mediated Recombination: Ciprofloxacin Stimulates SOS-Independent Recombination of Divergent Sequences in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 64(1): 83–93.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1989 Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , New York*.
- Madigan, MT, JM Martinko, and J Parker. 2004. "Brock Biología de Los Microorganismos."

<http://130.206.88.107/revistes224/index.php/IM/article/view/4c457c5bbef3a.002/9447>
(May 4, 2015).

Maiques, Elisa et al. 2006. “ β -Lactam Antibiotics Induce the SOS Response and Horizontal Transfer of Virulence Factors in Staphylococcus Aureus” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 188(7): 2726–29.

McCallum, Nadine, Brigitte Berger-Bächi, and Maria M. Senn. 2010. “Regulation of Antibiotic Resistance in Staphylococcus Aureus.” *International Journal of Medical Microbiology* 300(2-3): 118–29.

Medeiros Barreto, Humberto et al. 2014. “Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity in Vitro by Lippia Origanoides H.B.K. in Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus.” *BioMed Research International* 2014.

Merril, CR, D Scholl, and SL Adhya. 2003. “The Prospect for Bacteriophage Therapy in Western Medicine.” *Nature Reviews Drug Discovery. Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(3), 531-538.

Miller C, Ingmer H, Thomsen,E, Skarstad K, y Cohen S 2003. “DpiA Binding to the Replication Origin of Escherichia Coli Plasmids and Chromosomes Destabilizes Plasmid Inheritance and Induces the Bacterial SOS Response.” *Journal of Bacteriology* 185(20): 6025–31

Mo, Charlie Y et al. “Systematically Altering Bacterial SOS Activity under Stress Reveals Therapeutic Strategies for Potentiating.” 1(4): 1–15.

Morais-Braga, M. F. et al. 2015. “Additive Effect of Lygodium Venustum SW . in Association with Natural Product Research : Formerly SW . in Association with Gentamicin.” *Natural product research*, 30(16), 1851-1853.

- Morais-Braga, Maria Flaviana B et al. 2016. "Psidium Guajava L ., from Ethnobiology to Scientific Evaluation: Elucidating Bioactivity against Pathogenic Microorganisms." *Journal of Ethnopharmacology* (November): 0–1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.017>.
- Nicolson, Kirsty, Gary Evans, and Paul W. O'Toole. 1999. "Potentiation of Methicillin Activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Diterpenes." *FEMS Microbiology Letters* 179(2): 233–39.
- Nuño, Gabriela et al. 2016. "Antioxidant / Antibacterial Activities of a Topical Phytopharmaceutical Formulation Containing a Standardized Extract of Baccharis Incarum , an Extremophile Plant Species from Argent ... Antioxidant / Antibacterial Activities of a Topical Phytopharmaceuti." *Phytotherapy research*, 26(11), 1759-176
- Oliveira, Danilo R et al. 2007. "Chemical and Antimicrobial Analyses of Essential Oil of Lippia Origanoides H.B.K." 101: 236–40.
- Plata, Konrad B. et al. 2013. "Targeting of PBP1 by β -Lactams Determines recA/SOS Response Activation in Heterogeneous MRSA Clinical Strains." *PloS one*, 8(4), e61083.
- Qiu, J. et al. 2011. "The Effects of Subinhibitory Concentrations of Costus Oil on Virulence Factor Production in Staphylococcus Aureus." *Journal of Applied Microbiology* 110(1): 333–40.
- R Core Team. 2013. "R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical." *Computing, Vienna, Austria*: (<http://www.R-project.org>).
- Rosato, Roberto R. et al. 2014. "TCA Cycle-Mediated Generation of ROS Is a Key Mediator for HeR-MRSA Survival under β -Lactam Antibiotic Exposure." TCA cycle-mediated generation of ROS is a key mediator for HeR-MRSA survival under β -lactam antibiotic exposure. *PloS one*, 9(6), e99605.

- Rosenberg, S M. 2001. "Evolving Responsively: Adaptive Mutation." *Nature reviews. Genetics* 2(7): 504–15.
- Ryan, Cirz, and Romesberg FLoyd. 2014. "Induction and Inhibition of Ciprofloxacin Resistance-Conferring Mutations in Hypermutator Bacteria Induction and Inhibition of Ciprofloxacin Resistance-Conferring Mutations in Hypermutator Bacteria." (August).
- Sánchez-Femat, E., R. Cruz-Leija, M. Torres-Hernández, and E. Herrera-Mayorga. 2016. "Mobile Application for Automatic Counting of Bacterial Colonies."
- Santos, F. A., Serra, C. G., Bezerra, R. J., Figueredo, F. G., Matias, F. F., Menezes, I. R., & Coutinho, H. D. 2016. "Antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) essential oil against *Streptococcus mutans*". *European Journal of Integrative Medicine*, 8(3), 293-297.
- Shimizu, M, S Shiota, and T Mizushima. 2001. "Marked Potentiation of Activity of β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* by Corilagin Marked Potentiation of Activity of β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* by Corilagin." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(11): 3198–3201.
- Shiota, Sumiko et al. 2000. "Restoration of Effectiveness of β -Lactams on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* by Tellimagrandin I from Rose Red." *FEMS Microbiology Letters* 185(2): 135–38.
- Silva, V A, F Q S Guerra, H L F Pessôa, and A F R Freitas. 2015. "Antibacterial Activity of the Monoterpene Linalool: Alone and in Association with Antibiotics against Bacteria of Clinical Importance Antibacterial Activity of the Monoterpene Linalool: Alone and in Association with Antibiotics Against Bacteria of Clini." *Phytochem. Res*, 7(5), 1022-1026.
- Skurnik, Mikael, and Eckhard Strauch. 2006. "Phage Therapy: Facts and Fiction." *International Journal of Medical Microbiology* 296(1): 5–14.

- Slager, Jelle, Morten Kjos, Laetitia Attaiech, and Jan Willem Veening. 2014. "Antibiotic-Induced Replication Stress Triggers Bacterial Competence by Increasing Gene Dosage near the Origin." *Cell* 157(2): 395–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.068>.
- Sousa, A.T. L. et al. 2016. "Avaliação Da Atividade Antibacteriana Dos Extratos Metanólico E Hexânico Do Caule Folhado de Melissa Avaliação Da Atividade Antibacteriana Dos Extratos Metanólico E Hexânico Do Caule Folhado de Melissa Officinalis L . Evaluation of the Antibacterial Activ." (July).
- Stashenko, E.E., Combariza, Y. & Puertas, A.M., 1998. *Aceites esenciales, técnicas de extracción y análisis*, Bucaramanga, Colombia: Laboratorio de Fitoquímica y Cromatografía. Universidad Industrial de Santander.
- Szewczyk, Katarzyna, and Christian Zidorn. 2014. "Ethnobotany , Phytochemistry , and Bioactivity of the Genus Turnera (Passi Fl Oraceae) with a Focus on Damiana — Turnera Diffusa." *Journal of Ethnopharmacology* 152(3): 424–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.019>.
- Thi, T.D. et al. 2011. "Effect of recA Inactivation on Mutagenesis of Escherichia Coli Exposed to Sublethal Concentrations of Antimicrobials." *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(3), 531-538.
- Vicuña, G. C., E. E. Stashenko, and J. L. Fuentes. 2010. "Chemical Composition of the Lippia Origanoides Essential Oils and Their Antigenotoxicity against Bleomycin-Induced DNA Damage." *Fitoterapia* 81:343–349.
- Vidal, C. S., Oliveira-Tintino, C. D. M., Tintino, S. R., Galvão, H. B. F., da Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., & de Menezes, I. R. A. 2016. "Chemical composition, antibacterial and modulatory action of the essential oil of Croton rhamnifolioides leaves Pax and Hoffman". *Bioscience Journal*, 32(6).
- Wade, Joseph T., Nikos B. Reppas, George M. Church, and Kevin Struhl. 2005. "Genomic Analysis of LexA Binding Reveals the Permissive Nature of the Escherichia Coli Genome

and Identifies Unconventional Target Sites.” *Genes and Development* 19(21): 2619–30.

Walker, G C. 1984. “Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in *Escherichia Coli*.” *Microbiological reviews* 48(1): 60–93.

Walsh, C. 2000. “Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance.” *Nature* 406(6797): 775–81.

Walsh, C. 2003. “Where Will New Antibiotics Come From?” *Nature reviews. Microbiology* 1(1): 65–70.

Walsh, Timothy R. 2006. “Combinatorial Genetic Evolution of Multiresistance.” *Current Opinion in Microbiology* 9(5): 476–82.

Weber-Dabrowska, B, M Mulczyk, and a Górski. 2000. “Bacteriophage Therapy of Bacterial Infections: An Update of Our Institute’s Experience.” *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 48(6): 547–51.

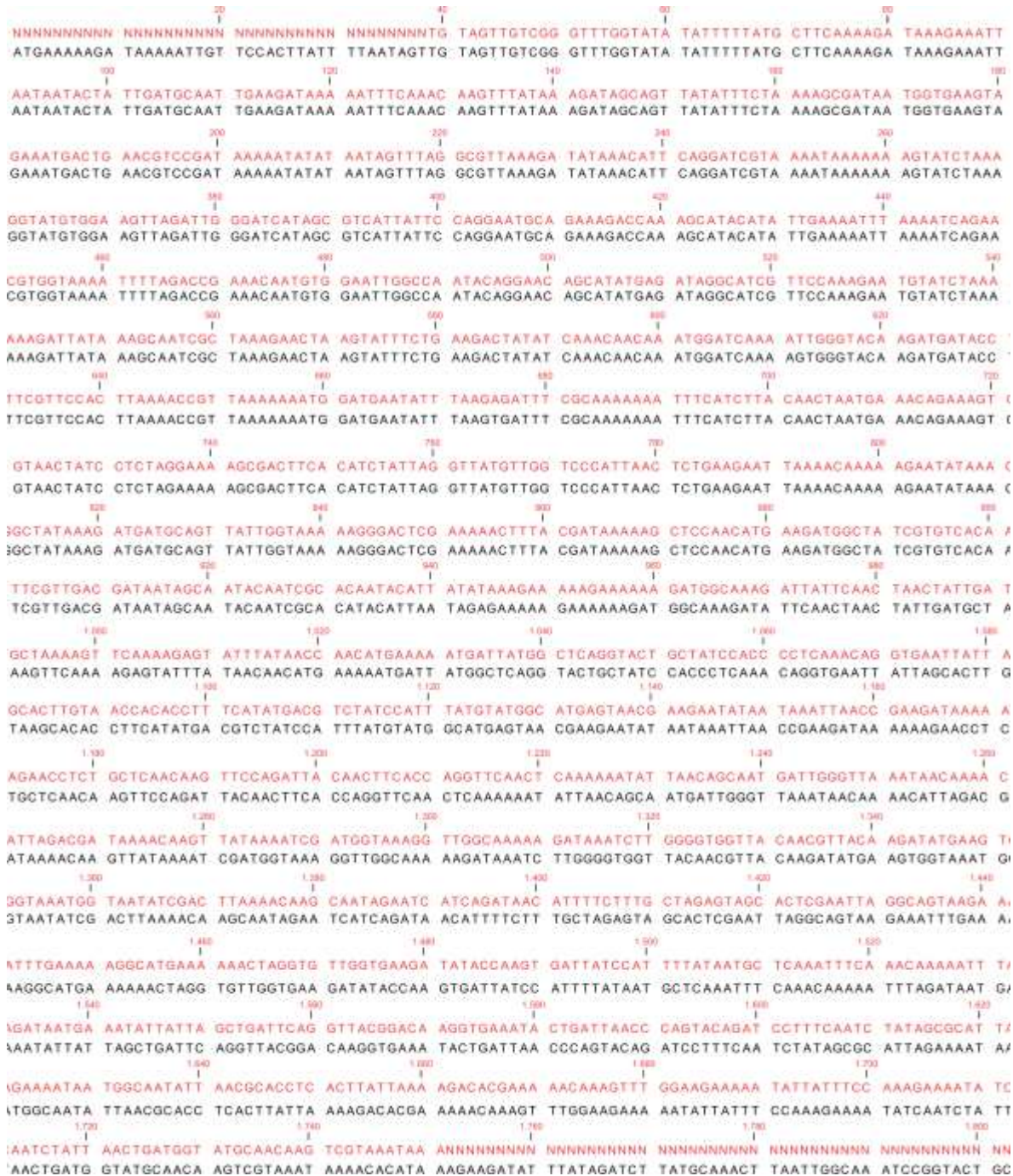
Workbench. 2010. “CLC Genomics.”

Wright, Gerard D. 2007. “On the Road to Bacterial Cell Death.” *Cell* 130(5): 781–83.

Yam, T S, J M Hamilton-Miller, and S Shah. 1998. “The Effect of a Component of Tea (*Camellia Sinensis*) on Methicillin Resistance, PBP2’ Synthesis, and Beta-Lactamase Production in *Staphylococcus Aureus*.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 42(2): 211–16.

Apéndices

Apéndice A. Alineamiento de la secuencia del gen *mecA* de cepas de *S. aureus* (rojo) contra una secuencia de referencia KX139524 (negro) disponibles en la base de datos NCBI.



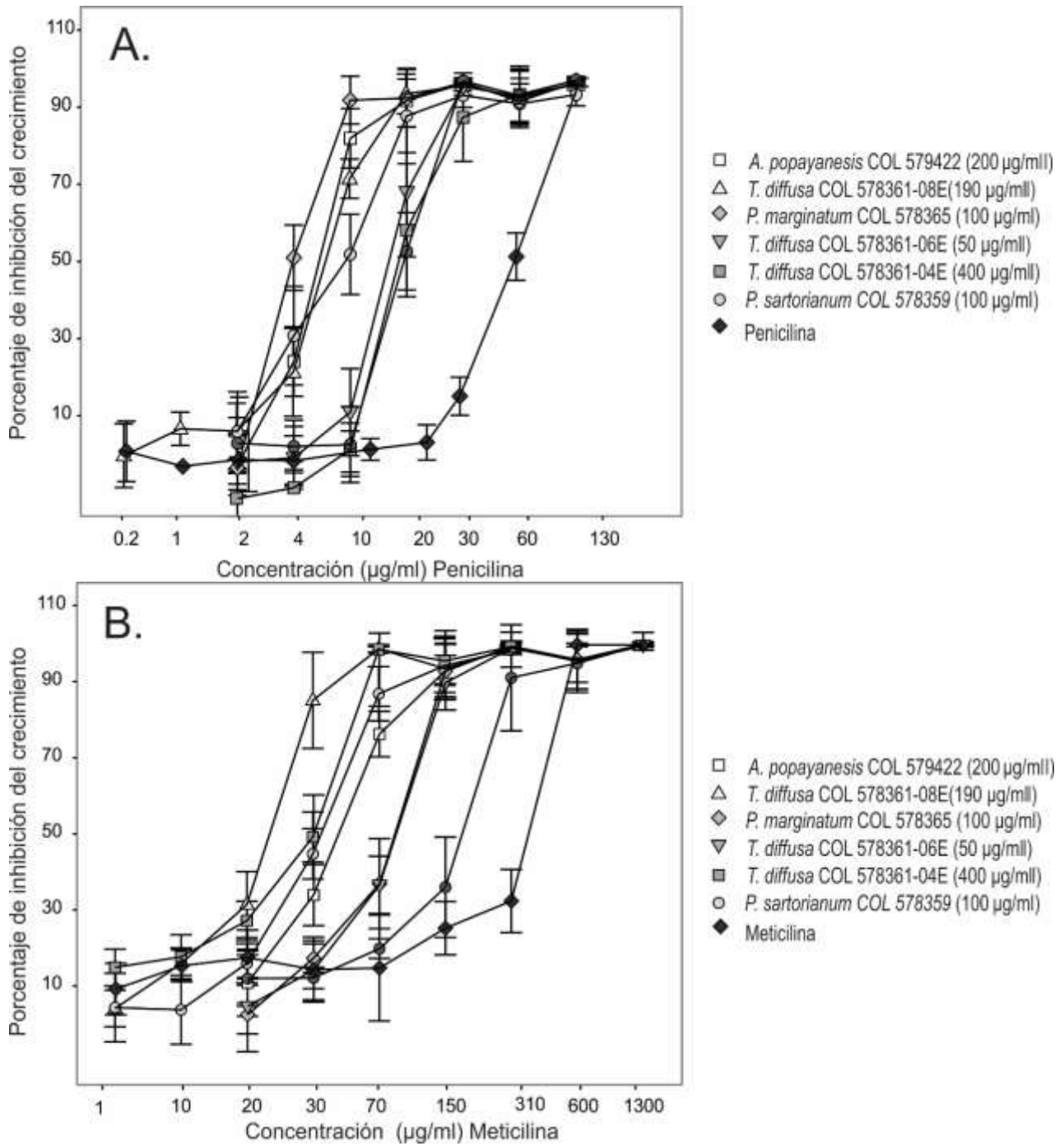
Apéndice B. Actividad antibacteriana de AE. Se presentan la CMI de los AEs en las cepas de *S. aureus* MSSA y MRSA. NI: No inhibición.

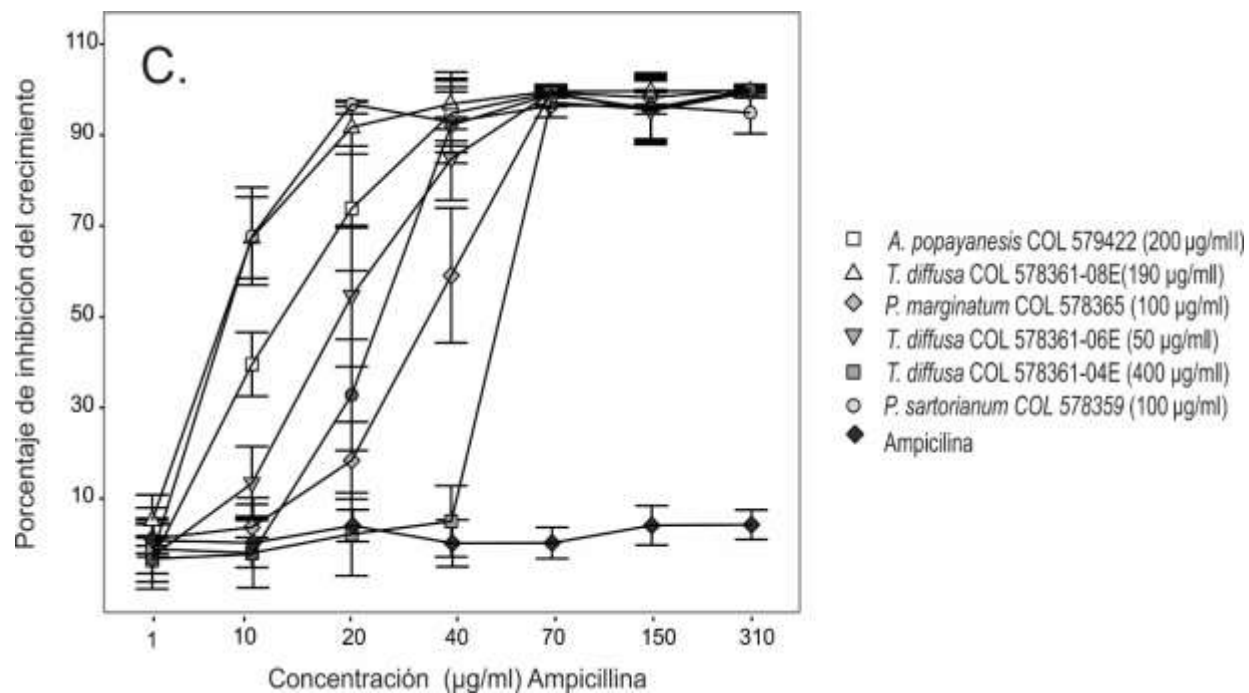
No.	Nombre científico (CNH)	CMI µg/ml MSSA	CMI µg/ml MRSA
1	<i>Ageratina aff. popayanensis</i> (COL 579422)	1562	3125
2	<i>Wedelia calycina</i> (COL 578353)	NI	NI
3	<i>Wedelia calycina</i> (COL 582605)	NI	NI
4	<i>Calea sessiliflora</i> (COL 582602)	NI	NI
5	<i>Wedelia calycina</i> (COL 583911)	NI	NI
6	<i>Baccharis trinervis</i> (COL 582811)	NI	NI
7	<i>Baccharis decussate</i> (COL 582606)	NI	NI
8	<i>Ageratina popayanensis</i> (COL 582600)	NI	NI
9	<i>Calea glomerata</i> (COL 583912)	NI	NI
10	<i>Cordia curassavica</i> (COL 559446)	NI	NI
11	<i>Zornia brasiliensis</i> (COL 582604)	NI	NI
12	<i>Cymbopogon nardus</i> (COL 582309)	NI	NI
13	<i>Hyptis brachiata</i> (COL 582531)	NI	NI
14	<i>Hyptis dilatata</i> (COL 582530)	NI	NI
15	<i>Calycolpus moritzianus</i> (COL 578360)	3125	NI
16	<i>Psidium sartorianum</i> (COL 578359)	1562	3125
17	<i>Calycolpus moritzianus</i> (COL 578360)	NI	NI
18	<i>Piper subflavum</i> (COL 582361)	NI	NI
19	<i>Piper médium</i> (COL 582360)	NI	NI
20	<i>Piper holtonii</i> (COL 582357)	NI	NI
21	<i>Piper marginatum</i> (COL 578365)	3125	NI
22	<i>Turnera diffusa</i> (COL 578361-04E)	780	780
23	<i>Turnera diffusa</i> (COL 578361-06E)	3125	3125
24	<i>Turnera diffusa</i> (COL 578361-08E)	3125	3125
25	<i>Lippia alba</i> (COL 582597)	NI	NI
26	<i>Lantana cámara</i> (COL 582528)	NI	NI
27	<i>Lantana colombiana</i> (COL 582328)	NI	NI
28	<i>Chromolaena odorata</i> (COL 583919)	NI	NI

Apéndice C. Actividad antibacteriana de terpenos. Se presentan la CMI de los terpenos en las cepas de *S. aureus* MSSA y MRSA. NI: No inhibición.

No.	Terpeno (concentración)	CMI μ M MSSA	CMI μ M MRSA
1	Acetato de geraniol (97%)	NI	NI
2	Acetato de Nerilo (97%)	NI	NI
3	Carvacrol (98%)	4000	4000
4	β -cariofileno (98%)	NI	NI
5	p-Cimeno (99%)	NI	NI
6	Citral (95%)	NI	NI
7	Dihidrocarvona (97%)	NI	NI
8	Estragol (96%)	NI	NI
9	Geraniol (98%)	NI	NI
10	Limoneno (97%)	NI	NI
11	Mirceno (95%)	NI	NI
12	Nerol (97%)	NI	NI
13	3-Octanona (98%)	NI	NI
14	Oxido de limoneno (97%)	NI	NI
15	R(+)-Carvona (96%)	NI	NI
16	S(-)-Carvona (96%)	NI	NI
17	Timol (99.5%)	4000	4000
18	1, 8 Cineol (98%)	NI	NI

Apéndice D. Actividad potenciadora de la actividad antibiótica con AE en MRSA. Co-ensayos de los AE con los antibióticos β -lactámico con: A. Penicilina. B. Meticilina. C. Ampicilina





Apéndice E. Actividad potenciadora de la actividad antibiótica con terpenos en MRSA. Co-ensayos de los AE con los antibióticos β -lactámico con: A. Penicilina. B. Meticilina. C.

Ampicilina

