

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS



## “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y EVALUACIÓN FARMACODINÁMICA DE DERIVADOS ARILMERCAPTOQUINONICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* Y *Enterococcus* spp. MULTIRRESISTENTES”

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado de Doctor en Farmacología por:

**JAVIER ANDRES CAMPANINI SALINAS**

Directores de tesis

Dr. Gerardo González Rocha  
Dr. David Vásquez Velásquez

**SANTIAGO-CHILE  
2018**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
AVANCE II TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**JAVIER ANDRÉS CAMPANINI SALINAS**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día: \_\_\_\_\_

**Directores de Tesis:**

Dr. Gerardo González R.

\_\_\_\_\_

Dr. David Vásquez V.

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Hernán Pessoa M. (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Sergio Álvarez A.

\_\_\_\_\_

Dra. Cecilia Tapia P.

\_\_\_\_\_

Dr. Francisco Silva O.

\_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

---

Primero debo agradecer a mi madre por el apoyo irrestricto en cada una de las etapas de mi vida, gracias por la confianza ciega que has tenido durante mi desarrollo y todo el amor que me has entregado. Tu formar de crianza poco tradicional a forjado un carácter en mi, que me ha servido para enfrentar múltiples desafíos.

A mi padre, en la dimensión en que se encuentre o en la forma energética que haya tomado, simplemente gracias.

A cada uno de los integrantes de mi familia, por ser ese refugio necesario para poder continuar el camino cuando se pone difícil. Gracias por los innumerables momentos de alegría que me han entregado, absolutamente necesarios para no sucumbir ante la rutina.

A Tati, te has convertido en un componente fundamental de esta última etapa de mi vida, en la que todo parecía cuesta arriba, en la que muchas veces faltaron fuerzas, ahí estabas tú tercamente alentándome. Gracias por esta siempre.

A mi amigo Juanito, quien me ha acompañado fielmente durante este tiempo, en cual nos embarcamos en esta aventura juntos, y ahora después de un largo camino está llegando a su fin. Gracias por tu amistad y tu confianza a toda prueba.

A Feñito, gracias por perdonar una y otra vez mi ingratitud, por estar siempre cuando te necesite.

A Julis, la amistad menos tradicional que puede existir, pero sin embargo se que estás ahí.

A mis amigos del doctorado, cuantos recuerdos y anécdotas atesoro de cada uno de ustedes. Daniel, Edi, Patito, Pablito, Colombiano y Nelson, ustedes hicieron estos años muchos más llevaderos.

A Nicolas y Fabian, sin su trabajo y apoyo este proceso no hubiese sido igual, gracias por la confianza que depositaron en mí.

A Toro, gracias por tu ayuda y compañía durante la tesis, gracias por creer en los mini proyectos que emprendíamos.

Gracias a la gente de LIAA, por su hospitalidad y ayuda en cada tarea que emprendía. Gracias Fefi, Andy, Marito, Profe Mariana, Profe Helia.

Gracias a Don Jose, y a cada uno de los funcionarios de la facultad, gracias por hacer que esta funcione y por el apoyo que me brindaron.

A la Profe Sole, agradezco su confianza para las tareas que me encomendo, sin lugar a dudas fueron necesario de mi desarrollo personal y profesional.

A los integrantes de mi comisión; Profesor Hernan, fue parte fundamental de mi formación en pregrado, emprendimos un curso de extesión juntos y ahora tuve su consejo durante mi trabajo doctoral, sinceras gracias. Dr. Silva, gracias por su apoyo y consejo durante todo este tiempo, desde mi memoria de titulo hasta ahora en el trabajo de tesis, gracias por aterrizar a la clínica cada una de las ideas o teorías que se escapaban. Dra. Tapia, su incorporación a la comisión solo sumo mejoras al trabajo que realizamos, gracias por sus consejos. Profesor Sergio, primero agradecer el apoyo y la confianza en la investigación que realizamos. Agradezco sinceramente la agudeza que tuvo como corrector en la múltiples instancias que enfrente, esto contribuyó importantemente a mi formación como investigador.

A Gerardo, por su apoyo desde un comienzo, gracias por la confianza que depositaste en mi persona, que se tradujo en la incorporación a un claustro de una disciplina poco habitual para ti. Gracias por tus palabras y todo lo enseñado durante estos años.

A David, en un comienzo fue mi turno de confiar en ti, gracias a eso me convertí en tu primer tesista de pregrado. Luego vino el turno de que confiaras tu en mi, y que emprendieramos juntos este trabajo de tesis. Fue un camino duro y difícil, en el que los dos aprendimos mucho. Sin duda tu persona dejará huella en mi formación como Profesional, Investigador y Persona.

## PUBLICACIONES

---

**A New Kind of Quinonic-Antibiotic Useful Against Multidrug-Resistant *S. aureus* and *E. faecium* Infections.**

**Campanini-Salinas J**, Andrades-Lagos J, González Rocha G, Choquesillo-Lazarte D, Bollo Dragnic S, Faúndez M, Alarcón P, Silva F, Vidal R, Salas-Huenuleo E, Kogan M, Mella J, Recabarren Gajardo G, Vásquez-Velásquez D. *Molecules*. 2018; 23(7):1776. <https://doi.org/10.3390/molecules23071776>

## PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

---

**48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology. Foz de Iguazu, Brazil. (2016)**

New Family of Antibacterials, Ubiquinone Analogues, with Activity Against Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. Multiresistant.

**J. Campanini-Salinas**, J.Andrades-Lagos, N. Hinojosa, P. Alarcón, G. González-Rocha and D. Vásquez-Velásquez.

**4º Reunión Anual de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. (2016)**

Structure-activity relationship study of potential antibiotics analogues of ubiquinone  
J. Andrades-Lagos, **J. Campanini-Salinas**, Vásquez-Velásquez.

**International Conference on Antimicrobial Research. Madrid, España.(2014)**

Study of antibacterial activity and toxicity of functional analogues of ubiquinone.  
D.R. Vásquez, **J.A. Campanini**, D.C. Ahumada, E.S. Salas, J.A. Andrades, J.A. Mella, M.J. Kogan, C.A. Durán, R.M. Vidal and F.P. Silva.

### **31° Congreso Latinoamericano de Química. Lima, Perú.(2015)**

Synthesis, characterization, evaluation antibacterial activity and toxicity study of a series arylmercaptoquinones .

**Javier Campanini**, Edison Salas-Huenuleo, Claudia Durán, Francisco Silva, Marcelo Kogan, David Vásquez.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES**

---

### **XXXIII Congreso Chileno de Infectología. Valdivia, Chile. (2016)**

Análogos de ubiquinona, nuevas entidades moleculares con actividad sobre aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. Multiresistentes.

**J. Campanini-Salinas**, J.Andrades-Lagos, N. Hinojosa, P. ,Alarcón, G. González-Rocha and D. Vásquez-Velásquez.

### **32° Congreso Latinoamericano de Química y 31° Jornadas Chilenas de Química. Concepción, Chile. (2016)**

Determining percentage of albumin binding of two new antibacterial arilmercaptoquinonics, and its correlation with the antibacterial activity and the albumin docking score.

**J.A. Campanini-Salinas**, N. Hinojosa, J.A. Andrades-Lagos, P. Silva, C. Yañez, S. Bollo and D.R. Vásquez.

Develop of new ubiquinone analogs as antibacterial agents from 3d-qsar/comfa models.

J. Andrades-Lagos; **J. Campanini-Salinas**; I. Guajardo-Pavez; J. Mella-Raipan; H. Pessoa-Mahana; D. Vásquez-Velásquez

## RECONOCIMIENTOS

---

**Mejor Investigación desarrollada por un investigador Joven en el área de Infectología.** Premio “Dra. Mónica Suárez”, por el trabajo “Análogos de ubiquinona, nuevas entidades moleculares con actividad sobre aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. Multiresistentes” presentado en el Congreso de la Sociedad Chilena de Infectología. **12 al 15 de Octubre de 2016.** Valdivia. Chile.

**Mejor Trabajo Científico en el área de Drug Discovery,** por el trabajo “New Family of Antibacterials, Ubiquinone Analogues, with Activity Against Clinical Isolate of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. Multiresistant” en el Congreso Latinoamericano de Farmacología Experimental. **3 al 7 de octubre de 2016.** Foz de Iguazu, Brazil

## **PATENTES**

---

**PCT USA 16/067,033** - PYRIMIDO-ISOQUINOLIN-QUINONE DERIVATE COMPOUNDS, AND PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALTS, ISOMERS AND TAUTOMERS THEREOF; PHARMACEUTICAL COMPOSITION; PREPARATION METHOD; AND APPLICATIONS. *28 de junio de 2018.*

**PATENTE DE INVENCION. N° 3780-2015.- UNIVERSIDAD DE CHILE .- CHILE.-** Compuestos derivados pirimido-isoquinolin-quinonas, sus sales, isómeros, tautómeros farmacéuticas aceptables; composiciones farmacéuticas; procedimiento de preparación; y su uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas y bacterianas multirresistentes. Fecha de publicación: *14 de Septiembre de 2016.*

## **FINANCIAMIENTO**

---

PROYECTO FONDECYT REGULAR **1130838**

PROYECTO FONDECYT INICIO **11110516**

BECA DE DOCTORADO NACIONAL CONICYT **21130643**



## ÍNDICE GENERAL

Resumen	14
Abstract	17
1. <b>Introducción:</b> Resistencia a Antimicrobianos	19
1. <b>Introducción:</b> Situación actual de la resistencia a antibacterianos en el mundo	22
1. <b>Introducción:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	25
1. <b>Introducción:</b> <i>Enterococcus</i> sp. resistente a vancomicina	27
1. <b>Introducción:</b> Desarrollo de nuevos antimicrobianos	29
1. <b>Introducción:</b> Una nueva familia de antibacterianos	35
2. <b>Hipótesis de Trabajo</b>	42
3. <b>Objetivo General</b>	42
4. <b>Objetivo Específicos</b>	43
5. <b>Materiales y Métodos</b>	44
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Viabilidad celular post-exposición aguda a los derivados DFUCh-O5 Y DFUCh-P4	51
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos multirresistentes	55
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Determinación de la Concentración Bactericida Mínima	63
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Efecto de las proteínas plasmáticas en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4	67
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Estudio de la asociación de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 con antibacterianos de uso clínico.	71
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Cuantificación del efecto post-antibiótico	76
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Determinación del índice de mutaciones espontáneas de <i>S. aureus</i> multirresistentes frente a una exposición aguda a DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	80
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Explorar la potencial inducción de mutaciones de <i>S. aureus</i> frente a una exposición crónica a DFUCh-P4 Y DFUCh-O5.	86
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Determinación de la cinética de muerte, de cepas Gram positivo de relevancia clínica frente a DFUCh-O5 Y DFUCh-P4.	91
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Determinación del porcentaje de permeabilidad de DFUCh-O5 Y DFUCh-P4	93
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Determinación del porcentaje de unión a albúmina.	97
6. <b>Resultados y Discusión:</b> Determinación de la efectividad <i>in vivo</i> de DFUCh-O5 Y DFUCh-P4, sobre un modelo de infección sistémica por <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i> en larvas de <i>Galleria mellonella</i> .	100
7. <b>Conclusiones</b>	116
8. <b>Anexos</b>	118
9. <b>Bibliografía</b>	129

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de resistencia a antibacterianos	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Cronología de introducción de familias de antibacterianos a la práctica clínica.	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b> Representantes de las últimas nuevas familias de antibacterianos introducidos.	<b>30</b>
<b>Figura 4</b> Introducción de nuevos fármacos antibacterianos al mercado.	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Modificaciones estructurales a antibacterianos ya existentes.	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Inhibición del traspaso de electrones mediado por ubiquinona (coenzima Q), en CTeB.	<b>36</b>
<b>Figura 7.</b> Estructura de compuestos naftoquinónicos con actividad antibacteriana.	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> Diseño de la entidad molecular base quinónica	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de viabilidad de, células HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, expuestas a las distintas concentraciones de DFUCh-O5 expresadas en µg/mL durante 24 h.	<b>51</b>
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de viabilidad de, células HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, expuestas a las distintas concentraciones de DFUCh-P4 expresadas en µg/mL durante 24 h	<b>52</b>
<b>Figura 11.</b> Distribución de cepas de SARM (izquierda) y ERV (derecha), según de sitios de origen.	<b>55</b>
<b>Figura 12.</b> Histograma de distribución de la CIM de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) versus CIM de vancomicina sobre aislamientos clínicos de SARM. n=45	<b>59</b>
<b>Figura 13.</b> Histograma de distribución de CIM de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) versus CIM de vancomicina sobre aislamientos clínicos de ERV.	<b>62</b>
<b>Figura 14.</b> Histograma de distribución de CBM de DFUCh-O5 ( <i>izquierda</i> ) y DFUCh-P4 ( <i>derecha</i> ) sobre aislamientos clínicos de SARM.	<b>64</b>
<b>Figura 15.</b> Histograma de distribución de CBM de DFUCh-O5 ( <i>izquierda</i> ) y DFUCh-P4 ( <i>derecha</i> ) sobre aislamientos clínicos de ERV	<b>66</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 ( <i>izquierda</i> ) y DFUCh-P4 ( <i>derecha</i> ) sobre SARM ATCC® 43300. CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL	<b>77</b>
<b>Figura 17.</b> Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 ( <i>izquierda</i> ) y DFUCh-P4 ( <i>derecha</i> ) sobre <i>E. faecalis</i> ATCC® 29212. CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL	<b>77</b>
<b>Figura 18.</b> Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 ( <i>izquierda</i> ) y DFUCh-P4 ( <i>derecha</i> ) sobre SARM clínico 178. CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL.	<b>78</b>
<b>Figura 19.</b> Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 ( <i>izquierda</i> ) y DFUCh-P4 ( <i>derecha</i> ) sobre <i>E. faecium</i> Clínico 828 CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL.	<b>78</b>
<b>Figura 20.</b> Estructura DFUCh-P5 ( <i>a la izquierda</i> ) y DFUCh-O4 ( <i>a la derecha</i> ),	<b>84</b>

<b>Figura 21.</b> Cambios diarios en la MIC en los estudios de resistencia de pasajes en serie de DFUCH-O5, DFUCH-P4, vancomicina y rifampicina contra SARM ATCC® 29213.	<b>87</b>
<b>Figura 22.</b> Cinética de muerte de SARM ATCC® 43300, expuesto a DFUCH-O5 y DFUCH-P4, a diferentes concentraciones. La línea punteada azul representa el 99,9% de muerte.	<b>91</b>
<b>Figura 23.</b> Cinética de muerte de <i>E. faecalis</i> ATCC® 43300, expuesto a DFUCH-O5 y DFUCH-P4, a diferentes concentraciones. La línea punteada azul representa el 99,9% de muerte.	<b>92</b>
<b>Figura 24.</b> Curva de calibrado absorbancia v/s tiempo de DFUCH-O5.	<b>93</b>
<b>Figura 25.</b> Curva de calibrado absorbancia v/s tiempo de DFUCH-P4.	<b>94</b>
<b>Figura 26.</b> Esquema del sistema de PAMPA.	<b>94</b>
<b>Figura 27.</b> Concentración compuestos v/s tiempo en el ensayo de “Diálisis al equilibrio”.	<b>97</b>
<b>Figura 28 .</b> <i>G. mellonella</i> (polilla de la cera). Su desarrollo larvario se compone de siete estadios, luego de eso pasan estado de transición y latencia (pupa).	<b>99</b>
<b>Figura 29.</b> Niveles de melanización de las larvas.	<b>102</b>
<b>Figura 30.</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 10 µL de una solución 200 µg/mL de azul de Evans versus Larvas de <i>G. mellonella</i> alimentadas con 10 µL de una solución 200 µg/mL de azul de Evans.	<b>103</b>
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 50 µL de PBS con jeringa Hamilton v/s 50 µL de PBS con jeringa insulina. Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 50 µL de PBS con una jeringa Hamilton v/s 50 µL de PBS con una jeringa de insulina a las 24 horas de incubación.	<b>104</b>
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con de 4x10 <sup>6</sup> UFC total de SARM ATCC® 43300. (n=10)	<b>104</b>
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 1x10 <sup>5</sup> , 1x10 <sup>6</sup> y 1x10 <sup>7</sup> UFC totales de SARM ATCC® 43300. (n=10)	<b>105</b>
<b>Figura 34.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con diferentes inóculos de SARM ATCC® 43300. (n=10)	<b>106</b>
<b>Figura 35. A.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con una solución de PBS v/s suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de SARM ATCC® 43300 v/s suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de SARM ATCC® 29213. <b>B.</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de SARM ATCC® 43300 a las 48 horas <b>C.</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC/mL de SARM ATCC® 29213 a las 48 h de incubación.	<b>106</b>
<b>Figura 36. A.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con una solución de PBS v/s suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de <i>E. faecalis</i> ATCC® 29212. <b>B.</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con suspensión de bacterias de PBS a las 48 horas <b>C.</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de <i>E. faecalis</i> ATCC® 29212 a las 48 horas de incubación.	<b>107</b>
<b>Figura 37.</b> DFUCH-P4 en glicerina.	<b>108</b>
<b>Figura 38.</b> DFUCH-O5(Br) y DFUCH-P4(CI) en 2% DMSO + 98% Glicerina	<b>109</b>
<b>Figura 39. A.</b> DFUCH-P4 (CI) y DFUCH-O5(Br) suspendidos en F3, F4 y F5 a las 0 horas. <b>B.</b> DFUCH-P4(CI) y DFUCH-O5(Br) suspendidos en F3, F4 y F5 a las 24 horas.	<b>110</b>
<b>Figura 40.</b> Porcentaje de sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> con el vehículo formulado (n=10)	<b>110</b>

<b>Figura 41. A.</b> Porcentaje de sobrevivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con vancomicina. <b>B.</b> Grupo de 10 larvas inoculadas con vancomicina a una concentración de 220µg/mL transcurridos 5 días desde el inicio del ensayo.	<b>111</b>
<b>Figura 42. A.</b> Porcentaje de sobrevivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 10 µL de una solución de PBS v/s 10 µL de una solución del vehículo v/s DFUCh-O5 v/s DFUCh-05. (n=10)	<b>112</b>
<b>Figura 43.</b> Porcentaje de sobrevivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 10mg/Kg de vancomicina v/s 10mg/Kg de DFUCh-O5 v/s 10mg/Kg de DFUCh-P4 v/s 10µL Glicerina + H <sub>2</sub> O v/s 10 µL de suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de SASM ATCC® 29213. (n=10)	<b>113</b>
<b>Figura 44.</b> Porcentaje de sobrevivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con 10mg/Kg de vancomicina v/s 10mg/Kg de DFUCh-O5 v/s 10mg/Kg de DFUCh-P4 v/s 10µL Glicerina + H <sub>2</sub> O v/s 10 µL de suspensión de bacterias de 4x10 <sup>6</sup> UFC totales de EF ATCC® 29213. (n=10)	<b>114</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Listado de patógenos prioritarios para el desarrollo de antibacterianos	<b>24</b>
<b>Tabla 2.</b> Cronología de introducción de antibacterianos al mercado v/s primer reporte de resistencia	<b>32</b>
<b>Tabla 3.</b> Introducción de Antibacterianos en la última década	<b>34</b>
<b>Tabla 4.</b> Esquema serie de compuestos sintetizados	<b>39</b>
<b>Tabla 5.</b> CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4	<b>40</b>
<b>Tabla 6.</b> Categorización de aislamientos por sitio de origen y patrones de multiresistencia a fármacos antibacterianos.	<b>56</b>
<b>Tabla 7.</b> Perfil de susceptibilidad de SARM frente a vancomicina y daptomicina.	<b>57</b>
<b>Tabla 8.</b> Actividad antibacteriana de DFUCh-O5 sobre SARM.	<b>57</b>
<b>Tabla 9.</b> Actividad antibacteriana de DFUCh-P4 sobre SARM.	<b>58</b>
<b>Tabla 10.</b> Actividad antibacteriana de DFUCh-O5 sobre ERV.	<b>61</b>
<b>Tabla 11.</b> Actividad antibacteriana de DFUCh-P4 sobre ERV.	<b>62</b>
<b>Tabla 12.</b> Actividad bactericida de DFUCh-O5 sobre SARM.	<b>63</b>
<b>Tabla 13.</b> Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre SARM.	<b>64</b>
<b>Tabla 14.</b> Actividad bactericida de DFUCh-O5 sobre ERV.	<b>65</b>
<b>Tabla 15.</b> Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre ERV.	<b>65</b>
<b>Tabla 16.</b> Efecto de albúmina (Alb) en la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	<b>67</b>
<b>Tabla 17.</b> Efecto del suero humano al 10% (SH) en la actividad antibacteriana de los derivados.	<b>68</b>
<b>Tabla 18.</b> Integración resultados Farmacocinéticos y Farmacodinámicos	<b>69</b>
<b>Tabla 19.</b> Efecto de la asociación de DFUCh-O5 con vancomicina.	<b>72</b>
<b>Tabla 20.</b> Efecto de la asociación de DFUCh-P4 con vancomicina.	<b>73</b>
<b>Tabla 21.</b> Efecto de la asociación de DFUCh-O5 con linezolid	<b>73</b>
<b>Tabla 22.</b> Efecto de la asociación de DFUCh-P4 con linezolid.	<b>74</b>
<b>Tabla 23.</b> Efecto de la asociación de DFUCh-P4 con DFUCh-O5.	<b>75</b>
<b>Tabla 24.</b> Resultados del ensayo de incidencia de mutaciones para los compuestos DFUCh-O5, DFUCh-P4 y vancomicina.	<b>81</b>
<b>Tabla 25.</b> Incidencia de mutación para los compuestos DFUCh-O5, DFUCh-P4.	<b>82</b>
<b>Tabla 26.</b> Incidencia de mutaciones para los compuestos DFUCh-P5 y DFUCh-O4.	<b>84</b>
<b>Tabla 27.</b> Incidencia de mutaciones para los compuestos 4-Br y 2-Cl.	<b>85</b>
<b>Tabla 28.</b> Resultados del ensayo de resistencia pasajes en serie para los compuestos DFUCh-O5, DFUCh-P4, vancomicina y rifampicina.	<b>87</b>
<b>Tabla 29.</b> Susceptibilidad de las generaciones sin exposición previa a tratamiento.	<b>89</b>
<b>Tabla 30.</b> Valores de absorbancias obtenidos en la realización de PAMPA para DFUCh-O5 y DFUCh-P4. (n=4).	<b>95</b>
<b>Tabla 31.</b> Estudio cinético de degradación para DFUCh-O5. (n=4).	<b>95</b>
<b>Tabla 32.</b> Porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 y DFUCh-P4. n =3	<b>98</b>

## RESUMEN

---

En abril del año 2015, la organización mundial de la salud (OMS), presentó un informe que reveló la situación actual en torno a la resistencia a antimicrobianos de 114 países, lo que dejó en evidencia un preocupante escenario: el fenómeno de la resistencia se encuentra diseminado en todo el orbe y está presente en una gran variedad de patógenos responsables de infecciones comunes, tales como: las del tracto urinario, la gonorrea, la diarrea, la neumonía y la sepsis. Dentro de estos agentes se encuentran diversos bacilos Gram negativos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina, siendo estos últimos responsables de enfermedades con altos índices de mortalidad, como son la sepsis y la endocarditis. A este escenario se suma el escaso avance e inversión por parte de las grandes industrias farmacéutica en el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Frente a esto, el año 2010, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) en conjunto a otras entidades, lanzaron el programa “*The 10x’20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020*”, una iniciativa que busca hacer un llamado a los diferentes actores de la salud pública mundial, a incentivar el desarrollo de nuevas entidades moleculares (NEMs) con actividad antimicrobiana para el año 2020. El Laboratorio de Desarrollo de Fármacos de la Universidad de Chile ha trabajado en la desarrollo de compuestos arilmercaptoquinónicos diseñados racionalmente a partir de la estructura de la ubiquinona, buscando intervenir la cadena de transportadora de electrones bacteriana (CTeB). Resultados previos han demostrado que los compuestos obtenidos poseen una interesante actividad sobre bacterias Gram positivas tales como *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* sensible a meticilina y *E. faecalis*. De la serie de compuestos sintetizados destacaron; DFUCh-O5 y DFUCh-P4. En la presente investigación se buscó determinar el potencial de aplicación terapéutica de los derivados sintetizados y con ello discernir cuál es el mejor candidato para poder avanzar a fases preclínicas que consideren la utilización de modelos animales. En primer término, se estudió la toxicidad de los compuestos sobre células humanas y murinas a través del método

de MTT. Además, se determinaron los valores Concentración Inhibitoria Mínima<sub>90</sub> (CIM<sub>90</sub>) y Concentración Bactericida Mínima<sub>90</sub> (CBM<sub>90</sub>) para los derivados en estudio de acuerdo a las normas de CLSI, sobre población de aislamientos clínicos de *S. aureus* y *E. faecium* multirresistentes, obtenidos desde distintos sitios estériles (sangre, huesos, etc.) y diferentes centros hospitalarios de todo Chile durante el año 2014, provistos por el Instituto de Salud Pública de Chile.

Se caracterizó la actividad antibacteriana de los derivados, a través de la cuantificación del efecto post-antibiótico, el estudio de las curvas de muerte de los derivados, el potencial de inducción de mutaciones de los derivados sobre cultivos expuesto en forma aguda y crónica a estos. Por otra parte, se evaluó la actividad de los compuestos en asociación con linezolid, vancomicina y daptomicina, por determinación del índice de CFI (Concentración Fraccionaria Inhibitoria). Adicionalmente, se determinó el porcentaje de unión a albumina de los derivados y se estudió cómo influye esta proteína en la actividad de los compuestos *in vitro*. Por último, se estudió la efectividad *in vivo* utilizando un modelo de infección en larvas de *Galleria mellonella*.

Se evidenció que DFUCh-O5 y DFUCh-P4 no afectan la viabilidad de células mamíferas; HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, a las concentraciones en que son activos como antibacterianos. Los compuestos poseen CIM<sub>90</sub> similar a la exhibida por vancomicina sobre los aislamientos clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina. Frente a los aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina estudiados, DFUCh-P4 resultó 64 veces más activo que vancomicina y DFUCh-O5 128 veces más activo que este fármaco. Los derivados son bactericidas en todos los aislamientos estudiados. En los estudios de cinética de muerte, los compuestos tardaron menos de 2 horas en reducir el 99,9% de la población bacteriana ensayada. Los derivados no tienen efecto post antibiótico significativo sobre las especies *S. aureus* y *Enterococcus* sp. prototipo. Ambos derivados tienen potencial de inducir mutaciones frente a una exposición aguda y crónica en *S. aureus* resistente a meticilina, pero estas mutaciones no se mantienen en las generaciones sucesivas de la población bacteriana. DFUCh-P4 y DFUCh-O5 poseen la misma

efectividad que vancomicina sobre los modelos de infección en *G. mellonella* provocado por *S. aureus* sensible a meticilina o *E. faecalis*.

En este trabajo se demostró, que los derivados poseen potencial terapéuticos como compuestos antibacterianos de uso humano, ya que poseen una alta actividad sobre bacterias Gram positivas multirresistentes y no afectan la viabilidad de células mamíferas.



## ABSTRACT

---

In April 2015, the World Health Organization (WHO) presented a report that revealed the current situation regarding antimicrobial resistance in 114 countries, which revealed a dangerous scenario: the phenomenon of resistance is disseminated throughout the world and is present in a wide variety of pathogens responsible for common infections, such as those of the urinary tract, gonorrhea, diarrhea, pneumonia and sepsis. Among these agents are Gram-negative bacilli, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterococcus* sp. Resistant to vancomycin (ERV), are the last responsible for diseases with high mortality rates, such as child sepsis and endocarditis. Added to this scenario is the scarce advancement and investment by large pharmaceutical companies in the development of new antimicrobials. In response to this, in 2010, the American Society for Infectious Diseases (IDSA), together with other entities, launched the program "The 10x'20 Initiative: Looking for a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020", an initiative that. The Drug Development Laboratory of the University of Chile has worked on the development of new resources for the development of new molecular entities (NEMs) with antimicrobial activity for the year 2020. Arilmercaptoquinonics compounds rationally designed from the structure of ubiquinone, looking to block the bacterial electron transport chain (CTeB). Previous results have shown that the compounds obtained have an interesting activity on Gram-positive bacteria such as *S. aureus* susceptible to methicillin, MRSA and *Enterococcus faecalis*. From the series of synthesized compounds, it highlighted; DFUCh-O5 and DFUCh-P4. In the present investigation, we sought to determine the potential of therapeutic application of the synthesized derivatives and thereby discern which is the best candidate to be able to advance to preclinical phases that consider the use of animal models. First, the toxicity of the compounds was studied on human and murine cells through the MTT method. The values MIC<sub>90</sub> and MBC<sub>90</sub> were determined for the derivatives under study according to CLSI standards, on population of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* multiresistant, isolated from different sterile sites (blood, bones, etc.) and different

hospital centers of Chile during 2014, provided by the Institute of Public Health of Chile.

The antibacterial activity of the derivatives was characterized, through the quantification of the post-antibiotic effect, the studies of the time-kill curves of the derivatives, the potential for the induction of mutations of the derivatives on cultures exposed in acute and chronic form to these. On the other hand, the activity of the compounds in association with linezolid, vancomycin and daptomycin was evaluated by determining the CFI index (Fractional Inhibitory Concentration) In addition, the albumin binding percentage of the derivatives was determined and this protein was studied. in the activity of the compounds in vitro Finally, effectiveness was studied in vivo using a model of infection in larvae of *Galleria mellonella*.

Evidence of DFUCh-O5 and DFUCh-P4 does not affect the viability of mammalian cells; HeLa, SH-SY5Y and H4-II-E-C3, at concentrations that are active as antibacterial drugs. The compounds possess a vancomycin-like activity on the clinical isolates of *S. aureus* resistant to methicillin. Faced with the isolates of vancomycin-resistant *E. faecium* studied, DFUCh-P4 was 64 times more active than vancomycin and DFUCh-O5 was 128 times more active than the drug. The activity exhibited is bactericidal in all isolates studied. In studies of death kinetics, isolation took less than hours to reduce 99.9% of the bacterial population tested. The compounds have no significant post-antibiotic effect on *S. aureus* and *Enterococcus* spp. prototype. Both derivatives have the potential to induce mutations in the face of acute and chronic MRSA exposure, but these mutations are not maintained in successive generations of the bacterial population. DFUCh-P4 and DFUCh-O5 have the same effectiveness than vancomycin on *G. mellonella* model infection by *S. aureus* or *E. faecalis*.

In this study it was demonstrated that the derivatives have therapeutic potential as antibacterial compounds for human use, since they have a high activity on multiresistant Gram positive bacteria and do not affect the viability of mammalian cells.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

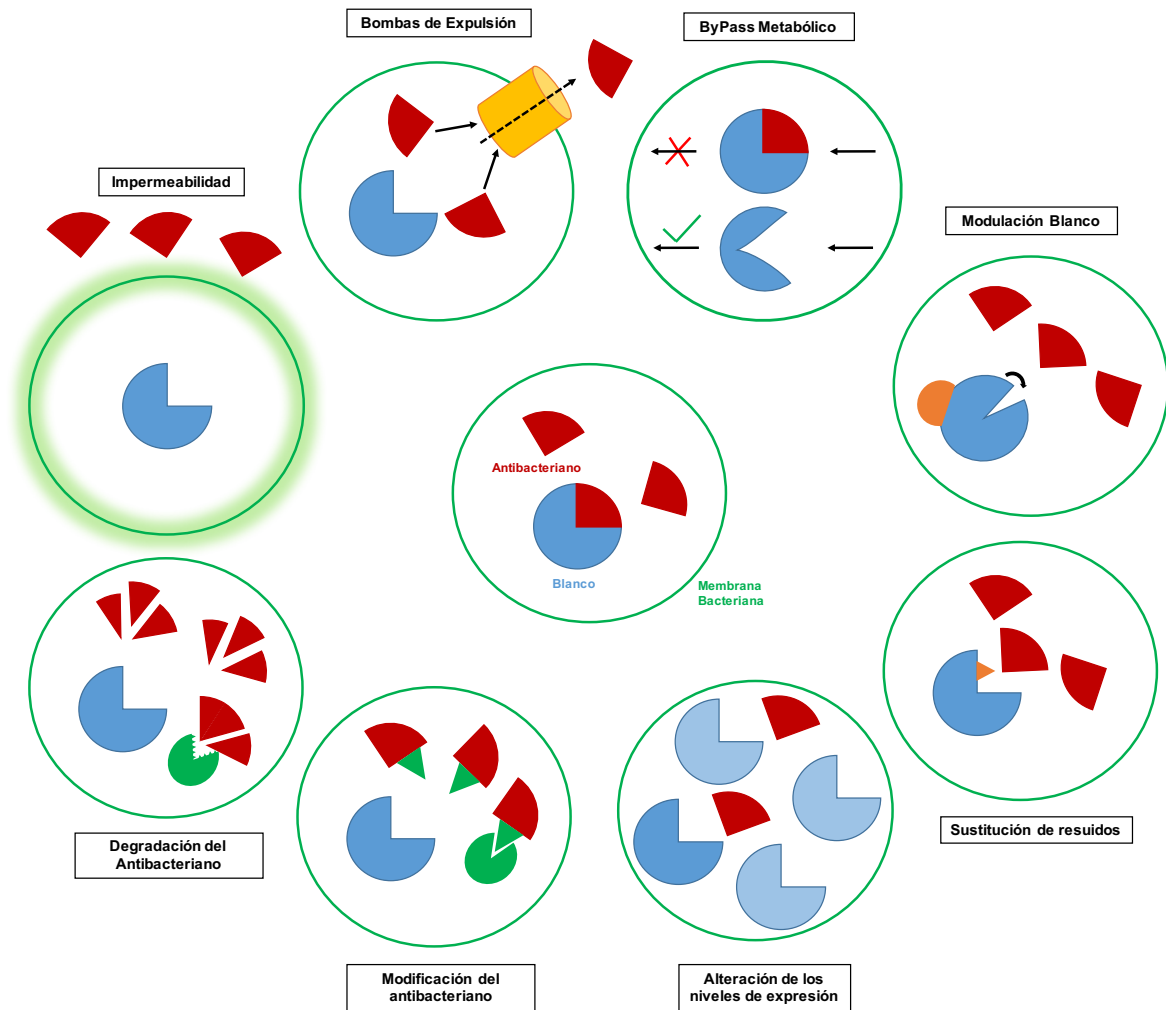
### **Resistencia a antimicrobianos**

Los antimicrobianos son compuestos químicos de origen natural o sintético que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o eliminar microorganismos. Estos compuestos permitieron a la humanidad enfrentar de mejor forma las enfermedades infecciosas, que en el siglo XX fueron la primera causa de muerte a nivel mundial [1], salvando muchas vidas. Sin embargo, al poco tiempo de introducidos a la práctica clínica, se comenzó a observar la emergencia de microorganismos que eran capaces de resistir a su acción, y surge el concepto de resistencia bacteriana. Alexander Fleming, el 26 de junio de 1945, en una entrevista para el *New York Times* señala: “...la mayor posibilidad de daño con la automedicación es el uso de dosis tan pequeñas que, en lugar de eliminar la infección, eduquen a los microbios a resistir a la penicilina. A su vez estos gérmenes pueden ser transmitidos a otros individuos, por estos a otros hasta encontrar un huésped que desarrolle una septicemia o una neumonía que la penicilina no podrá tratar” [2].

La aparición de resistencia a los antimicrobianos se ha asociado a múltiples causas, dentro de las cuáles podemos mencionar: prescripción médica inadecuada (profilaxis, uso en el tratamiento de infecciones virales), uso incorrecto de los antibióticos por parte de los pacientes (terapias incompletas o subdosificaciones), automedicación y el mayor intercambio de comunidades bacterianas (aumento de los viajes intercontinentales), promoviendo la diseminación de genes de resistencia. Por otra parte, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento de los animales de consumo humano (aves de corral, cerdos, etc.), aumenta la posibilidad de selección de cepas resistentes, por exposición prolongada a determinados antimicrobianos [3].

Ahora, ¿de qué forma las bacterias logran evadir la acción de diversos compuestos antimicrobianos?. Esto lo hacen a través de diversos mecanismos de

resistencia [4], los cuales se pueden clasificar en cuatro categorías: 1. Exclusión espacial, 2. Modificación de la estructura del antibacteriano, 3. modificación del blanco y 4. “ByPass” metabólico (**Figura 1**).



**Figura 1.** Mecanismos de resistencia a antibacterianos. Adaptado de Yelin, Idan et al. Antibiotic Resistance [4]

1. **Exclusión Espacial:** impedimento de la acumulación o ingreso del antibacteriano al citoplasma bacteriano, con el objetivo de minimizar la concentración efectiva del antibacteriano, necesaria para generar efectos deletéreos en el patógeno.

- 1.1 Alteración de la Permeabilidad:** Modificación de la estructura del pared o membrana bacteriana, esto por ejemplo a través de cambios de la bicapa lipídica, o cambios en las porinas, que son proteínas transmembrana que permiten el paso de múltiples sustancias. La conformación y/o la expresión de las porinas puede alterarse dificultando o impidiendo el paso de los antibacterianos hacia el espacio periplasmático en bacterias Gram negativas.
- 1.2 Bombas de expulsión:** Este mecanismo consiste en eliminar el antibacteriano desde el medio intracelular bacteriano, siendo efectivo sólo para aquellos antibióticos que se acumulan en gran porcentaje dentro de las bacterias. La expulsión del antimicrobiano es mediada por proteínas ubicadas a lo largo de membrana citoplasmática, que se conectan directamente al medio externo en bacterias Gram positivo o haciendo puente con proteínas de la membrana externa en bacterias Gram negativo [5].
2. **Modificación de la estructura del antimicrobiano:** alteración de la estructura química del compuesto mediante enzimas bacterianas, que afectan su acción antibacteriana.
- 2.1 Reacciones de modificación:** La bacteria secreta enzimas que tiene la capacidad de modificar estructura del antibacteriano.
- 2.2 Hidrólisis:** la estructura química del antibacteriano es hidrolizada por enzimas bacterianas que rompen enlaces esenciales para la actividad antibacteriana de éste.
3. **Modificación del blanco:** corresponde a una estrategia en la que el microorganismo modifica el sitio de acción del antimicrobiano para que no ejerza su acción.
- 3.1 Sustitución de residuos:** El patógeno, a través de mutaciones en el sitio de unión del antibacteriano, altera la secuencia peptídica de esta zona de la proteína. Esto trae como consecuencia una pérdida de la afinidad del antibacteriano por su sitio de acción (sitio blanco).

- 3.2 **Protección del sitio blanco:** Existe un fenómeno de modulación del sitio blanco por interacción proteína-proteína, donde la proteína encargada de conferir resistencia se une directamente a la proteína blanco del antibacteriano y actúa para protegerlo de los efectos deletéreos de éste.
- 3.3 **Alteración del nivel de expresión:** Esta medida utilizada por la bacteria consiste en modificar la abundancia de blancos de acción. Esto puede ser a través de una sobreexpresión de éste o una disminución de los niveles de expresión del blanco de acción.
4. **Bypass metabólico:** este mecanismo de defensa sirve para evitar el efecto tóxico de la interacción del antibacteriano con el blanco de acción, al eludir la necesidad de la reacción enzimática en la que está involucrado el blanco o al cambiar la composición bioquímica y así el metabolismo bacteriano.

### **Situación actual de la resistencia a antibacterianos en el mundo**

En enero de 2014, la organización mundial de la salud (OMS), publicó un informe titulado “Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance”, en el que reveló una preocupante realidad, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno globalizado y constituye una gran amenaza para la salud pública en todo el mundo [6]. La resistencia a la primera línea de tratamiento, para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se extiende a más del 50% de las cepas en algunos entornos. Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) revelados en este informe, cuando se analiza específicamente la resistencia a meticilina por parte de *S. aureus* en 21 países del continente, el 90% de las cepas son resistentes [6]. Esto se traduce en que el paciente infectado con esta bacteria, tiene un 64% más de probabilidades de morir debido al fracaso del tratamiento [6].

En mayo de 2016, el reporte de una “superbacteria” causó alarma mundial, ya que una cepa de *Escherichia coli* que expresaba el gen *mcr-1*, un elemento móvil que codifica una enzima que otorga resistencia a colistín, fue aislada en un paciente de 49 años diagnosticado con una infección del tracto urinario en Pensilvania,

Estados Unidos. Colistín se considera el último recurso terapéutico para infecciones por microorganismos Gram negativo resistentes a múltiples fármacos [7].

En enero de 2018 la Organización Mundial de la Salud (OMS) alertó que siguen aumentado las cifras de resistencia a antibióticos en múltiples infecciones bacterianas, en diversos países. Más de medio millón de personas de 22 países fueron estudiadas por el sistema mundial de vigilancia antimicrobiana de la OMS (GLASS, *por sus siglas en inglés*) [8]. Se estima que en el 2050 hayan 10 millones de muertes por año por infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos, esto según datos de la ONG AMR Review, encabezada por Jim O'Neill, economista británico [9].

Del total de patógenos resistente a antimicrobianos, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, *por sus siglas en inglés*) ha señalado que las bacterias que causan infecciones nosocomiales con mayor frecuencia en los Estados Unidos [10] son: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y varias especies de enterobacterias, a este grupo de bacterias se les denomina: "ESKAPE".

Por otro lado, en febrero del 2017, la OMS elaboró una lista de patógenos prioritarios, compuestos por las 12 especies bacterianas más peligrosas para la salud humana (Tabla 1), con el fin de promover el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antibacteriana sobre estas especies por parte de las compañías farmacéuticas y promover la investigación en este tipo de microorganismos [11].

**Tabla 1.**Listado de patógenos prioritarios para el desarrollo de antibacterianos

Prioridad	Patógenos
<b>Crítica</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos <i>Enterobacteriaceae</i> * sp. Resistente a carbapenémicos y a cefalosporinas de 3ª generación
<b>Alta</b>	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, resistente y con resistencia intermedia a vancomicina <i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina <i>Campylobacter</i> sp. resistente a fluoroquinolonas <i>Salmonella</i> sp. resistente a fluoroquinolonas <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a fluoroquinolonas y a cefalosporinas de 3ª generación
<b>Media</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> no susceptible a penicilina <i>Haemophilus influenzae</i> resistente a ampicilina <i>Shigella</i> sp. resistente a fluoroquinolonas

\* incluye *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp.

Dentro de los múltiples patógenos indicados en esta lista existen dos muy relevantes: *S. aureus* resistente a meticilina, el microorganismo más prevalente en bacteriemias en Estados Unidos, causando cerca de 20.000 muertes el 2008 en ese país [12]; y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, que también es un patógenos relevante, y en Estados Unidos es la segunda causa de infecciones de tracto urinario y la tercera causa de bacteriemia [12].



### **Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM)**

El primer aislamiento de SARM fue descrito en Inglaterra en 1961. Este patógeno corresponde a una cocócea Gram positivo, no móvil, anaerobio facultativo que causa infecciones de contagio comunitario, afectando las fosas nasales, piel, partes blandas, entre otras zonas. Posee un alto grado de virulencia y se asocia a patologías con alto índice de mortalidad [13].

Del año 1990 al 2002, los aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina aumentaron de un 2 a un 43% a nivel mundial [14]. Dentro de este período, en Japón se describe el primer aislamiento de SARM con resistencia intermedia a vancomicina (VISA), siendo este antibiótico la primera línea de tratamiento para infecciones por patógenos Gram positivo [14]. En Taiwán, se reportó que la prevalencia de VISA era sólo del 0,7 % en el 2003, luego la tasa de prevalencia fue del 4,2 % en el 2009. Sin embargo, durante los años 2012 y 2013, los datos obtenidos muestran que la prevalencia de VISA entre los aislados de SARM de sitios anatómicos normalmente estériles se elevó al 10% [15].

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en EE.UU. (NNIS), determinó que la prevalencia de cepas SARM en pacientes hospitalizados en el 2004 alcanzó a un 63%. Al año siguiente, SARM causó más de 94.000 infecciones de las cuales 19.000 resultaron en muerte, la mayoría vinculadas a instituciones de salud. El año 2002 aparece en Estados Unidos el primer *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) [16]. En el mundo durante el año 2014 ya se habían publicado reportes de 15 casos SARV, la mayoría en los Estados Unidos. con 11 casos, dos en India, uno en Irán y otro recientemente en Brasil. En cuanto a las características de las infecciones de SARV, los 11 casos iniciales encontrados en los Estados Unidos. provenían de aislamientos de la piel y tejidos blandos. En este mismo año, la OMS emitió un informe sobre la vigilancia mundial de la resistencia a los antimicrobianos, en donde se pone de manifiesto la resistencia a los fármacos de primera elección para el tratamiento de infecciones de gravedad causadas por *S. aureus* [17].

Una de las infecciones más recurrentes de *S. aureus* es la bacteriemia. Se considera bacteriemia nosocomial a aquella que se diagnostica pasadas las primeras 48 horas del ingreso del paciente al recinto hospitalario, las que se relacionan a tratamientos intravenosos o hemodiálisis [18]. En la actualidad, del total de bacteriemias nosocomiales, se calcula que entre un 15 a un 30% tienen relación con el uso de dispositivos intravenosos. En determinadas unidades de hospitalización, como las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), este tipo de infección se ha relacionado con una elevada morbilidad, mortalidad y gasto sanitario [19].

En Chile, el Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana (GCRB) dependiente de la Sociedad Chilena de Infectología, reportó la susceptibilidad *in vitro* acumulada al año 2012 de 28 hospitales complejos, indicando que número de *S. aureus* resistentes a meticilina alcanza un 50%, del total de patógenos aislados de esta especie. En el año 2012 el Complejo Asistencial Barros Luco Trudeau, llevó a cabo un estudio sobre la incidencia y mortalidad por bacteriemias, el resultado evidencia que la mortalidad por bacteriemias adquiridas en la comunidad es del 10 al 13% y nosocomial del 23 al 30% [20]. Los antibióticos utilizados para tratar infecciones por *S. aureus* multiresistentes incluyen a vancomicina, linezolid y daptomicina [21]. Cifuentes y col. informan un 100% de susceptibilidad a vancomicina en aislamientos del 2012 [22]; sin embargo, en el año 2015 Vega y col. informan un aislamiento con hetero-resistencia vancomicina (SAIVh) [23], lo que representa un leve aumento de la CIM de vancomicina ( $< 2 \mu\text{g/mL}$ ) [24]. Esta alteración de la susceptibilidad probablemente se debe a un alteración de la estructura de la bacteria que impide el ingreso de vancomicina [24].

El aumento de aislamientos de *S. aureus* con resistencia a vancomicina se debe a tratamientos prolongados con vancomicina, infecciones que deben ser tratadas mediante uso de catéteres vasculares. El aislamiento publicado por Vega y col. fue encontrado en una paciente con catéter venoso central de hemodiálisis y que había recibido tratamiento con vancomicina previamente. Además de estas prácticas se debe mencionar que en el 2002 se demostró el traspaso de genes *vanA* (que produce resistencia a vancomicina y teicoplanina), y el *vanB* (resistente sólo a

vancomicina) *in vivo* de *Enterococcus* sp. a *S. aureus*, confiriéndole resistencia a vancomicina [17, 25].

### ***Enterococcus* sp. resistente a vancomicina**

Este patógeno es una cocácea Gram positivo, catalasa negativo, no formadora de esporas y anaerobio facultativo, que es responsable de infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales y pélvicas entre otras. El primer aislamiento de VRE, fue descrito en 1986 en Francia e Inglaterra y un año después se reporta el primer caso de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (ERV) en los Estados Unidos [26].

El uso de antibióticos en la ganadería como factor de crecimiento, promovió la aparición de ERV en vacas, ovejas, cerdos, caballos, gallinas, entre otros animales, destinados al consumo humano, facilitando su transmisión desde los animales a la comunidad [26].

En el año 2008 el sistema de vigilancia Europeo (EARS), reportó que la prevalencia de ERV en Inglaterra, Grecia e Irlanda era de un 28, 28 y 35%, respectivamente [27].

En Estados Unidos el porcentaje de aislamientos de *Enterococcus* sp. Con resistencia a vancomicina aumentó de 0,4 a 26% entre 1989 y 1999. Las infecciones por ERV eran intratables hasta la introducción de quinupristina/dalfopristina, pero ya a principios de 2010 se detectaron aislamientos resistentes a estos fármacos. La prevalencia de las infecciones intrahospitalarias por *Enterococcus* sp. aumentó en los últimos años, lo que se relaciona con la resistencia intrínseca a cefalosporinas y aminoglucósidos, y a una resistencia adquirida a vancomicina [26].

Entre los años 1996 y 2010 se estudiaron 1873 aislamientos de *Enterococcus* sp. resistentes en pacientes con infecciones intrahospitalarias, internados en un hospital universitario de la ciudad de Buenos Aires. El 64,2% y el 30,4% de los aislamientos correspondieron a *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. En el período estudiado, las infecciones por *Enterococcus* sp.

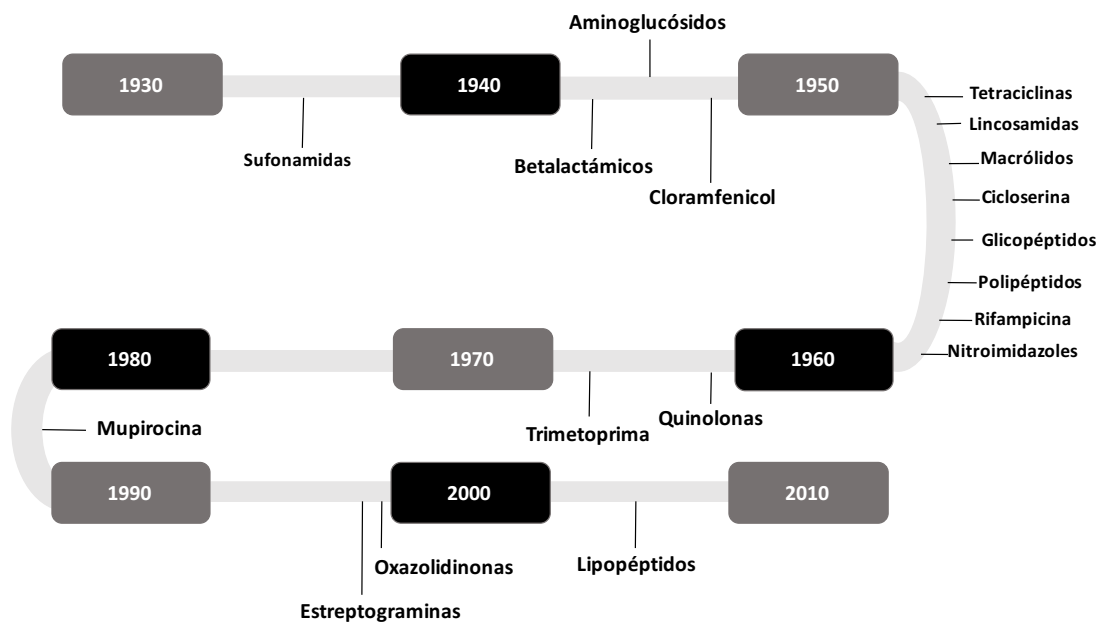
representaron entre el 8% y el 10% del total de las infecciones nosocomiales. La prevalencia de *E. faecium* aumentó de un 1,5% en el año 1996 a un 4% en 2010. El primer aislamiento resistente a vancomicina se detectó en el año 1998 y correspondió a un *E. faecium* y en el año 2004 se informó en *E. faecalis*. Actualmente, más del 70% de los aislamientos de *E. faecium* son resistentes a vancomicina en Argentina [28].

En un estudio de susceptibilidad realizado en Chile en 2012, se informó que de 1712 aislamientos clínicos de *E. faecium* en población adulta, el 76% presentó resistencia a vancomicina, y en el 2014 ésta se acrecentó hasta llegar al 100%. Esta resistencia es producto de genes que codifican un precursor alternativo de la pared celular, que no permite o reduce la unión de la vancomicina. También la bacteria puede eliminar los precursores de la pared a los que se une vancomicina. Los aislamientos resistentes a vancomicina, poseen una clasificación que considera el nivel de resistencia a vancomicina, susceptibilidad a teicoplanina y capacidad de inducción de la resistencia expuestos a vancomicina. Los fenotipos más frecuentes son el VanA y el VanB [17, 29]. El subtipo de *Enterococcus* sp. que presenta la resistencia suele ser mayoritariamente *E. faecium* con predominio del fenotipo VanA y en menor medida VanB, que también se asocian a resistencia a ampicilina. Por lo general, este tipo de aislamientos son resistentes a otros antibacterianos como eritromicina, tetraciclinas, fluoroquinolonas y rifampicina [29]. Por otro lado, un factor que contribuye a la resistencia antibiótica, es la capacidad de *Enterococcus* sp. de generar biopelículas (*biofilms*), que consiste en una población de células unidas de forma irreversible en diversas superficies bióticas y abióticas [30]. La formación de la biopelícula proporciona a los *Enterococcus* sp. resistencia a los antibióticos. En un estudio realizado el 2015, se pudo evidenciar que los biofilms con más de 120 horas de incubación (denominados maduros), sólo podrían ser erradicados con altas concentraciones de antibióticos como; rifampicina, tigeciclina, ciprofloxacino y daptomicina [31]. Se ha demostrado que las infecciones en donde se generan biofilm maduros disminuye el éxito del tratamiento antibiótico [31].

## Desarrollo de nuevos antimicrobianos

El primer antibacteriano para uso clínico, la penicilina, fue descubierto en 1928 y con su introducción al arsenal terapéutico en 1943 comenzó una nueva etapa en la medicina moderna, ya que por primera vez en la historia era posible tratar las enfermedades infecciosas masivamente. Esto significó un aumento en la esperanza de vida en todo el mundo. Por este descubrimiento, Alexander Fleming fue galardonado en 1945 con el Premio Nobel de Medicina [32].

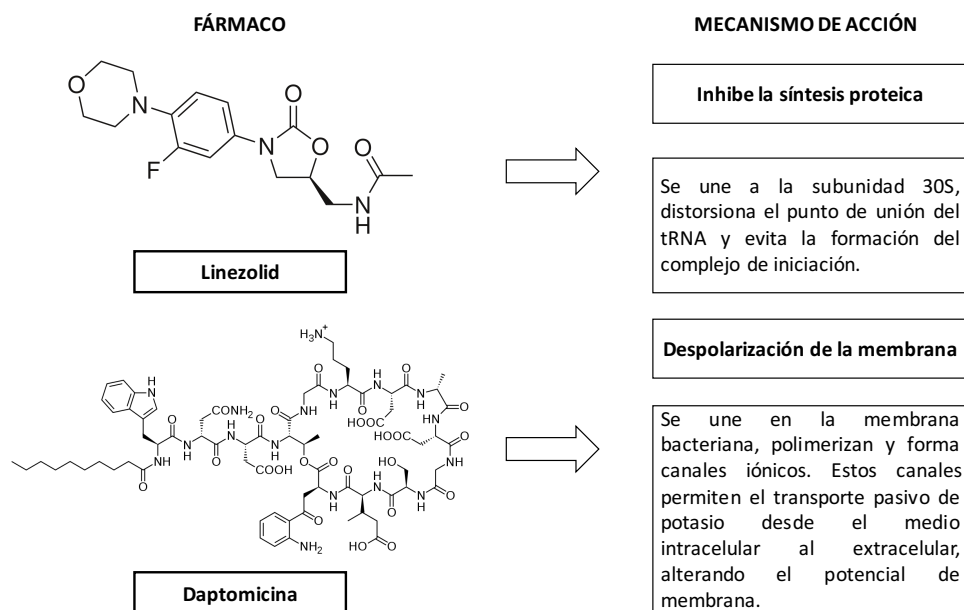
Después de este hito, llegó una fructífera era en la que se descubrieron múltiples antibacterianos. Algunos autores llaman a este período la "edad dorada de los antibióticos" por la introducción de más de 10 familias de drogas en menos de 30 años (Figura 2) [33].



**Figura 2.** Cronología de introducción de familias de antibacterianos a la práctica clínica.

Después de este prolífico período, a partir de 1970, sólo se han introducido 4 nuevas clases de antibacterianos en el arsenal terapéutico: mupirocinas, estreptograminas, oxazolidinonas y lipopéptidos [33]. En 1978 se descubrió linezolid, el primer miembro de la familia de las oxazolidinonas. Es compuesto fue aprobado por la FDA recién en el año 2000. En 1987 se descubrió el primer

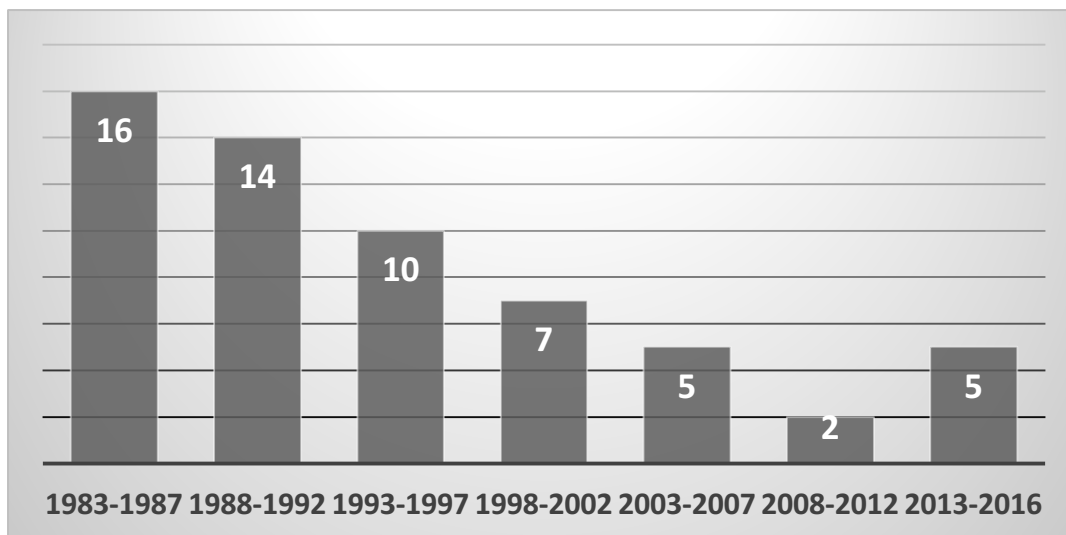
lipopéptido, la daptomicina, y se introdujo en el mercado en 2003. Ambos compuestos corresponden a nuevas entidades moleculares (NEM), ya que tienen un nuevo mecanismo de acción y no están relacionados con ningún fármaco predecesor (Figura 3).



**Figura 3.** Representantes de las últimas nuevas familias de antibacterianos introducidos.

Después de la introducción de daptomicina, no hubo grandes avances en la innovación, ya que una nueva clase de antibióticos no ha sido aprobada hasta la fecha [34].

Al analizar antibacterianos aprobados de cualquier clase desde 1983 en adelante, se puede observar una disminución drástica en el número de aprobaciones en las últimas décadas (Figura 4). Actualmente, podemos ver que el número de aprobaciones ha disminuido en un 90% en los últimos 30 años (32).



**Figura 4** Introducción de nuevos fármacos antibacterianos al mercado.

Cabe preguntarse *¿Por qué el desarrollo de agentes antibacterianos ha disminuido tan drásticamente, a pesar de las alarmantes cifras de resistencia a estos fármacos?*

El declive en la investigación en nuevos fármacos antibacterianos, por parte de las grandes industrias farmacéuticas puede explicarse por varios factores. *Spellberg y col. dicen: "... los antibióticos son terapias cortas que no duran más de dos semanas ...", "... en contraste, las enfermedades crónicas se tratan con terapias no curativas que sólo suprimen los síntomas y deben ser administrados de por vida "*, esto significa que los antibióticos tienen una tasa de retorno de la inversión más baja que otras drogas [35]. Otros autores adhieren a esta idea y señalan que los ingresos generados por los medicamentos antibacterianos son limitados y el retorno de la inversión es bajo en comparación con otras áreas terapéuticas [36]; Un ejemplo de esto es Teflaro® (ceftaroline fosamil), un derivado de cefalosporinas de administración intravenosa, indicado para el tratamiento de la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad, tuvo ventas de aproximadamente \$ 50.000.000 dólares en dos años, después de su lanzamiento. Esta cifra es mucho menor que la recaudada por Januvia® (sitagliptina, fármaco oral indicado para el tratamiento de la diabetes tipo II) [37] o Lyrica® (pregabalina, fármaco oral indicado para el tratamiento del dolor neuropático y epilepsia) [38], ambos generan ingresos superiores a los 1.500.000.000 dólares al segundo año de su introducción [39].

Otros factores, que han contribuido notablemente al estancamiento en el desarrollo de agentes antibacterianos, la rápida aparición de resistencia en un corto periodo luego introducción de estos al mercado o incluso durante el desarrollo de estos fármacos. El primer caso, fue informado por Fleming al comienzo del uso de la penicilina. Más recientemente, en el año 2000, meses antes de la introducción al mercado de linezolid, se informaron los primeros casos de resistencia en *E. faecium* en los Estados Unidos [40]. Poco después, en 2001, se publicaron los primeros casos clínicos de *E. faecium* [41, 42] y *S. aureus* resistente a linezolid [43]. Linezolid fue descubierto en 1978 y tomó hasta el año 2000 para ser introducido, y en menos de un año, especies resistentes a este fármaco fueron aisladas. La Tabla 2 muestra la secuencia del tiempo entre la introducción de un medicamento en el mercado y el primer informe de una cepa bacteriana resistente.

**Tabla 2.** Cronología de introducción de antibacterianos al mercado v/s primer reporte de resistencia

Introducción al mercado		Reporte de Resistencia	
Año	Fármaco	Año	Especie
1940	Penicilina	1943	<i>S. aureus</i> resistente a penicilina
1959	Polimixina E	2016	<i>E. coli</i> resistente a polimixina E
1960	Meticilina	1962	<i>S. aureus</i> resistente a metilina
1967	Gentamicina	1979	<i>Enterococcus</i> sp. resistente a gentamicina
1972	Vancomicina	1988	<i>Enterococcus</i> sp. resistente a vancomicina
1996	Levofloxacino	1996	<i>S. pneumoniae</i> resistente a levofloxacino
2000	Linezolid	2001	<i>S. aureus</i> resistente a linezolid
2003	Daptomicina	2005	<i>S. aureus</i> no susceptible a daptomicina

El caso de linezolid no es un hecho aislado; daptomicina y ceftarolina, recientemente introducidas, tuvieron un destino similar a linezolid [44].

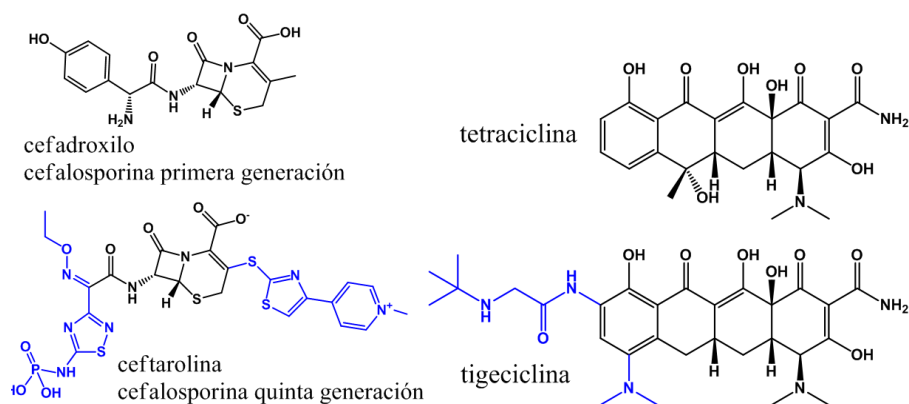
Otro factor que influye en el bajo desarrollo de agentes antibacterianos es lo sucedido con trovafloxacina, temafloxacina y telitromicina, aprobados entre 1990 y principios de 2000, que después de años de desarrollo fueron retirados del mercado debido a numerosos informes de reacciones adversas graves. Trovafloxacina, por ejemplo, demostró equivalencia o superioridad en múltiples indicaciones frente a



sus competidores en estudios clínicos en 7000 pacientes; sin embargo, durante su comercialización se observó un alto grado de hepatotoxicidad en los pacientes [45].

De esta manera, el escenario para la inversión en el desarrollo de medicamentos antibacterianos no es muy favorable; tres factores están conjugados: 1) bajo y lento retorno de la inversión, 2) selección rápida de especies resistentes a los medicamentos en desarrollo, y 3) historial reciente de retirada del producto debido a la frecuente aparición de reacciones adversas graves después de la introducción en el mercado.

Todo este desfavorable escenario se ve empeorado ya que el enfoque central de la investigación actual en torno al desarrollo de antimicrobianos, se centra en modificar estructuralmente compuestos ya conocidos, e introducidos al mercado, buscando mejorar su actividad o sus propiedades farmacocinéticas intentando, por ejemplo, mejorar su distribución a sitios de difícil acceso. Claro son los ejemplos de este tipo de estrategia; como tigeciclina en el 2006, un análogo estructural a las tetraciclina, y ceftarolina en el año 2011 de la familia a de las cefalosporinas (Figura 5).



**Figura 5.** Modificaciones estructurales a antibacterianos ya existentes.

Esto trae el potencial riesgo de que para estos nuevos antimicrobianos se desarrolle resistencia rápidamente, ya que siguen actuando sobre los mismo blancos susceptibles a mutación [46]. Otra estrategia ha sido la búsqueda de inhibidores de los mecanismos de resistencia bacterianos [46].

Al analizar las estrategias de desarrollo de antibacterianos en los últimos 10 años, por parte de la industria farmacéutica, podemos ver que en el periodo 2006-2017 se mantiene la tendencia de desarrollar antibióticos que son derivados de sus antecesores (Tabla 3).

Al revisar los fármacos antibacterianos que están en investigación clínica en fases avanzadas (II y III). Podemos observar que el 68% de los agentes antibacterianos encontrados en las fases clínicas II y III siguen esta estrategia, y sólo el 32% restante son compuestos que tienen un nuevo mecanismo de acción (Tabla 3).

**Tabla 3.** Introducción de Antibacterianos en la última década

Año	Nombre Comercial	Principio Activo	Indicación aprobada por la FDA
2017	Vabomere®	meropenem - vaborbactam	Infecciones del tracto urinario complicadas
	Baxdela®	delafloxacin	Infecciones bacterianas agudas de la piel
<b>2016 Sin aprobaciones</b>			
2015	Avycaz®	ceftazidima - avibactam	Infecciones intraabdominales complicadas en combinación con metronidazol, infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis, neumonía nosocomial.
	Zerbaxa®	ceftolozano - tazobactam	Infecciones intraabdominales complicadas en combinación con metronidazol, infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis,
2014	Orbactiv®	oritavancina	Infecciones de la piel
	Sivextro®	tedizolid fosfate	Infecciones de la piel
	Dalvance®	dalbavancina	Infecciones de la piel
<b>2013 Sin aprobaciones</b>			
<b>2012 Sin aprobaciones</b>			
2011	Dificid®	fidaxomicina	Diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i>
2010	Zinforo®	ceftarolina fosamil	Infecciones de piel y partes blandas complicadas y neumonía adquirida en la comunidad
2009	Vibativ®	telavancina	Infecciones de la piel y estructuras de la piel complicadas
<b>2008 Sin aprobaciones</b>			
2007	Doribax®	doripenem	Infecciones intraabdominales complicadas en combinación con metronidazol, infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis, neumonía nosocomial.

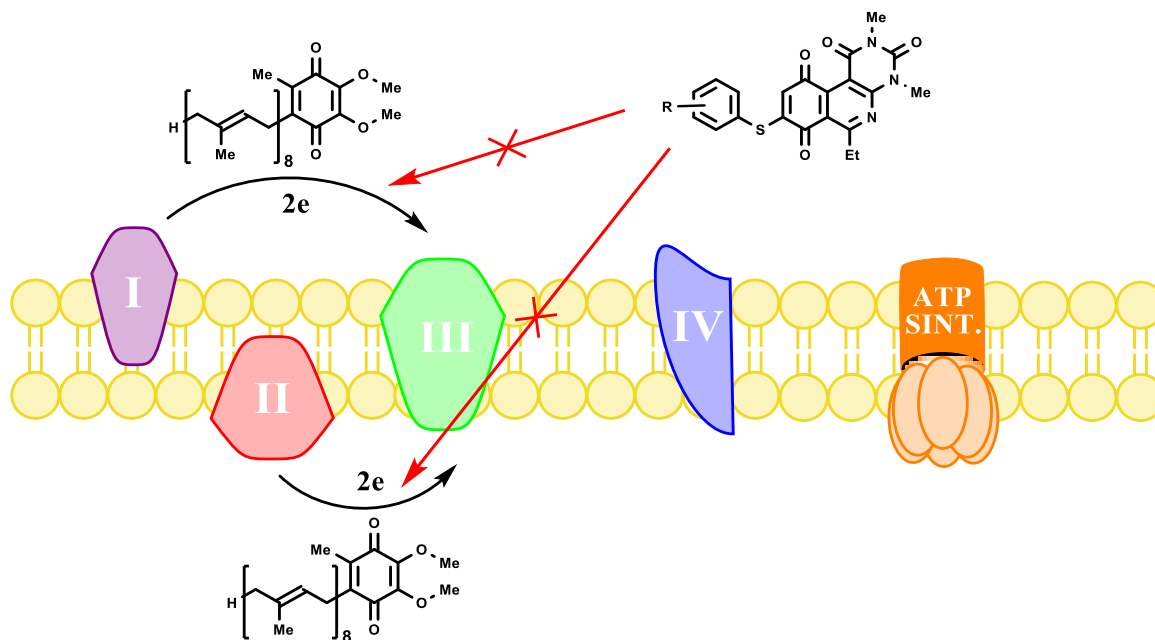
\*Tabla extraída de Campanini-Salinas y col. J, Current Topics in Medicinal Chemistry (2018) 18: 1188.

De acuerdo a los antecedentes presentados, este estudio pretende avanzar en el desarrollo de compuestos antibacterianos, con una diversidad estructural con respecto a sus antecesores y que ataquen nuevos blancos, diferentes a los que actualmente se encuentran dirigidos los antibióticos presentes en el mercado, es una urgente necesidad y un desafío que queremos enfrentar.

### **Una nueva familia de antibacterianos**

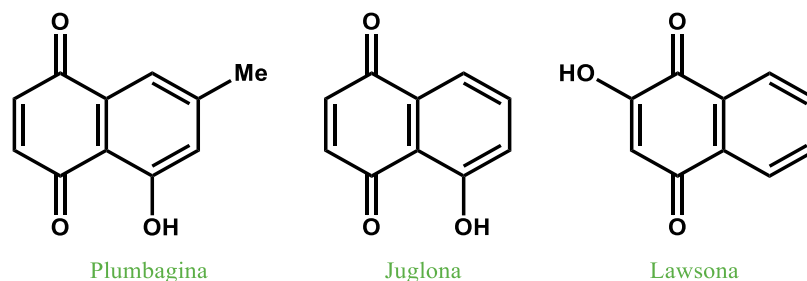
Un nuevo fármaco antibacteriano debe ir dirigido a blancos que estén presentes en múltiples tipos bacterianos, que sean esenciales para la supervivencia bacteriana y que sean evolutivamente conservados. Al respecto, la Cadena Transportadora de electrones Bacteriana (CTeB) cumple con estas características. Ubicada en la membrana, es un importante sistema productor de energía para las bacterias a través de la fosforilación oxidativa [47]. La CTeB está constituida por 4 complejos y la ATP Sintetasa. El Complejo I (NADH - ubiquinona reductasa) es donde ingresan la mayor cantidad de electrones a la CTeB, los que son transferidos desde el NADH<sub>2</sub> a la ubiquinona (UbQ) a través del FMN (flavín mononucleótido) que es constituyente de este complejo. El complejo II (succinato deshidrogenasa) es otro punto de entrada de electrones a la cadena y en su transferencia entre el FAD y la UbQ no libera la energía suficiente para bombear protones. Debido a esto se establece una diferencia entre los 2 complejos, ya que al comenzar por FAD se genera una molécula ATP menos respecto a cuándo se comienza por el NAD. El complejo III (UbQ - citocromo C reductasa) recibe electrones de los Complejos I y II. A partir de este paso se transportan electrones y se liberan los protones. En tanto, el Complejo IV (citocromo oxidasa) cataliza la formación de H<sub>2</sub>O a partir de los 2e<sup>-</sup>, ½ O y 2H<sup>+</sup>. Este complejo contribuye con la generación de un gradiente de protones suficiente para generar 1 molécula de ATP. El Complejo V también llamado ATP sintetasa se divide en 2 partes: el canal protónico y el conjunto de subunidades catalíticas de la ATP sintetasa, que permiten sintetizar a partir de ADP y fósforo el ATP [48].

La UbQ juega un rol esencial en el transporte de los electrones del complejo I al III y del II al III, por lo que proponemos que análogos estructurales de este compuesto, podrían intervenir en el flujo de electrones, impidiendo generar la gradiente electroquímica necesaria para que la ATP sintetasa sintetice ATP (Figura 6).



**Figura 6.** Inhibición del traspaso de electrones mediado por ubiquinona (coenzima Q), en CTeB.

Los compuestos quinónicos resultan excelentes candidatos para poder realizar esta intervención. El núcleo 1,4-naftoquinona, se encuentra presente en muchos productos naturales con una amplia variedad de actividades biológicas que van desde propiedades antitumorales [49, 50], antiproliferativas [51], antimicrobacteriales [52], antileishmanias [53], antimaláricas [52], antiplaquetarias [54-57], hasta incluso propiedades antiinflamatorias [58-61]. La plumbagina, juglona y lawsona (Figura 7). son compuestos quinónicos de origen natural que tiene propiedades antibacterianas contra varias especies de microorganismos aerobios y anaerobios [62]

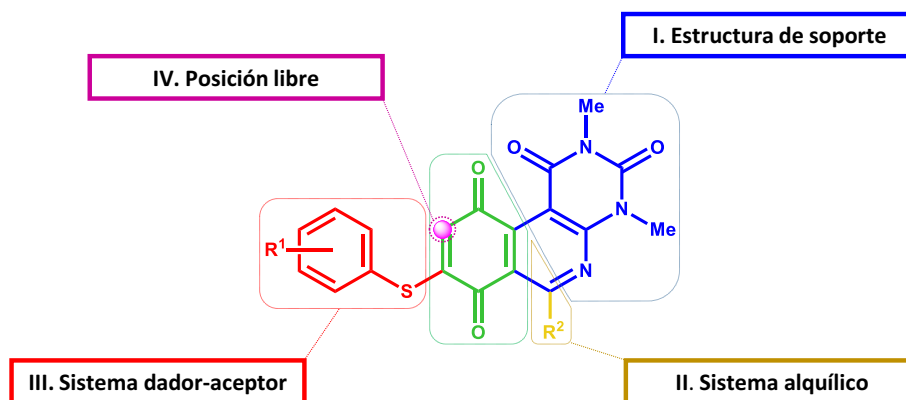


**Figura 7.** Estructura de compuestos naftoquinónicos con actividad antibacteriana.

Sin embargo, respecto del uso de sustancias naturales bioactivas según señalan *Drlica y Perlin* en su libro *'Antibiotic Resistance'*: "Cualquier antibiótico derivado de una fuente natural, o sobre la base de un mecanismo de acción de antibiótico natural, es un antibiótico para el que la resistencia ya está presente en la naturaleza" [46].

Dado lo anterior, se diseñó una serie de NEMs, con requerimientos estructurales relacionados al mecanismo de acción objetivo (Figura 8):

- I. Estructura de soporte:** Confiere estabilidad química.
- II. Sistema dador-aceptor:** Conectado directamente a la quinona y permite la incorporación de grupos electro-aceptores y dadores que modulen la electroafinidad de la quinona.
- III. Sistema alquílico:** Permite modular la lipofilia.
- IV. Posición libre:** Posición susceptible al ataque de sustituyentes nucleofílicos que permitieran la alquilación de componentes vitales para la bacteria.

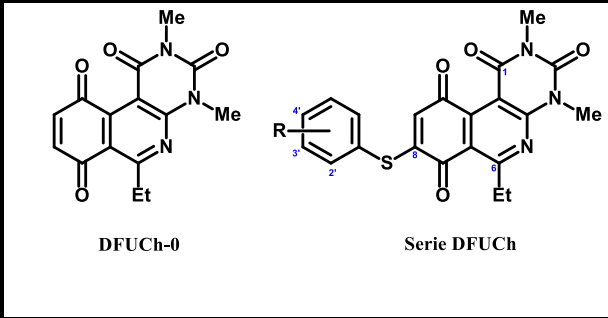


**Figura 8.** Diseño de la entidad molecular base quinónica.

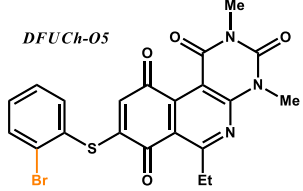
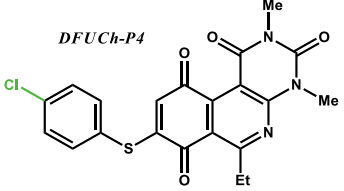
En el Laboratorio Desarrollo de Fármacos de la Universidad de Chile, se diseñaron, sintetizaron, caracterizaron y evaluaron biológicamente 17 compuestos estructuralmente relacionados (Tabla 4), con el objeto de establecer una relación estructura-actividad.

En la exploración de la actividad antibacteriana se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM). Los resultados mostraron que los compuestos sintetizados poseen actividad sobre bacterias Gram positivo, específicamente, *S. aureus* sensible a meticilina, SARM, *E. faecium* y *E. faecalis* con CIMs que van desde 32 a 1 µg/mL. No se observó actividad sobre bacterias Gram negativo. Mediante el análisis de los resultados, se pudo establecer que existe una estrecha correlación entre la estructura química y la actividad antibacteriana, la cual está modulada principalmente por 2 descriptores: la lipofilia y el potencial redox. Las moléculas con mejor perfil de actividad fueron DFUCh-O5 y DFUCh-P4 (Tabla 5), que exhibieron las CIMs más bajas dentro de la serie sobre especies Gram positivo como *S. aureus* resistente a meticilina.

**Tabla 4.** Esquema serie de compuestos sintetizados

	
Sigla	R
DFUCh-0	-
DFUCh-00	H
DFUCh-O1	2' -Me
DFUCh-O2	2' -OMe
DFUCh-O3	2' -F
DFUCh-O4	2' -Cl
DFUCh-O5	2' -Br
DFUCh-M1	3' -Me
DFUCh-M2	3' -OMe
DFUCh-M3	3' -F
DFUCh-M4	3' -Cl
DFUCh-M5	3' -Br
DFUCh-P1	4' -Me
DFUCh-P2	4' -OMe
DFUCh-P3	4' -F
DFUCh-P4	4' -Cl
DFUCh-P5	4' -Br

**Tabla 5.** CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

					
SIGLA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensible	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	ATCC® 43300	ATCC® 29213	ATCC® 29212	ATCC® 25922	ATCC® 27853
<b>DFUCh-O5</b>	1	4	2	$\geq 32$	$\geq 32$
<b>DFUCh-P4</b>	4	4	4	$\geq 32$	$\geq 32$

Considerando el desarrollo actual de esta serie de compuestos, y su potencial uso como agentes antibacterianos, es fundamental para escalar a modelos murinos de infección, estudiar las propiedades farmacológicas de los compuestos líderes mediante 3 ejes centrales: el estudio de la toxicidad *in vitro* sobre distintas líneas celulares, la caracterización *in vitro* de la actividad antibacteriana y la efectividad de su aplicación en un modelo de infección *in vivo*.

Para esto, en primer término se evaluó la toxicidad de estos compuestos. Para esto se utilizó el ensayo de viabilidad celular con una sal de tetrazolio (MTS), que consistió en determinar la actividad mitocondrial de las células mamíferas viables frente a una exposición aguda (24 h) al compuesto en estudio.

Luego se caracterizó la actividad antibacteriana de los derivados en estudio. Para esto se determinó la Concentración Bactericida Mínima (CBM), se estableció la cinética de muerte de distintas bacterias con los derivados y se estudió el Efecto Post-Antibiótico (EPA). Estos ensayos permiten dilucidar el modo de acción de los antibacterianos y también permiten establecer los intervalos de dosificación que se deben utilizar para maximizar su efecto. También se estableció como influye la presencia de albumina o suero humano en la actividad de los compuestos, lo que representa una medida de la actividad del compuesto en condiciones fisiológicas. Se evaluó también la incidencia de resistencia de cepas Gram positivo frente a la exposición aguda y crónica al compuesto en estudio, lo que es fundamental para



proyectar la utilización de estos compuestos en escenarios clínicos. Buscamos determinar combinaciones de nuestros derivados con antibacterianos de uso clínico que puedan generar sinergia en su acción conjunta. Estudiamos el perfil de susceptibilidad mediante la determinación de la CIM<sub>90</sub> sobre especies Gram positivo aisladas de diversos centros hospitalarios del país, estableciendo el perfil de susceptibilidad de una población bacteriana heterogénea a los derivados.

Por otra parte, se estudiaron características farmacocinéticas; la permeabilidad *in vitro* mediante el ensayo PAMPA (del inglés Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), para establecer el grado de penetración del compuesto en monocapa lipídica. Se determinó el porcentaje de unión a albumina, mediante el ensayo de “Diálisis al equilibrio”. Los datos aquí obtenidos se pueden correlacionar con los resultados del ensayo que buscará determinar la influencia de la albumina y el suero humano en la actividad antibacteriana de los compuestos.

Finalmente, se estudió la efectividad *in vivo* de los derivados. Los modelos murinos de infección son los más utilizado; sin embargo, existen obstáculos éticos, presupuestarios y logísticos asociados con el uso de roedores como modelos de infección. En primer lugar, mantener un número suficiente de ratones necesarios para obtener datos estadísticamente relevantes es costoso. En segundo lugar, los mamíferos demoran en reproducirse lo que hace más lento el progreso de la experimentación [63].

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

---

### (I)

Los derivados quinónicos DFUCH-O5 y DFUCH-P4 presentan actividad bactericida *in vitro* sobre aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Enterococcus* sp. multirresistentes, provenientes de diferentes centros hospitalarios de Chile. Su unión a proteínas plasmáticas reduce la concentración de compuesto libre disminuyendo su actividad y el uso en conjunto con antibióticos de uso clínico genera sinergia.

### (II)

A las concentraciones que muestran actividad antibacteriana los derivados quinónicos no afectan la viabilidad de células humanas y animales.

### (III)

Los compuestos son equi-efectivos con vancomicina en un modelo de infección en *Galleria mellonella*.

## 3. OBJETIVO GENERAL

---

Evaluar *in vitro* las propiedades farmacodinámicas de los derivados quinónicos DFUCH-O5 y DFUCH-P4 sobre aislamientos clínicos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*, evaluar su toxicidad sobre líneas celulares mamíferas, y estudiar la efectividad *in vivo* sobre un modelo de infección de *Galleria melonella*.

#### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

##### I. Determinar la toxicidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

- a. Evaluar la viabilidad celular post exposición de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre células HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3.

##### II. Caracterizar *in vitro* de la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV.

- a. Establecer la susceptibilidad de aislamientos clínicos multirresistentes de *S. aureus* y *E. faecium* a DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
- b. Determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
- c. Determinar el efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 en cepas clínicas de *S. aureus* y *E. faecium*.
- d. Determinar cómo influye la presencia de suero humano y proteínas plasmática en la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
- e. Estudiar la sinergia en la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 con vancomicina, linezolid y daptomicina.
- f. Determinar el índice de mutaciones espontáneas de *S. aureus* multirresistentes frente a una exposición aguda a DFUCh-P4 y DFUCh-O5.
- g. Explorar la potencial inducción de mutaciones de *S. aureus* frente a una exposición crónica a DFUCh-P4 y DFUCh-O5.
- h. Determinación de la cinética de muerte, de cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* frente a DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

##### III. Determinar propiedades farmacocinética de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

- a. Estudio *in vitro* de permeabilidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre membranas lipídicas.
- b. Determinar el porcentaje de unión a albumina de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

##### IV. Estudio de la efectividad *in vivo* de DFUCh-O5 y DFUCh-P4

- a. Evaluar la sobrevivencia post-exposición de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 en un modelo de infección *in vivo* en larvas de *G. mellonella*.

## 5. MATERIALES Y METODOS

---

**1. Aislamientos bacterianos.** Se incluyeron 89 aislamientos clínicos de cocáceas Gram positivas aislados en centros hospitalarios chilenos durante el año 2014. Todas las cepas fueron proporcionadas por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) a través de un convenio de colaboración (N° 156-2014). Los aislamientos utilizados fueron *S. aureus resistentes a meticilina* (45 cepas) y *E. faecium resistentes a vancomicina* (44 cepas) que cumplieran con un perfil de multi-resistencia, definido por aquellos aislamientos que presentaran resistencia a otras tres familias adicionales de agentes antibacterianos[64]. Los sitios de origen de aislamiento de las cepas estudiadas fueron aspirado traqueal, herida y sangre para *S. aureus*, en tanto los sitios para *Enterococcus* sp. fueron orina, líquido peritoneal, sangre y herida.

Los aislamientos se conservaban en cepario en un mezcla 50% v/v de glicerol (Ensure®, Merck, Darmstadt, Germany Lot N° Z0313094 406) y caldo de cultivo Brain Heart Infusion (AesLaboratoire, Ker Lann – Bruz, France) a -20°C). Para utilizarlos se sembraban en placas de agar Mueller-Hinton I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N°BCBG4771V) se cultivaran a 37 °C por 20-24 horas. Como cepas control se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 sensible a meticilina, *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300 resistente a meticilina y *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212.

**2. Determinación de la viabilidad celular mediante el método de MTS.** Se utilizaron placas estériles de cultivo de 96 pocillos (TrueLine™). Para células HeLa, SH-SY5Y, H4-II-E-C3 se sembraron 10000 células por pocillo en medio de cultivo DMEM (Gibco®). suplementado con Suero Fetal bovino(Sigma Aldrich®, St. Louis, USA.) y Estreptomina (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA). Una vez sembradas, se dejaron crecer y adherirse durante 24 h en una estufa de cultivo a 37°C, y se sometieron a los tratamientos por otras 24 h. Las células se expusieron a distintas concentraciones de los compuestos a ensayar. Las concentraciones finales en cultivo fueron para DFUCh-O5; 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/mL y para DFUCh-P4; 16, 8, 4, 2

y 1 µg/mL, fueron ensayadas cada una en sextuplicado. Una vez terminado el tratamiento, se aspiró el medio de cultivo mediante vacío y se restituyó con medio de cultivo, luego se adicionaron, protegiendo de la luz, 100 µL de una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) 1 mg/mL + DNB durante un período de 2 h a 37 °C, tiempo suficiente para la reducción del MTS a formazan. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas ELISA a 570 nm. Como control negativo de viabilidad celular se incubaron las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 % DMSO y medio de cultivo DMEM. Como control positivo de viabilidad celular se cultivaron las células con medio de cultivo DMEM con 1 % DMSO.

**3. Ensayo de susceptibilidad bacteriana.** La susceptibilidad de los aislamientos estudiados frente a los derivados quínicos se determinó mediante el parámetro, **C**oncentración **I**nhibitoria **M**ínima (CIM) de DFUCh-O5 y DFUCh-P4. Se utilizó el método de microdilución utilizando medio de cultivo Mueller-Hinton I (DIFCO, Beckton Dickinson, Sparks, USA Lot N°1089531) en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Ultracruz™ Polystyrene Microplates, 96 well, U bottom Santa Cruz biotechnology, inc.), según las recomendaciones de Clinical Laboratories Standard Institute (CLSI) [65]. Para ello se utilizó un inóculo bacteriano de 5x10<sup>5</sup> UFC por pocillo, obtenido previamente desde una suspensión stock de 0,5 McFarland. Las concentraciones de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 ensayadas variaron en el rango de 32 – 0,0625 µg/mL, con un 1% o inferior de DMSO por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C por 18-22 h. Luego por inspección visual se determinó la CIM de los compuestos, la que correspondió a la menor concentración en la que no se observó crecimiento visible. Finalmente se determinaron los parámetros CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> y Media Geométrica (MG) de la CIM.

**4. Ensayo de Actividad Bactericida.** Para evaluar si los compuestos actúan como bactericidas o bacteriostáticos, se determinó la **C**oncentración **B**actericida **M**ínima (CBM), para esto se utilizó el método de subcultivo en placas de agar Mueller-Hinton I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N°BCBG4771V) luego del

metodo de microdilución utilizado para la obtención de la CIM de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI [65]. Se realizó el ensayo de susceptibilidad según lo descrito anteriormente, luego se tomó una alícuota de 100 uL desde cada uno de los pocillos de concentraciones superiores a la CIM, el pocillo de la CIM y también el pocillo de la concentración siguiente inferior CIM como control de viabilidad bacteriana. La alícuota fue diluida 1000 veces para remover los compuestos ensayados [66]. Se traspasaron 100 uL a una placa de agar Mueller-Hinton y luego se disperso el inóculo con un asa de Drigalsky previamente esterilizada con calor y etanol al 75%. Finalmente la CBM estuvo dada por la placa correspondiente a la menor dilución en la cual se observó un crecimiento menor al 0,01 % de las UFC/mL contenidas en el pocillo según Pearson y col. [67]. Los compuestos fueron clasificados como bactericidas si se cumplía el criterio de CBM/CIM es  $\leq 2$  y como bacteriostáticos si la relación es  $> 2$  según Craig y col. [66]. Se determinaron los parámetros CBM<sub>50</sub>, CBM<sub>90</sub> y Media Geométrica (MG) de la CBM.

**5. Cuantificación efecto post-antibiótico.** El efecto post-antibiótico (EPA) se cuantificó replicando las condiciones descritas por Silverman y col. [68]. Las bacterias fueron sembradas desde cepario conservado a -20°C, en placas de agar sangre de cordero. Se realizaron 3 pasajes previos al ensayo, con el fin de que los cultivos alcancen la fase de crecimiento exponencial. Para el ensayo, los cepas fueron expuestas a distintas concentraciones de DFUCh-O5 y DFUCh-P4: CIM, 2xCIM y 4xCIM, por 1 h con agitación y a 37°C. Posterior a la incubación, los cultivos fueron diluidos en un factor de 1/1000 con el fin de remover los compuestos ensayados según lo recomendado por Craig y col. [66]. Los recuentos bacterianos fueron determinados cada hora inmediatamente después de remover el compuesto (t=0). El PAE se calculó según la siguiente ecuación:

$$PAE = T - C,$$

donde T es el tiempo requerido para que el conteo en el test de cultivo incremente 1 log UFC sobre el conteo observado inmediatamente después de la remoción del

compuesto, y C es el tiempo requerido para que el conteo en el tubo control incremente en 1 log UFC.

**6. Ensayo de susceptibilidad bacteriana en presencia de proteínas plasmáticas.** Se determinó la CIM de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, mediante la técnica de microdilución, según las recomendaciones del CLSI [65]. Los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 fueron ensayados en concentraciones de 32 hasta 0,0625 µg/mL en presencia de 10% suero humano (Human Serum, Male AB Plasme, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N° SLBJ1038V) [69] y de 4 g/dL de albúmina (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N° SLBJ7867V), [69]. Una vez inoculadas las placas, fueron incubadas por 18-24 h a 37°C. Finalmente por inspección visual se determinó la CIM de los compuestos.

**7. Ensayo de Sinergia.** Se evaluó la efectividad *in vitro* de la asociación de los derivados arilmercaptoquinónicos con antibacterianos de uso clínico. Esto se estudió a través del método del "tablero de ajedrez" [70]. Se determinó la CIM, por la técnica de microdilución en caldo, según las recomendaciones del CLSI [65]. Se probaron distintas combinaciones de los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 con linezolid (Abcam-Biochemicals<sup>®</sup>, Cambridge, UK. Lot N° APN13103-1-1.), vancomicina (Abcam-Biochemicals<sup>®</sup>, Cambridge, UK. Lot N° APN12578-1-1.) y daptomicina (Abcam-Biochemicals<sup>®</sup>, Cambridge, UK. Lot N° APN12588-1-1). Para la configuración del panel de diluciones, se comenzó con una concentración 4xCIM tanto para DFUCh-O5 y DFUCh-P4 como para los antibacterianos a evaluar, se diluyó en potencia de 2 hasta una concentración mínima de CIM/16, con la finalidad de evaluar todas las posibilidades de sinergia en un amplio rango de combinaciones de los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 con los antibacterianos de uso clínico a diferentes concentraciones. Las placas fueron incubadas por 18-24 h a 37°C. Para establecer el efecto de la asociación se calculó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC, por sus siglas en inglés) [66]. De acuerdo a Lorian y col. un índice de CFI ≤ 0,5 se considerará sinergia, valores > 0,5 hasta 1, adición, valores > 1 hasta 2 indiferencia y valores > 2, antagonismo [70].

**8. Ensayo de incidencia de mutaciones espontánea.** Se realizó el ensayo de incidencia de mutaciones para los compuestos DFUCh-O5, DFUCh-P4 y vancomicina en triplicado, según lo descrito por Silverman J. A. y col [68], y otros autores (anexo 3.1). Para esto se sembró en placas con agar Mueller Hinton I que contenían DFUCH-O5 a concentraciones de 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM, 16xCIM; y DFUCH-P4 a concentraciones de ½xCIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM; y para el compuesto vancomicina a concentraciones de ¼xCIM, ½xCIM, 1xCIM, 2xCIM y 4xCIM; un inóculo bacteriano de  $5 \times 10^5$  UFC y se incubaron a 37°C durante 18-24h. Las especies utilizadas fueron *S. aureus* ATCC® 29213 y SARM 178 obtenida del ISPCH. Transcurrido el tiempo de incubación (24h), se registró la *CIM aparente* obtenida de la placa sin crecimiento bacteriano de menor concentración para cada compuesto. Las placas donde hubo crecimiento se les determinó la CIM por el método de microdilución siguiendo el protocolo del CLSI [65], para verificar si hubo cambios en su CIM denominándose *CIM determinada*. Finalmente, se repitió el mismo procedimiento para determinar la CIM por microdilución en caldo, pero esta vez con exposición a los tres compuestos simultáneamente.

**9. Ensayo de resistencia en serie.** Se realizó el ensayo de resistencia en serie para los compuestos DFUCh-P4 y DFUCh-O5 según lo descrito por Silverman y col. [68]. Para esto se usaron tubos de ensayo con 2mL de caldo Mueller Hinton I y se agregó después el antibacteriano correspondiente a concentraciones de ¼xCIM, ½xCIM, 1xCIM, 2xCIM y 4xCIM, y se inoculó con  $1 \times 10^6$  UFC de *S. aureus* ATCC® 29213. Los tubos fueron incubados a 37°C en agitación constante por 18-24h. Además, se realizó un control positivo de resistencia bacteriana con rifampicina (Rf) y un control negativo de resistencia con vancomicina. Traspasos diarios fueron realizados retirando 10 µL del tubo de mayor concentración que permitió crecimiento bacteriano e introduciéndolo a una nueva serie de tubos con los mismos compuestos a las mismas concentraciones. Los traspasos se realizaron hasta que existió crecimiento en todos los tubos de los compuestos DFUCH-O5 y DFUCH-P4. Los tubos donde hubo crecimiento fueron subcultivados en placas de MHA libres de fármaco y transcurridas 24 h se le determinó la CIM por el método de



microdilución siguiendo el protocolo del CLSI[65]. Finalizado el ensayo, los tubos de concentración 4xCIM con crecimiento bacteriano fueron nuevamente sembrados en placas MHA libres de compuestos y posteriormente se realizaron 3 pasajes en placas MHA libres de compuestos, determinándose la CIM en cada pasaje.

**10. Método para la cuantificación espectrofotométrica de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.** Para la determinación de la concentración de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 en solución, se utilizó el método de curva de calibración mediante espectrofotometría. En primer lugar, se realizó un barrido espectrofotométrico de 200-600 nm, para determinar la longitud de onda en la cual serán cuantificados los compuestos. Luego, detectados los máximos de absorbancia se procedió a preparar diluciones seriadas de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, que comprendían concentraciones de 64 a 2 µg/mL. A continuación, se determinaron las absorbancias de cada una de las soluciones preparadas y se realizó un gráfico de concentración v/s absorbancia. Finalmente, con el conjunto de datos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta correspondiente a cada compuesto.

**11. Determinación del Porcentaje unión a Albumina.** Este parámetro albumina fue determinado mediante el ensayo de “Diálisis al equilibrio” [71-73]. El estudio se llevó a cabo utilizando albúmina sérica 40 g/dL (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N° SLBJ7867V), conteniendo DFUCh-O5 y DFUCh-P4 a una concentración de 200 µg/mL, los cuales se dializaron mediante una membrana de celulosa (Approximate Molecular Weight Cut Off is 6000-8000 Daltons, Spectrum® Lab, Rancho Domínguez, USA, Lot N° 3259012) sumergida en suero fisiológico durante 7 h con agitación. Las concentraciones de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 se cuantificaron por espectrofotometría mediante una curva de calibración.

**12. Determinación de la permeabilidad pasiva.** Se utilizó el kit de placas PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) (Sigma Aldrich Ltda. USA) que contenía una placa dadora y otra aceptora. Se utilizó fosfatidilcolina (Sigma Aldrich Ltda. USA) disuelta en dodecano (Sigma Aldrich Ltda. USA) como barrera

lipofílica. Esta se posa sobre una membrana de PVDF, se esperó aproximadamente 5 min para la correcta fijación. Luego se agregó una solución de búfer fosfato (pH 7,4, en la placa aceptora. En la placa dadora se colocaron los compuestos ensayados. Posteriormente se ensamblaron las placas y se dejó en agitación a 250 rpm durante 2 h. Una vez transcurridas las 2 h de ensayo, se tomó una alícuota de cada pocillo (dador y aceptor) y se diluyeron con una solución de búfer fosfato. La determinación de la concentración se realizó por curva de calibración mediante espectrofotometría. Se utilizó tiopental (Sigma Aldrich Ltda. USA) y azul de Evans (The Coleman & Bell Co., Norwood, O., USA) como patrones.

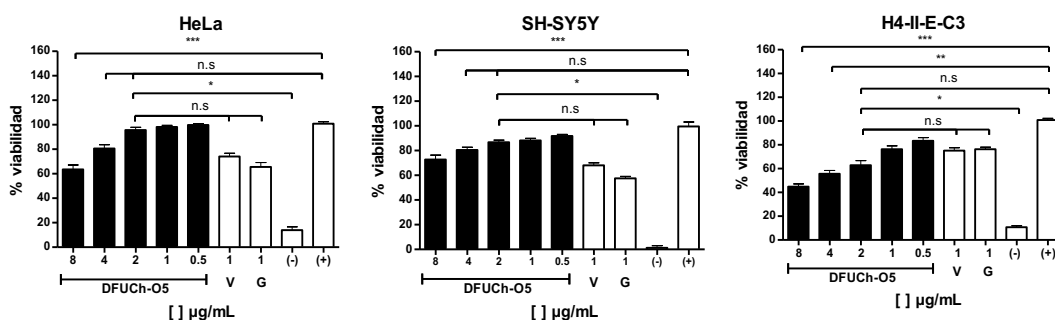
**13. Modelo de infección *in vivo*.** Se utilizaron larvas de *G. mellonella* obtenidas desde un proveedor comercial (BioBichos, Ltda.). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos por diversos autores [74-76]. Los grupos de estudio estaban compuestos por 10 larvas de *G. mellonella* en estadio final, con un peso aproximado de 250 mg cada una fueron seleccionadas al azar. Para inyectar a las larvas se utilizó una jeringa Hamilton<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup> Ltda. USA) el volumen de inoculación que se utilizó en cada ensayo fue de 10 uL. En primer término, se estudió la influencia de la inyección sobre la sobrevivencia de las larvas inyectando 10 µL de solución búfer fosfato. Se estudió la concentración (UFC/mL) de *E. faecalis* y *S. aureus* que disminuye la sobrevivencia de larvas de *G. mellonella* [74-76]. Se seleccionó el inóculo que logró reducir la sobrevivencia a menos del 20% en 72 h. También se estudió la toxicidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 y vancomicina, el antibacteriano control, en dosis de 10 mg/kg cada 24 h. Elegido el inóculo de bacterias y determinada la inocuidad de los compuestos a ensayar, se inocularon las larvas con la suspensión elegida y al cabo de 1 h se les inyectó el compuesto a estudiar, para determinar si los compuestos pueden aumentar la sobrevivencia. Después de cada tratamiento las larvas se incubaron por 5 días a 37°C, 80% de humedad, y la sobrevivencia se determinó diariamente. Un grupo de larvas fue inyectado con solución búfer fosfato y otro grupo no es sometido a tratamiento, ambos grupos son usados como control en cada uno de los experimentos. Los resultados de cualquier experimento con más de dos larvas muertas en algún grupo de control se descartaron.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Exploración de la toxicidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

#### 1. VIABILIDAD CELULAR POST-EXPOSICIÓN AGUDA A LOS DERIVADOS DFUCh-O5 Y DFUCh-P4

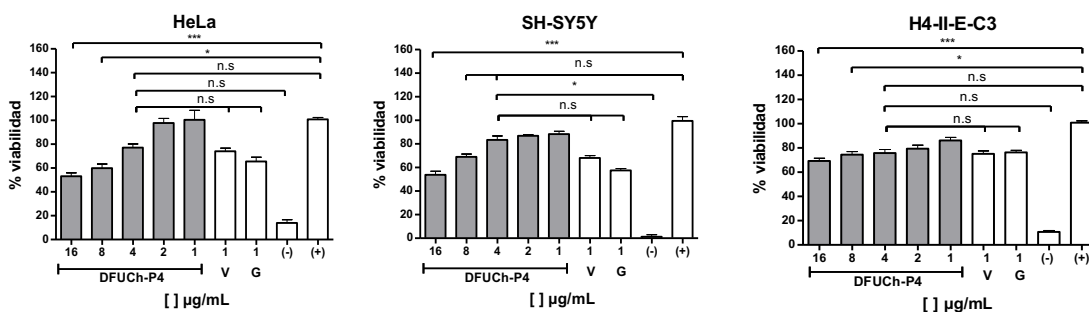
Los resultados de la determinación de la viabilidad celular post-exposición aguda a los derivados DFUCh-O5 y DFUCh-P4 se observan en las figuras 9 y 10. En ellas se muestran el porcentaje de viabilidad celular, para las células HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3 respectivamente.



**Figura 9.** Porcentaje de viabilidad de, células HeLa (izquierda), SH-SY5Y (centro) y H4-II-E-C3 (derecha), expuestas a las distintas concentraciones de DFUCh-O5 expresadas en µg/mL durante 24 h. **V:** vancomicina a 1 µg/mL. **G:** gentamicina a 1 µg/mL. **(-):** control negativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 % DMSO + DMEM). **(+):** control positivo (DMEM+ 1 % DMSO). n = 5.

Las concentraciones evaluadas se seleccionaron basándose en las actividades determinadas como CIM de los compuestos sobre *S. aureus* ATCC® 29213, reportadas por Campanini-Salinas y col. [77], para DFUCh-O5 la CIM fue de 2 µg/mL, en tanto para DFUCh-P4 fue de 4 µg/mL. Las concentraciones evaluadas para ambos compuestos fueron 4xCIM, 2xCIM, CIM, 1/2CIM y 1/4CIM. En la figura 11, se presenta el resumen de los porcentajes de viabilidad de las líneas celulares HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, frente a la exposición por 24 h de DFUCh-O5. Se puede apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo de viabilidad celular y la CIM, es decir la mínima concentración de DFUCh-O5 que inhibe el crecimiento visible de bacterias. Se evidencia que concentraciones superiores a la CIM afectan negativamente la viabilidad celular. Por

otra parte, cuando se compara el control negativo de viabilidad celular con la concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  de DFUCh-O5, se logra establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) indicando que el compuesto no genera caída en la viabilidad celular como lo hace el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (control de muerte) sobre todas las líneas celulares ensayadas. Al comparar DFUCh-O5 con antibacterianos de uso clínico, como vancomicina y gentamicina, a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  (CIM sobre *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 informada por CLSI [65] como control de calidad para la cepa) se aprecia que no existen diferencias significativas con DFUCh-O5 sobre la viabilidad celular determinada. Con la concentraciones de 8  $\mu\text{g/mL}$  hay diferencias significativas con el control positivo ( $p < 0,001$ ) para todas las líneas celulares estudiadas, en cambio la concentración de 4  $\mu\text{g/mL}$  no se logran establecer diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en células HeLa y SH-SY5Y, en células H4-II-E-C3 si hay diferencias significativas con el control positivo ( $p < 0,01$ ).



**Figura 10.** Porcentaje de viabilidad de, células HeLa (*izquierda*), SH-SY5Y (*centro*) y H4-II-E-C3 (*derecha*), expuestas a las distintas concentraciones de DFUCh-P4 expresadas en  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 h. **V:** vancomicina a 1  $\mu\text{g/mL}$ . **G:** gentamicina a 1  $\mu\text{g/mL}$ . **(-):** control negativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  + 1 % DMSO + DMEM). **(+):** control positivo (DMEM+ 1 % DMSO).  $n = 5$ .

En la figura 10, se presenta el resumen de los porcentajes de viabilidad de las líneas celulares HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, frente a la exposición de DFUCh-P4 por 24 h. Se puede apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo de viabilidad celular y la concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  de DFUCh-P4, por lo tanto, se puede señalar que el derivado exhibe selectividad por células procarióticas a la concentración 2  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, cuando se compara el control negativo de viabilidad celular con la concentración de 4  $\mu\text{g/mL}$  de DFUCh-P4 se logra establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p <$

0,05) en la línea celular SH-SY5Y con respecto al control de muerte. Con la concentración de 8 µg/mL no se logró establecer diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) sobre células SH-SY5Y, en células HeLa y H4-II-E-C3 si hay diferencias significativas con el control positivo ( $p < 0,05$ ). Con la concentración más alta ensayada 16 µg/mL, hay diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en todas las líneas celulares ensayadas.

Comparando DFUCh-O5 y DFUCh-P4, sobre la células de hepatoma murino (H4-II-E-C3), se observa diferencia significativa entre los efectos de ambos compuestos ( $p < 0,001$ ), sobre células de neuroblastoma (SH-SY5Y) también se observa un diferencia pero de menor significancia estadística ( $p < 0,01$ ). En células HeLA no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los efectos de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 ( $p > 0,05$ ).

Al analizar los porcentajes de viabilidad celular post-exposición a concentraciones superiores a la CIM de ambos derivados, sobre todas las líneas celulares ensayadas, se evidencia un efecto negativo sobre la viabilidad de estas. Los compuestos quinónicos tiene actividad antineoplásica reportada [49, 50], es decir, hay evidencia de que pueden afectar la viabilidad de células mamíferas. Los derivados ensayados tiene un núcleo quinónico que puede ser el responsable de estos efectos deletéreos observados sobre células mamíferas. Los mecanismos implicados en estos efectos se han descrito ampliamente [78]. Se ha evidenciado que las quinonas generan desbalances metabólicos dentro de los procesos de oxido-reducción, que dan origen a un aumento de la concentración de especies radicalarias [78]. Esto radicales libres afectan macromoléculas como proteínas y ADN, impidiendo el desarrollo normal de procesos vitales para la célula como la división celular [78].

Cabe destacar, que los compuestos exhiben relativa selectividad por las células procariotas, ya que DFUCh-O5 y DFUCh-P4 no disminuyen la viabilidad celular de HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, a la concentración de 2 y 4 µg/mL, que corresponden a la CIM de cada compuesto. Pero en su potencial enfoque fármacos de uso humano o veterinario, se debe asegurar que los compuestos son seguros de administrar, es decir son inocuos en el organismo objetivo. Es por esto que se debe

establecer el margen terapéutico de cualquier compuesto en desarrollo; este concepto está definido como el intervalo de concentraciones en el que hay efectos terapéuticos sin generar efectos tóxicos[79]. El margen terapéutico se definen inicialmente en fase pre-clínicas en donde se utilizan modelos murinos para hacer las determinaciones que lo permiten definir [80]. Sin embargo, los ensayos de viabilidad celular empiezan a dilucidar los grados de selectividad de un determinado compuesto por su blanco objetivo[80]. En el caso de los compuestos en desarrollo se pudo observar que a las concentraciones que son activos como antibacterianos no afectan la viabilidad de células mamíferas. Se ha estudiado, que las concentraciones plasmáticas de los antibacterianos en pacientes humanos deben superar la CIM, para poder alcanzar su máxima eficacia terapéutica[79]. Existe una clasificación de los fármacos antibacterianos que define cuantas veces se debe superar la concentración plasmática de estos a la CIM [81]; los *antibacterianos concentración-dependiente* para maximizar su eficacia deben alcanzar concentraciones superiores a 10 veces la CIM [81]. En tanto, los *antibacterianos tiempo-dependientes* deben alcanzar concentraciones superiores a 4 veces la CIM [81]. En la presente investigación (*Sección 6, Resultados y Discusión.*), se realizaron los ensayos que permitieron establecer que los derivados quínicos ejercen su efecto de forma *tiempo-dependiente*. De acuerdo a esto, los compuestos al administrarse *in vivo*, tendrán un menor potencial de generar efectos tóxicos, ya que se optimizaran para alcanzar concentraciones cercanas a 4 veces la CIM.

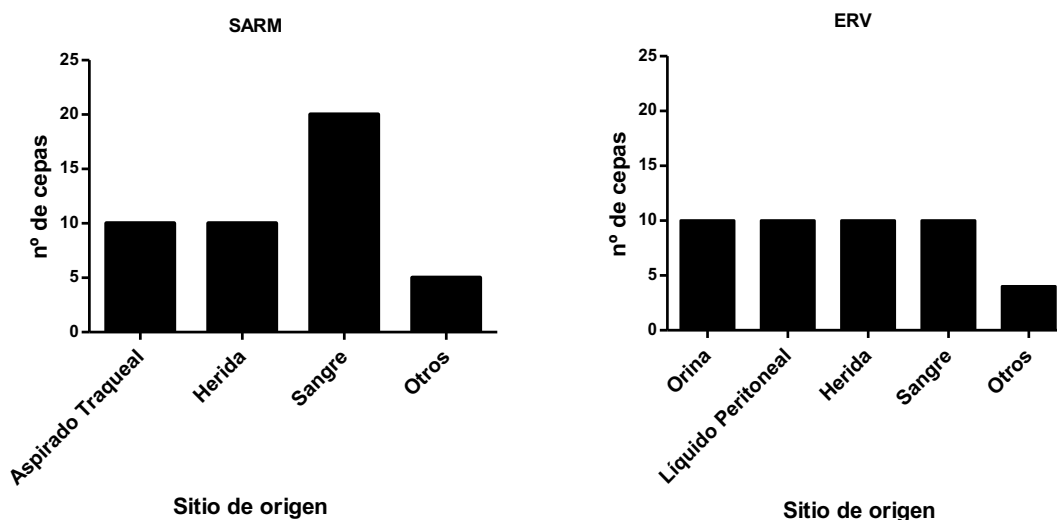
**Caracterización in vitro de la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV.**

**2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DFUCh-O5 Y DFUCh-P4 SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES.**

Para este estudio se utilizaron aislamientos clínicos de *S. aureus* o *Enterococcus* sp. aislados durante el año 2014 desde centros asistenciales de Chile, estos se seleccionaron según los siguientes criterios:

- *S. aureus* con resistencia a meticilina y *Enterococcus* sp. con resistencia a vancomicina multiresistentes. Además ambas especies debían exhibir multi-resistencia, es decir que presentaran resistencia a otras tres familias adicionales de agentes antibacterianos. (Tabla 6)
- Especies de distinta procedencia. Para reducir la probabilidad de ensayar cepas que fueran clones, se incluyeron los aislamientos muestreados en diferentes Servicios de Salud.
- Especies que fueron aisladas desde un sitio anatómico normalmente estéril y que no provenían de muestreo de vigilancia.

A continuación, se presenta un histograma con los distintos sitios de origen de aislamiento (Figura 11).



**Figura 11.** Distribución de cepas de SARM (izquierda) y ERV (derecha), según de sitios de origen.

A continuación en la tabla 6 se presentan los patrones de multiresistencia a fármacos antibacterianos (MDR, por sus siglas en inglés) [64].

**Tabla 6.** Categorización de aislamientos por sitio de origen y patrones de multiresistencia a fármacos antibacterianos.

<i>Especie bacteriana</i>	Sitio de Origen	n° de aislamientos	No. MDR (%)
<i>S. aureus</i>	Aspirado traqueal	10	7 (70)
	Herida	10	4 (40)
	Sangre	20	20 (100)
	Otros	5	4 (80)
<i>Enterococcus sp.</i>	Orina	10	10 (100)
	Líquido Peritoneal	10	10 (100)
	Herida	10	10 (100)
	Sangre	10	9 (90)
	Otros	4	4 (100)

Para evitar ensayar sobre poblaciones bacterianas clonales, se utilizaron cepas provenientes de distintos servicios de salud; Santiago Metropolitano Oriente, Centro, Sur, Norte, Suroriente, Concepción, Maule, Araucanía, Ñuble, Coquimbo, Reloncaví y Antofagasta.

A continuación, se presentan los resultados de la actividad antibacteriana de los derivados DFUCh-O5 y DFUCh-P4, sobre la población bacteriana anteriormente descrita. Para esto se determinaron los parámetros de la CIM<sub>50</sub>, que está definida como la CIM que inhibe el 50% de los aislamientos estudiados, CIM<sub>90</sub>, definida como la CIM que inhibe el 90% de los aislamientos ensayados, y la MG CIM, la media geométrica de la totalidad de los aislamientos estudiados. Se calcularon estos parámetros para la totalidad de las bacterias estudiadas. Para el análisis la población estudiada se dividió en subgrupos de acuerdo al origen de aislamiento de cada bacteria. Se utilizó como control vancomicina; el ensayo se consideró como



válido si la CIM de vancomicina informada por el ISP, era igual a la CIM determinada.

En la Tabla 7 se muestran los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de SARM frente a vancomicina determinados versus los valores de vancomicina reportados por el ISP.

**Tabla 7.** Perfil de susceptibilidad de SARM frente a vancomicina y daptomicina.

Antibióticos	Rango de CIM	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
vancomicina	1 - 2	1	2
vancomicina ISP	1 - 2	1	2

CIM expresadas en µg/mL. (n=4).

Se observa que vancomicina presenta valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> entre 1 - 2 µg/mL frente los aislamientos clínicos estudiados, lo que concuerda con los datos reportados por el ISP sobre estos mismos aislamientos.

Sobre los aislamientos de SARM se puede apreciar que el derivado DFUCh-O5, tiene una distribución de CIM unimodal, en donde la moda es 2 µg/mL (Figura 12). No se aprecian diferencias significativas entre los diferentes subgrupos de origen de aislamiento ( $p > 0,05$ ). Destaca el comportamiento de un aislamiento dentro del subgrupo sangre que exhibe una CIM de 32 µg/mL. En 13 de los 45 aislamientos de distintos orígenes la CIM fue informada como >32 µg/mL, esto se debe a la baja solubilidad en agua de los compuestos, ya que la máxima concentración que pueden alcanzar en las condiciones del ensayo son 32 µg/mL. Estos aislamientos fueron descartados del análisis. La CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, se situó 2 µg/mL (Tabla 8).

**Tabla 8.** Actividad antibacteriana de DFUCh-O5 sobre SARM.

Subgrupo	n° de Aislamientos	Rango CIM <sup>#</sup>	CIM <sub>50</sub> <sup>#</sup>	CIM <sub>90</sub> <sup>#</sup>	MG CIM <sup>#</sup>	Valor p
<b>A. traqueal</b>	10	4-2	2	4	2,40	} n.s. } n.s. } n.s.
<b>Herida</b>	10	4-2	2	2	2,20	
<b>Sangre</b>	10	32-1	2	4	4,81	
<b>Otros</b>	2	4-2	ND	ND	ND	
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>32-1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3,10</b>	

<sup>#</sup>: µg/mL; ND: no determinado

El derivado DFUCh-P4 exhibió una distribución de CIM unimodal, no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes subgrupos ( $p > 0,05$ ). En este grupo de aislamientos se informan los resultados de 29 cultivos de 45 ensayos. Los aislamientos en los cuales no se pudo determinar la CIM no fueron considerados en el análisis, ya que debido a la pobre solubilidad de los compuestos no se pudo alcanzar concentraciones superiores. La CIM a ser una variable discreta [65], para el análisis de los resultados, se requiere que esta tome un valor único; de esta forma se pueden determinar los parámetros CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>, MG CIM y se puede aplicar el test ANOVA al conjunto de datos para determinar el valor  $p$ . En los aislamientos donde no se puede obtener la CIM, se debe informar el resultado como  $>32 \mu\text{g/mL}$ , la máxima concentración evaluada. Este dato no puede ser incorporado dentro del tratamiento de los resultados.

La CIM<sub>50</sub> fue  $2 \mu\text{g/mL}$  y la CIM<sub>90</sub>  $4 \mu\text{g/mL}$ . De acuerdo a los resultados observados se establece que el derivado DFUCh-P4 posee una CIM<sub>90</sub> mayor que el derivado DFUCh-O5 (Tabla 9).

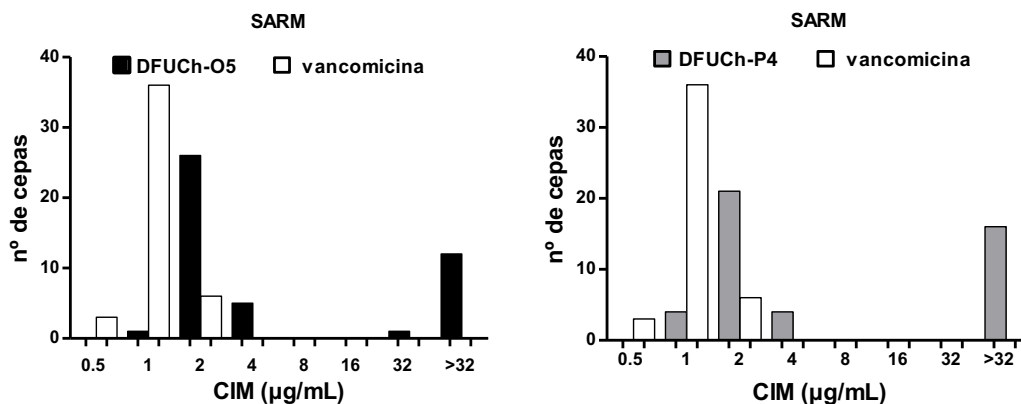
**Tabla 9.** Actividad antibacteriana de DFUCh-P4 sobre SARM.

Subgrupo	n° de Aislamientos	Rango CIM <sup>#</sup>	CIM <sub>50</sub> <sup>#</sup>	CIM <sub>90</sub> <sup>#</sup>	MG CIM <sup>#</sup>	Valor $p$
A. traqueal	9	4-1	2	4	2,33	] n.s ] ] n.s ]
Herida	9	4-1	2	4	2,11	
Sangre	9	2-1	2	2	1,77	
Otros	2	4-2	ND	ND	ND	
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>4-1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2,30</b>	

<sup>#</sup>:  $\mu\text{g/mL}$ ; ND: no determinado

En la figura 12, se muestra un gráfico de distribución de CIMs para cada derivado sobre los aislamientos de SARM comparado con vancomicina. En ambos compuestos el mayor porcentaje de los aislamientos exhiben una CIM de  $2 \mu\text{g/mL}$ . Al igual que para DFUCh-O5, los aislamientos en donde no se pudo determinar la CIM fueron excluidos del análisis por las razones explicadas anteriormente. Cuando se comparan las CIM observadas de los derivados quinónicos con vancomicina (Figura 12), se observa un perfil similar para ambos derivados. Para vancomicina el

mayor porcentaje de las bacterias tiene una CIM de 1  $\mu\text{g/mL}$  y no se observó CIM  $>32 \mu\text{g/mL}$ , determinándose la CIM en los 45 aislamientos ensayados.



**Figura 12.** Histograma de distribución de la CIM de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) versus CIM de vancomicina sobre aislamientos clínicos de SARM. n=45

Los resultados obtenidos para los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4, muestran diferencias en la susceptibilidad de los subgrupos herida, aspirado traqueal y sangre, presentando una baja o nula actividad a las concentraciones ensayadas. Este comportamiento puede explicarse por la disponibilidad de oxígeno en el sitio anatómico de donde se obtuvieron los aislamientos. En condiciones anaeróbicas *S. aureus* puede expresar genes que favorecen la fermentación por sobre la fosforilación oxidativa [82], esto afectaría la actividad de los compuestos, en base al mecanismo de acción propuesto, los compuestos requerirían de una fosforilación oxidativa activa para ejercer su acción. Si bien nuestros estudios se realizaron en condiciones aeróbicas, las bacterias del subgrupo sangre pueden conservar ciertas características fenotípicas de su anterior desarrollo en condiciones anaeróbicas [82]. Faltan estudios moleculares para establecer, si los aislamientos en donde se observó este comportamiento mantienen un perfil metabólico relacionado con su desarrollo en condiciones anaeróbicas.

Los resultados muestran que DFUCh-O5 tiene mayor actividad antibacteriana que DFUCh-P4, información que concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos sobre cepas de colección *S. aureus* ATCC®29213 y *S. aureus*

ATCC® 43300 resistente a meticilina, que demuestran que DFUCh-05 es más activo que DFUCh-P4 [77]. Por otra parte, estos resultados muestran que los derivados quinónicos son 2 veces menos activos que vancomicina sobre los diferentes aislamientos clínicos de SARM estudiados.

En este punto es necesario realizar una aclaración respecto de la lectura de los valores de CIM determinados en los ensayos de microdilución. Los valores determinados por ésta técnica presentan un error  $\pm 1$  dilución; por ejemplo, si se reporta una CIM de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se acepta una variación de esta medida entre 1 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ [65]. Por otra parte, el principio de no inferioridad aplicado para antibacterianos según la FDA [83, 84], señala que la actividad aceptable para nuevos agentes antibacterianos puede ser superior o equivalente al de los antibióticos de referencia. Al comparar el rango de CIM de vancomicina frente el rango de CIM de los compuestos estudiados, se observa que tan solo se diferencian por una dilución, por lo que se cumple el principio de la no inferioridad. Además este nuevo desarrollo constituye una nueva familia de compuestos antibacterianos que poseen un mecanismo de acción inexplorado en antibacterianos de uso clínico.

Para el derivado DFUCh-O5, sobre ERV la CIM<sub>50</sub> fue 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la CIM<sub>90</sub> de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no se observaron diferencias significativas entre los subgrupos estudiados. Es importante señalar, que en estos experimentos con ERV la CIM de la totalidad de los aislamientos pudo ser determinada en el caso de DFUCh-O5, esto difiere de lo observado con los aislamientos de SARM en donde no se pudo obtener un valor de CIM para la población estudiada. (Tabla 10)

**Tabla 10.** Actividad antibacteriana de DFUCh-O5 sobre ERV.

Origen	n° de Aislamientos	Rango CIM <sup>#</sup>	CIM <sub>50</sub> <sup>#</sup>	CIM <sub>90</sub> <sup>#</sup>	MG CIM <sup>#</sup>	Valor <i>p</i>
Orina	10	4-2	2	4	2,67	
Líquido peritoneal	10	4-2	2	2	2,20	
Herida	10	4-2	2	4	2,80	
Sangre	10	4-2	2	4	2,60	
Otros	4	4-2	ND	ND	ND	
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>4-2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2,59</b>	

<sup>#</sup>: µg/mL; ND: no determinado

Para el derivado DFUCh-P4 los valores obtenidos de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> correspondieron a 2 µg/mL y 4 µg/mL para 41 cepas de ERV, respectivamente. En el subgrupo de orina, no hubo actividad sobre 2 aislamientos, dando un rango de CIM de 8-4 µg/mL, resultando una CIM<sub>50</sub> de 4 µg/mL y una CIM<sub>90</sub> de 8 µg/mL para ese subgrupo. Los subgrupos de herida y sangre exhibieron un comportamiento similar con una CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 4 µg/mL. En el subgrupo de líquido peritoneal se observaron valores de CIM<sub>50</sub> de 2 µg/mL y CIM<sub>90</sub> de 4 µg/mL (Tabla 11). Finalmente, no hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los subgrupos estudiados, a excepción de los grupos de sangre y orina en donde hay diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

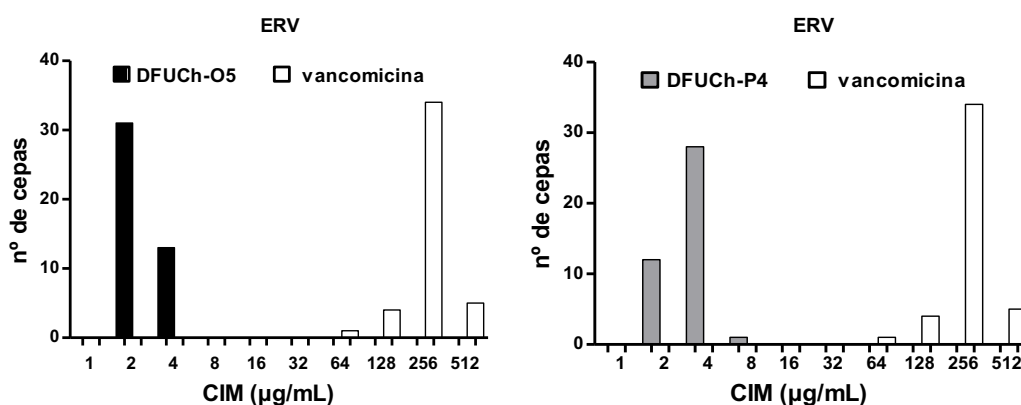
En la Figura 13, se puede apreciar que las CIM determinadas de ambos compuestos sobre EVR, tienen una distribución unimodal. En donde la moda de la CIM de DFUCh-O5 fue 2 µg/mL y para DFUCh-P4 fue 4 µg/mL. Es importante notar que el derivado DFUCh-O5 tuvo CIMs siempre inferiores a 32 µg/mL; en cambio, el derivado DFUCh-P4 no tuvo actividad en 3 de los aislamientos estudiados por lo que se informó como resultado que las CIMs de dichos aislamientos fue > 32 µg/mL.

**Tabla 11.** Actividad antibacteriana de DFUCh-P4 sobre ERV.

Origen	n° de Aislamientos	Rango CIM <sup>#</sup>	CIM <sub>50</sub> <sup>#</sup>	CIM <sub>90</sub> <sup>#</sup>	MG CIM <sup>#</sup>	Valor p
Orina	8	8-4	4	8	4,50	] n.s. ] n.s. ] n.s. ] n.s. ] n.s.
Líquido peritoneal	9	4-2	2	4	2,88	
Herida	10	4-2	4	4	3,80	
Sangre	10	8-2	4	4	3,20	
Otros	4	4-2	ND	ND	ND	
<b>TOTAL</b>	<b>41</b>	<b>8-2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3,48</b>	

<sup>#</sup>: µg/mL; ND: no determinado

Al comparar los resultados de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, respecto a vancomicina, (Figura 13), se aprecia que ambos establecen diferencias estadísticamente significativas con vancomicina ( $p < 0,001$ ), donde los valores de CIM para ambos compuestos presentaron CIMs menores a las determinadas para vancomicina (64 – 250 µg/mL). Estos resultados permiten establecer que los derivados DFUCh-O5 y DFUCh-P4 son 128 y 64 veces más activos frente a aislamientos clínicos de ERV que vancomicina. Finalmente, hay diferencias significativas entre las actividades ( $p < 0,05$ ) de ambos compuestos, DFUCh-O5 es más activo que DFUCh-P4 sobre los aislamientos de ERV estudiados.



**Figura 13.** Histograma de distribución de CIM de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) versus CIM de vancomicina sobre aislamientos clínicos de ERV.

### 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

Posterior a los ensayos de microdilución realizados para obtener los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de los compuestos, se realizó la determinación de la CBM por la técnica de subcultivo [65]. Para llevar a cabo este ensayo se tomaron en consideración las recomendaciones de Pearson y col. [67] y Taylor y col. [85]. En este estudio se evaluaron los parámetros CBM<sub>50</sub>, CBM<sub>90</sub> y MG CBM, definida como la media geométrica de la totalidad de los aislamientos estudiados.

El compuesto DFUCh-O5 tiene una CBM<sub>50</sub> y una CBM<sub>90</sub> de 4 µg/mL sobre los aislamientos de SARM. Utilizando los datos de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> previamente obtenidos, se calcula la relación de CBM<sub>50</sub>/CIM<sub>50</sub> y CBM<sub>90</sub>/CIM<sub>90</sub> (*datos no mostrados*), y se obtiene un valor de 2 para ambos casos, lo que indica que el compuesto DFUCh-O5 posee actividad bactericida sobre los aislamientos de SARM ensayados (Tabla 12).

**Tabla 12.** Actividad bactericida de DFUCh-O5 sobre SARM.

Origen	n° de Aislamientos	Rango CBM*	CBM <sub>50</sub>	CBM <sub>90</sub>	MG CBM
Aspirado traqueal	10	4-2	4	4	3,20
Herida	10	4-2	2	4	2,80
Sangre	10	8-2	2	4	3,20
Otros	2	4-4	ND	ND	ND
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>8-2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3,30</b>

\*: µg/mL; ND: No Determinado

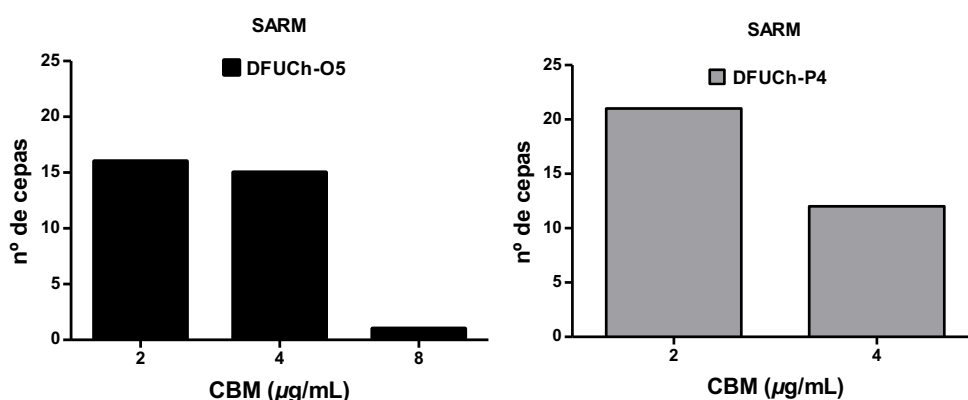
Para el compuesto DFUCh-P4, se observa que tiene una CBM<sub>50</sub> de 2 µg/mL y una CBM<sub>90</sub> de 4 µg/mL sobre los aislamientos de SARM (Tabla 13). Esto al contrastar con los valores de CIM obtenidos previamente, resulta  $CBM_{50}/CIM_{50} = 1$  y  $CBM_{90}/CIM_{90} = 2$ , indicando un efecto bactericida sobre los aislamientos de SARM ensayados.

**Tabla 13.** Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre SARM.

Origen	n° de Aislamientos	Rango CBM*	CBM <sub>50</sub>	CBM <sub>90</sub>	MG CBM
Aspirado traqueal	9	4-2	4	4	3,56
Herida	9	4-2	2	4	2,89
Sangre	9	4-2	4	4	3,11
Otros	2	4-4	ND	ND	ND
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>4-1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3,39</b>

\*: µg/mL; ND: No Determinado

En la Figura 16, se muestran los histogramas de las CBMs determinadas para DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre los aislamientos de SARM, para ambos derivados el valor de CBM de mayor frecuencia fue de 2 µg/mL. Como se señaló anteriormente no se pudo determinar la CBM, en los aislamientos que no se pudo determinar la CIM. El derivado DFUCh-O5 exhibió una CBM de 8 µg/mL sobre 2 aislamientos, uno proveniente de líquido peritoneal y el otro de herida, a pesar de la alta CBM no se puede indicar que esos aislamientos sean tolerantes ( $CBM/CIM \leq 32 = \text{TOLERANTE}$ ). Los aislamientos tolerantes son aquellos que exhiben CIM bajas, alcanzables a nivel clínico, pero tiene una fuerte disociación CIM/CBM por lo que el antibacteriano sólo ejerce acción bacteriostática [86].



**Figura 14.** Histograma de distribución de CBM de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) sobre aislamientos clínicos de SARM.



Sobre de ERV el derivado DFUCh-O5 se observó una  $CBM_{50}$  y una  $CBM_{90}$  de 4  $\mu\text{g/mL}$ . Con estos datos se obtiene una  $CBM_{50}/CIM_{50}$  igual a 2  $\mu\text{g/mL}$  y  $CBM_{90}/CIM_{90}$  igual a 1  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que el derivado posee un efecto bactericida sobre los aislamientos de ERV (Tabla 14).

**Tabla 14.** Actividad bactericida de DFUCh-O5 sobre ERV.

Origen	n° de Aislamientos	Rango CBM*	$CBM_{50}$	$CBM_{90}$	MG CBM
Orina	10	4-2	2	4	3,60
Líquido peritoneal	10	8-2	4	8	4,00
Herida	10	8-2	4	4	3,80
Sangre	10	4-2	4	4	3,40
Otros	4	4-2	ND	ND	ND
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>8-2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3,66</b>

\*:  $\mu\text{g/mL}$ ; ND: No Determinado

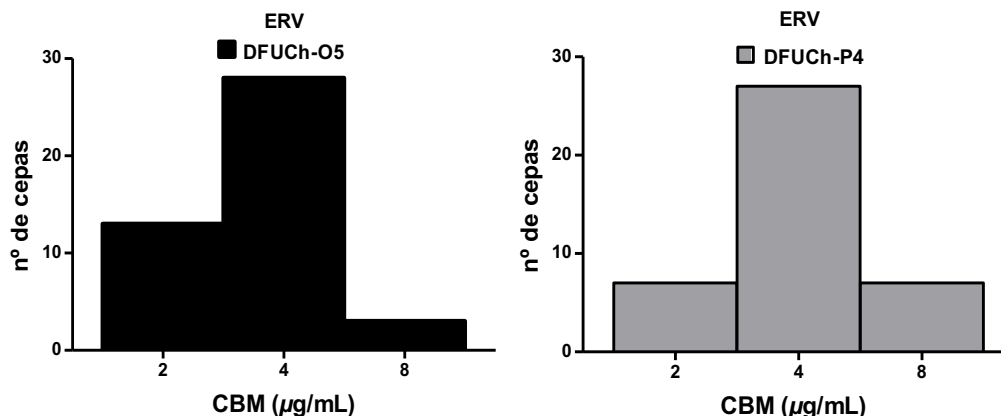
En la Tabla 15, se observa que DFUCh-P4 tiene  $CBM_{50}$  de 4  $\mu\text{g/mL}$  y una  $CBM_{90}$  de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Se calcula la relación de las  $CBM_{50}/CIM_{50} = 1$  y  $CBM_{90}/CIM_{90} = 2$ , al igual que el derivado DFUCh-O5, su efecto antibacteriano es bactericida sobre los aislamientos ensayados.

**Tabla 15.** Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre ERV.

Origen	n° de Aislamientos	Rango CBM*	$CBM_{50}$	$CBM_{90}$	MG CBM
Orina	8	8-4	4	8	5,00
Líquido peritoneal	9	8-2	4	8	3,77
Herida	10	8-2	4	8	5,00
Sangre	10	8-2	4	4	3,80
Otros	4	4-4	ND	ND	ND
<b>TOTAL</b>	<b>41</b>	<b>8-2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4,31</b>

\*:  $\mu\text{g/mL}$ ; ND: No Determinado

Finalmente, se muestran los histogramas de las CBMs determinadas para DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre los aislamientos de ERV (Figura 15). Para ambos derivados el valor de CBM fue de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  siguiendo una distribución unimodal. A diferencia de los resultados con SARM, se pudo determinar la CBM en casi la totalidad de las cepas ensayadas, indicando los resultados, que ambos derivados tienen un efecto bactericida.



**Figura 15.** Histograma de distribución de CBM de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) sobre aislamientos clínicos de ERV

Determinar el modo de acción de los compuestos es vital para definir la indicación de un antibacteriano. Los compuestos con actividad bactericida son preferidos en patologías complicadas y en infecciones en pacientes inmunocomprometidos [86]. Algunos autores señalan que, en cuadros como la sepsis, los fármacos de primera elección deberían ser bactericidas [87-89]. Se ha reportado que utilizar compuestos bactericidas podrían comprometer el estado del paciente cuando este padece bacteriemia. Los antibióticos beta-lactámicos por ejemplo, debido a su acción bactericida sobre algunos patógenos, generan la fragmentación de estos, promoviendo la liberación de compuestos antigénicos como el lipolisacárido (LPS), que pueden desencadenar síndromes inflamatorios como el shock tóxico [79].

Los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4, evidenciaron un modo de acción bactericidas en todos los aislamientos ensayados, esta información será útil en procesos posteriores del desarrollo de estos compuestos como el ensayo en modelos murinos de infección.

#### 4. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DFUCH-O5 Y DFUCH-P4.

Las CIM para DFUCH-O5 y DFUCH-P4 en presencia y ausencia de 4 g/dL de albúmina se muestran en la (Tabla 16). Se observa que la presencia de albúmina aumenta la CIM de los compuestos en todas las bacterias ensayadas. En *S. aureus* tanto ATCC® como aislamientos clínicos se observa que la CIM de DFUCH-O5 aumenta 16 veces en presencia de albúmina 4 g/dL (Tabla 16). DFUCH-P4 mantiene la misma tendencia al asociarlo a albúmina. Se evidencia el aumento de la CIM, no logrando determinar la CIM a las concentraciones ensayadas, excepto para el aislamiento clínico de *S. aureus* Cl178 en donde se visualiza una actividad 8 veces menor.

**Tabla 16.** Efecto de albúmina (Alb) en la actividad antibacteriana de DFUCH-O5 y DFUCH-P4.

Patógeno	CIM (µg/mL)			
	DFUCH-O5	DFUCH-O5 + Alb 4 g/dL	DFUCH-P4	DFUCH-P4 + Alb 4 g/dL
<b>SASM ATCC® 29213</b>	2	32	4	>32
<b>SARM ATCC® 43300</b>	2	32	4	>32
<b>SARM Clínico 178</b>	2	32	4	32
<b>SARM Clínico 401</b>	2	32	4	>32
<b><i>E. faecalis</i> ATCC® 29212</b>	2	32	4	32
<b>ERV Clínico 828</b>	4	32	4	32
<b>ERV Clínico 1666</b>	2	32	2	32

SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina

Para *E. faecalis* ATCC® 29212 y ERV clínico 828 y 1666, se observa un incremento en la CIM al ensayar con DFUCH-O5 y DFUCH-P4 asociado a albúmina. Para DFUCH-O5 se observa una disminución de 16 veces en la actividad en la cepa *E. faecalis* ATCC® 29212 y el aislamiento clínico de ERV 1666. Sobre esta última cepa, DFUCH-P4 exhibe también una disminución de 16 veces en la actividad. Sobre el aislamiento clínico 828, los 2 derivados muestran un aumento de 8 veces

en la CIM. Se ensayó como control 4 g/dL de albúmina sin asociar sobre todas las bacterias observándose que no afecta la viabilidad de éstas.

Finalmente se pudo evidenciar, que la concentración fisiológica de albúmina (4 g/dL) reduce la actividad de ambos compuestos, esto debido posiblemente a la interacción entre esta proteína transportadora de fármacos [90] y los derivados ensayados. Se hace necesario cuantificar el porcentaje de unión a albumina para poder establecer en que proporciones la albumina secuestra a DFUCh-O5 y DFUCh-P4, y por relación inversa calcular cuánto compuesto libre queda disponible para ejercer su acción [90].

Por otra parte, se estudió la actividad de los derivados quinónicos frente en 10% de suero humano inactivado por calor de acuerdo a lo reportado por Ling LL. *et al* [91]. Esto para tener una aproximación de la actividad de los compuestos en condiciones fisiológicas humanas. Concentraciones superiores de suero humano resultaban en una turbidez, producida principalmente por fragmentos de proteínas denaturadas producto del calor, que impedían la correcta lectura de la CIM.

**Tabla 17.** Efecto del suero humano al 10% (SH) en la actividad antibacteriana de los derivados.

Patógeno	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	DFUCh-O5	DFUCh-O5 + SH	DFUCh-P4	DFUCh-P4 + SH
<b>SASM ATCC<sup>®</sup> 29213</b>	2	16	4	32
<b>SARM ATCC<sup>®</sup> 43300</b>	2	16	4	32
<b>SARM Clínico 178</b>	2	32	4	32
<b>SARM Clínico 401</b>	2	32	4	32
<b><i>E. faecalis</i> ATCC<sup>®</sup> 29212</b>	2	16	4	32
<b>ERV Clínico 828</b>	2	16	4	32
<b>ERV Clínico 1666</b>	2	16	4	32

SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina

En la Tabla 17, se observa una disminución de la actividad de los derivados quinónicos en todas las bacterias ensayadas. Tanto DFUCh-O5 como DFUCh-P4 presentan una disminución de 8 veces en la CIM, salvo para los aislamientos

clínicos de SARM en donde se aprecia un descenso de la actividad de 16 veces en la CIM. Este descenso en la actividad se podría explicar por la interacción de los derivados quinónicos con proteínas presentes en el suero humano, que secuestran parte del compuesto, dejando un menor fracción de compuesto libre para ejercer su acción.

A continuación se explicarán los resultados observados utilizando datos que se exhibirán en la *sección 12* de este apartado, en donde se muestra el desarrollo experimental para obtener el porcentaje de unión albumina de los derivados. Este parámetro está relacionado con el subproceso farmacocinético de la distribución de fármacos en seres vivos.

**Tabla 18.** Integración resultados Farmacocinéticos y Farmacodinámicos

Patógeno	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	DFUCh-O5	DFUCh-O5 + Alb	DFUCh-P4	DFUCh-P4 + Alb
SASM ATCC <sup>®</sup> 29213	2	32	4	>32

Parámetros Farmacocinéticos		
	DFUCh-O5	DFUCh-P4
% de unión a albumina	85%	97%

Para DFUCh-O5 se observó una CIM de 32  $\mu\text{g/mL}$  en el pocillo que contenía albumina 40 g/dL. El porcentaje de unión albúmina obtenido experimentalmente es de 85% (*sección 12, Resultados y discusión*), esto nos indica que en el pocillo con DFUCh-O5 a 32  $\mu\text{g/mL}$  el 85% estaba secuestrado por la albumina, y no estaba disponible para ejercer su acción [92]. Por proporción directa podemos calcular que en 1 mL 27,2  $\mu\text{g}$  de DFUCh-O5 estaban unidos a albumina, es decir que 4,8  $\mu\text{g}$  quedaban para ejercer su acción, esta cantidad es coherente con la CIM reportada cuando se ensaya DFUCh-O5 en ausencia de albumina (2  $\mu\text{g/mL}$ ).

DFUCh-P4 por otra parte, no mostró actividad en el pocillo con la concentración límite (32  $\mu\text{g/mL}$ ). Considerando que el 97% (*Sección 12, Resultados y discusión*) es secuestrado por la albúmina, en el pocillo quedan 0,96  $\mu\text{g}$  de compuesto libre por cada mL. Para DFUCh-P4 la CIM es 4  $\mu\text{g/mL}$  sobre sobre SASM ATCC<sup>®</sup>29213,

lo que permite concluir que la concentración de compuesto disponible era insuficiente para ejercer la actividad.

Los resultados permiten establecer que los derivados quinónicos en presencia de albumina en concentraciones fisiológicas o en presencia suero humano, aumentan su CIM sobre las cepas de *S. aureus* y *Enterococcus* sp. Ensayados. Esto se explica por las interacciones que establecen los derivados quinónicos por albumina. Ambos compuestos poseen altos porcentajes de unión a albumina (*Sección 12, Resultados y discusión*), esto provoca que una fracción de las moléculas de los derivados se encuentren unidos a esta proteína, por lo que no está disponibles para ejercer su acción. De acuerdo esto, es que se evidencian alteraciones en la CIM determinadas. Cabe destacar que las interacciones que establece esta proteína son reversibles [92], por lo que la albumina dentro de la circulación sanguínea funciona como un reservorio de fármacos, que posibilita la distribución de estos en múltiples sitios anatómicos [92]. Faltan estudios *in vivo*, que permitan establecer distintos parámetros farmacológicos para caracterizar la farmacocinética de los compuestos quinónicos. Las diferencias entre los porcentajes de unión de los derivados se discutirán en la *Sección 12, Resultados y discusión*.

## 5. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE DFUCH-O5 Y DFUCH-P4 CON ANTIBACTERIANOS DE USO CLÍNICO.

Se exploró la potencial sinergia de la asociación de los derivados DFUCH-O5 y DFUCH-P4, con antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas, tales como *S. aureus* y *Enterococcus* sp. Los antibióticos utilizados fueron vancomicina, linezolid y daptomicina, antibacterianos que tienen mecanismos de acción diferentes. Vancomicina bloquea la síntesis del peptidoglicano, linezolid, inhibe la síntesis de proteínas, específicamente en la unidad 50S y daptomicina, ejerce su efecto a través de la depolarización de la membrana bacteriana [93, 94], estos fármacos tienen también un mecanismo diferente al propuesto para los derivados DFUCH-O5 y DFUCH-P4. Según Lorian y col. la asociación de dos compuestos antibacterianos con blancos de acción distintos potencialmente pueden experimentar sinergia [70]. El efecto de la combinación se estudió a través de la interpretación de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (FIC, *por sus siglas en inglés*) que fue calculada de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$FIC_A = \frac{CIM_{(A-B)}}{CIM_{(A)}}$$

Donde:

**FIC<sub>A</sub>** = Concentración fraccionaria inhibitoria del compuesto A

**CIM<sub>(A-B)</sub>** = Concentración mínima inhibitoria del compuesto A en presencia del compuesto B

**CIM<sub>(A)</sub>** = Concentración mínima inhibitoria del compuesto A

$$FIC_B = \frac{CIM_{(B-A)}}{CIM_{(B)}}$$

Donde:

**FIC<sub>B</sub>** = Concentración fraccionaria inhibitoria del compuesto B

**CIM<sub>(A-B)</sub>** = Concentración mínima inhibitoria del compuesto B en presencia del compuesto A

**CIM<sub>(B)</sub>** = Concentración mínima inhibitoria del compuesto B

$$\sum FIC = FIC_A + FIC_B$$

Donde:

$\Sigma$  **FIC** = Sumatoria de concentración fraccionaria inhibitoria de compuestos A y B.

**FIC<sub>A</sub>** = Concentración fraccionaria inhibitoria de compuesto A

**FIC<sub>B</sub>** = Concentración fraccionaria inhibitoria de compuesto B

De acuerdo a Lorian y col. un índice de FIC  $\leq 0,5$  se considerará sinergismo; valores  $> 0,5$  hasta 1, adición; valores  $> 1$  hasta 2, indiferencia y valores  $> 2$ , antagónicos [70].

En las tablas 19 y tabla 20 se presentan los resultados de la asociación de los derivados con vancomicina. Se pudo observar que ninguno de los derivados en asociación con vancomicina, presentó sinergismo sobre las cepas estudiadas. Se logró establecer que la asociación DFUCh-O5/vancomicina presenta efecto antagónico sobre la cepa SARM ATCC<sup>®</sup> 29213 e indiferencia sobre la cepa *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212. En el aislamiento clínico de SARM estudiado se observó un efecto aditivo de dicha asociación.

Por otra parte, la combinación DFUCh-P4/vancomicina mostró un efecto antagónico sobre la cepa *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212 y un efecto de indiferencia para las otras bacterias estudiadas.

**Tabla 19.** Efecto de la asociación de DFUCh-O5 con vancomicina.

Patógeno	CIM ( $\mu$ g/ml)				$\Sigma$ FIC	EFECTO
	DFUCh-O5	VAN	DFUCh-O5/VAN	VAN/ DFUCh-O5		
SASM ATCC <sup>®</sup> 29213	1	2	2	0,5	2,25	AT
SARM Clínico 178	4	2	2	1	1,00	A
<i>E. faecalis</i> ATCC <sup>®</sup> 29212	2	1	2	0,25	1,25	I
ERV Clínico 828	4	2	4	2	2,00	I

**VAN** vancomicina, **DFUCh-O5/VAN** DFUCh-O5 en presencia de vancomicina, **vancomicina/DFUCh-O5** vancomicina en presencia DFUCh-O5.  $\Sigma$  **FIC** Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria. **Efectos**; **S** sinergia, **I** indiferencia, **AD** adición, **AT** antagonismo; SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina. n = 5.



**Tabla 20.** Efecto de la asociación de DFUCh-P4 con vancomicina.

Patógeno	CIM (µg/ml)				Σ FIC	EFECTO
	DFUCh-P4	VAN	DFUCh-P4/VAN	VAN/ DFUCh-P4		
SASM ATCC® 29213	2	0,5	2	0,25	1,50	I
SARM Clínico 178	4	1	4	0,5	1,50	I
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	1	4	2	0,5	2,12	AT
ERV Clínico 828	4	2	4	2	2,00	I

**VAN** vancomicina, **DFUCh-P4/vancomicina** DFUCh-P4 en presencia de vancomicina, **vancomicina/ DFUCh-P4** vancomicina en presencia DFUCh-P4. **Σ FIC** Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria. **Efectos; S** sinergia, **I** indiferencia, **AD** adición, **AT** antagonismo; SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina. n=5

A continuación se presentan los resultados de la asociación de los derivados con linezolid (Tabla 21 y Tabla 22). Se evidenció un efecto sinérgico de la asociación DFUCh-P4/linezolid sobre cepa *E. faecalis* ATCC® 29212 y un efecto aditivo sobre los dos *S. aureus* estudiados. La asociación DFUCh-O5/linezolid mostró un efecto aditivo en todas las bacterias estudiadas.

**Tabla 21.** Efecto de la asociación de DFUCh-O5 con linezolid

Especie	CIM (µg/ml)				Σ FIC	EFECTO
	DFUCh-O5	line	DFUCh-O5/line	line/ DFUCh-O5		
SASM ATCC® 29213	2	4	1	2	1,00	AD
SARM Clínico 178	8	2	1	1	0,62	AD
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	4	4	2	2	1,00	AD
ERV Clínico 828	4	4	2	2	1,00	AD

**line** linezolid **DFUCh-O5/linezolid** DFUCh-O5 en presencia de linezolid, **linezolid/DFUCh-P4** linezolid en presencia DFUCh-O5. **Σ FIC** Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria. **Efectos; S** sinergia, **I** indiferencia, **AD** adición, **AT** antagonismo; SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina. n=5

**Tabla 22.** Efecto de la asociación de DFUCh-P4 con linezolid.

Especie	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )				$\Sigma$ FIC	EFECTO
	DFUCh-P4	line	DFUCh-P4/line	line/DFUCh-P4		
SASM ATCC® 29213	4	2	0.5	1	0,62	AD
SARM Clínico 178	8	1	2	0,5	0,75	AD
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	8	4	4	2	0,12	S
ERV Clínico 828	4	2	2	1	1,00	AD

**line** linezolid **DFUCh-P4/linezolid** DFUCh-O5 en presencia de linezolid, **linezolid/DFUCh-P4** linezolid en presencia DFUCh-O5.  $\Sigma$  FIC Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria. **Efectos**; **S** sinergia, **I** indiferencia, **AD** adición, **AT** antagonismo; SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina. n=5

A continuación se presentan los resultados de la asociación DFUCh-P4/DFUCh-O5 (Tabla 23). Se estudió el efecto de asociar los derivados DFUCh-P4 y DFUCh-O5, esperando un efecto antagónico debido a que tendrían un mismo blanco, es decir la administración conjunta no poseería efecto sinérgico según lo descrito por Lorian y col. [70]. Se observó que la asociación no presenta sinergismo sobre ninguna de las cepas estudiadas. Se observó un efecto aditivo sobre SASM ATCC® 29213 e indiferencia sobre el aislamiento clínico estudiado de la misma especie. Sobre todas las especies de *Enterococcus* sp. estudiadas se observó efecto de indiferencia en la asociación. Por otro lado, en el caso de SARM clínico 178 la  $\Sigma$ FIC presenta un valor de 1.25 que corresponde a un efecto de indiferencia, EFSV ATCC® 29212 y ERV clínico 828 presentan un valor de 2 para la  $\Sigma$ FIC, lo que se interpreta como un efecto de indiferencia. Este resultado no es el esperado en función al mecanismo de acción propuesto para ambos compuestos. En Farmacología, de acuerdo a la teoría de receptores [92], se debería observar un antagonismo cuando se usan ambos compuestos, ya que ambos teóricamente poseen el mismo blanco de acción. Los compuestos difieren en sus estructura en la sustitución del anillo tiofenólico adicionado a la estructura tricíclica, la diferencia es un átomo y la posición en la que esta sustituido(Tabla 5). Estas diferencia pueden alterar las interacciones que se establecen entre los compuestos y una proteína objetivo. En investigaciones paralelas del Laboratorio de Desarrollo de Fármacos de la Universidad de Chile, se ha evidenciado a través de estudios de Química Computacional (Docking) que DFUCh-P4 y DFUCh-O5, establecen diferentes

interacciones fisicoquímicas con proteínas como albumina humana (*PDB N°: 2BX8*) y el complejo II la CTeB de *E. coli*(*PDB N°: 1NEK*)(*datos no mostrados*). Esto demuestra que a pesar las similitudes estructurales entre DFUCh-P4 y DFUCh-O5 estos potencialmente podrían actuar en blancos distintos. Estas diferencias también ser observaron en los ensayos con vancomicina y linezolid.

**Tabla 23.** Efecto de la asociación de DFUCh-P4 con DFUCh-O5.

Especie	CIM (µg/ml)				Σ FIC	EFECTO
	DFUCh-P4	DFUCh-O5	DFUCh-P4/ DFUCh-O5	DFUCh-O5/ DFUCh-P4		
SASM ATCC® 29213	4	1	2	0,5	1,00	AD
SARM Clínico 178	2	2	0,5	2	1,25	I
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	4	4	4	4	2,00	I
EFV Clínico 828	4	4	4	4	2,00	I

**P4** DFUCh-P4, **O5** DFUCh-O5, **P4/O5** DFUCh-P4 en presencia de DFUCh-O5, **O5/P4** DFUCh-O5 en presencia de DFUCh-P4. **Σ FIC** Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria. **Efectos**; **S** sinergia, **I** indiferencia, **AD** adición, **AT** antagonismo; SASM: *S. aureus* susceptible a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina; ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina. n=5

En tanto, al estudio de la asociación daptomicina con DFUCh-P4 y DFUCh-O5, no se logró llevar a cabo, debido que no se pudieron reproducir los valores de CIM de control de calidad que informa CLSI (SASM ATCC® 29213, CIM 0,12 - 1 µg/mL, *E. faecalis* ATCC® 29212, CIM 1 - 4 µg/mL ) [65]. En primer lugar, se hizo un ensayo de microdilución en caldo Mueller Hinton I, obteniéndose valores de CIM de 4 µg/mL para SASM ATCC® 29213, y 32 µg/mL para *E. faecalis* ATCC® 29212. Posteriormente, según las recomendaciones del CLSI se realizó el ensayo de microdilución con caldo Mueller-Hinton II, medio ajustado para cationes ( $Ca^{+2} = 50$  µg/mL), atributo importante ya que la actividad de daptomicina es dependiente de la disponibilidad de calcio en el medio. Finalmente, se obtuvieron valores de CIM de 4 µg/mL para SASM ATCC® 29213, y 32 µg/mL para *E. faecalis* ATCC® 29212, no lográndose obtener los valores de CIM indicados por el CLSI.

## 6. CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO POST-ANTIBIÓTICO

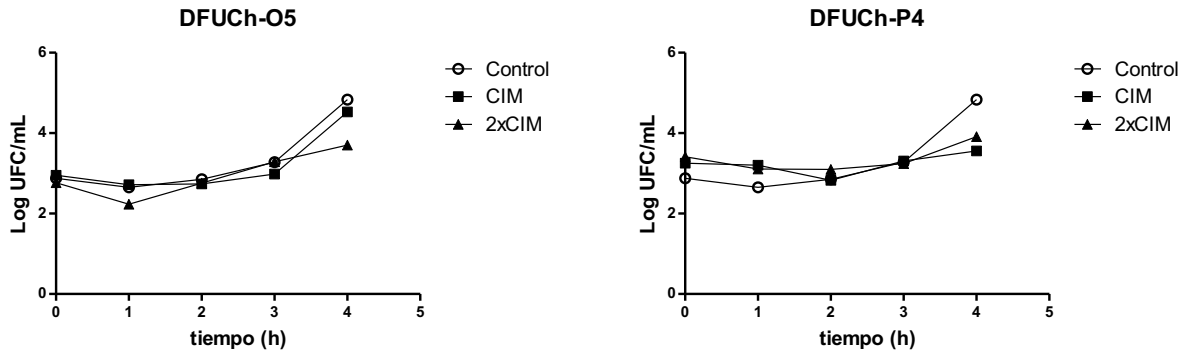
Se cuantificó el Efecto Post-Antibiótico (EPA) de los derivados quinónicos sobre SARM ATCC® 43300, SARM clínico 178, *E. faecalis* ATCC® 29212 y ERV clínico 828. Este dato permite una aproximación de la clasificación Farmacocinética/Farmacodinámica de los compuestos. Esta clasificación tiene 3 clases:

1. Los antibacterianos  $C_{max}/CIM$ , en donde la efectividad depende de la relación entre la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) alcanzada por el antibiótico y la CIM, por ejemplo, los aminoglucósidos como gentamicina.
2. Los fármacos  $t/CIM$ , en donde su acción está relacionada con el tiempo ( $t$ ) en que ellos están presentes en concentraciones superiores a la CIM, representantes de esta clase son los  $\beta$ -Lactámicos como la penicilina
3. Los compuestos AUC (del inglés *Area Under Curve*)/CIM, como la vancomicina [94]. Los antibacterianos de la clase  $C_{max}/CIM$  poseen un alto valor de EPA [94], lo que permite que los intervalos de dosis sean más prolongados y que su administración intravenosa sea por *bolus* [81].

En la figura 16 se observa que no existen diferencias significativas en las curvas de crecimiento de SARM ATCC® 43300 sometidos a la CIM y 2 veces la CIM de ambos derivados. Cuando se realiza el cálculo de acuerdo a la fórmula:

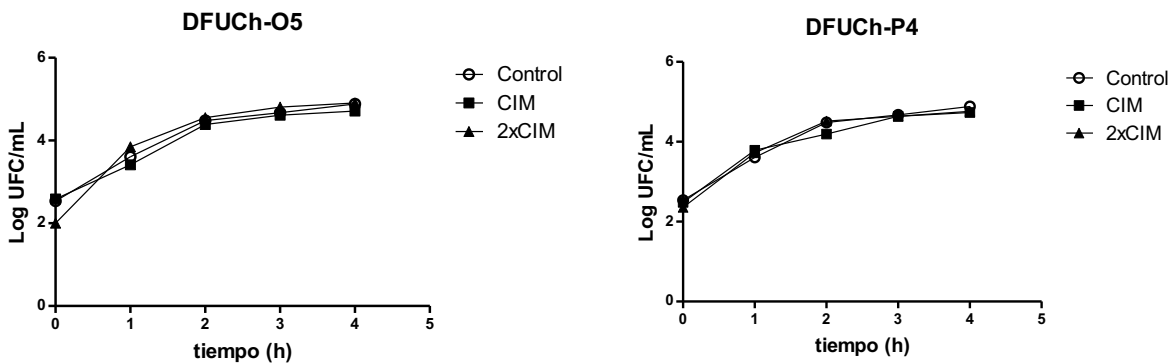
$$EPA = T - C$$

Donde  $T$  es el tiempo en hora requerido para que el conteo en el test de cultivo aumente las UFC en 1 unidad logarítmica sobre el conteo observado inmediatamente después de la remoción del compuesto, y  $C$  es el tiempo en horas para que el conteo en el tubo control aumente las UFC en 1 unidad logarítmica. Los valores utilizados para el cálculo de los EPA y la confección de los gráficos se encuentran adjuntos en el Anexo 1. Los resultados permiten establecer que el EPA es de 30 min para ambos derivados sobre la cepa SARM ATCC® 43300.



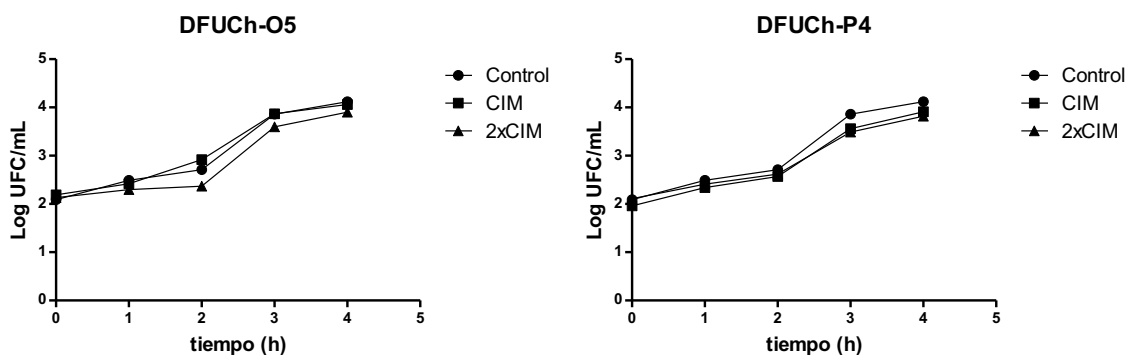
**Figura 16.** Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) sobre SARM ATCC® 43300. CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL

En la figura 17 vemos que al igual que en el caso de SARM ATCC® 43300, las curvas de crecimiento de *E. faecalis* ATCC® 29212 no son afectadas a ninguna de las concentraciones estudiadas. En este caso el EPA resultante fue 10 min para DFUCh-O5.

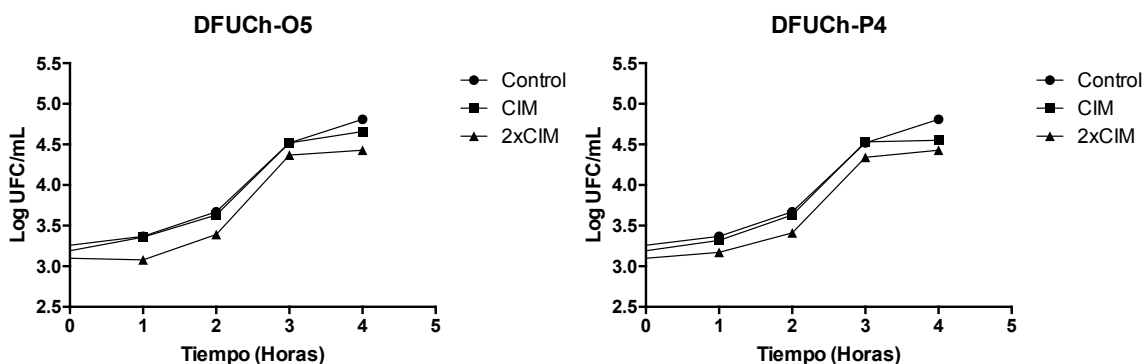


**Figura 17.** Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) sobre *E. faecalis* ATCC® 29212. CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL

Cuando se hacen los ensayos sobre aislamientos clínicos, se observa un comportamiento similar a lo visto en las cepas ATCC® [94].



**Figura 18.** Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) sobre SARM clínico 178. CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL.



**Figura 19.** Efecto post-antibiótico de DFUCh-O5 (izquierda) y DFUCh-P4 (derecha) sobre *E. faecium* Clínico 828 CIM DFUCh-O5 = 2 µg/mL y CIM DFUCh-P4 = 4 µg/mL.

Estos resultados permiten clasificar estos compuestos como antibacterianos tiempo dependientes T/CIM, ya que no poseen un EPA clínicamente significativo. La utilización de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre las diferentes bacterias ensayadas no causó supresión del crecimiento bacteriano, ya que los PAE calculados dieron tiempos inferiores a 30 minutos, lo que se confirma con las curvas de crecimiento mostradas en los gráficos, estos valores no se consideran significativos, informándose como PAE = 0 h.

De acuerdo a estos resultados, los compuestos presentan un modo de acción antibacteriano tiempo-dependiente, lo que significa que la actividad del antibacteriano va a depender del tiempo durante el cual su concentración supera a la CIM ( $T > CIM$ ) y no depende de la concentración máxima alcanzada. Los

antibacterianos que actúan con este modelo presentan una mayor respuesta clínica, con valores mayores al 40 % de la CIM entre dos dosis; un ejemplo típico de esta clasificación son los antibióticos beta-lactámicos que no presentan PAE en los bacilos Gram negativos.[95]

Faltan estudios farmacocinéticas en modelos animales para comprobar esta aseveración. Estos resultados orientan la forma de administración de los derivados, ya que este tipo de compuestos (T/CIM) deben administrarse en dosis repetidas y en concentraciones que no superen 4 veces la CIM del microorganismo a estudiar [94].

## 7. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MUTACIONES ESPONTÁNEAS DE *S. aureus* MULTIRRESISTENTES FRENTE A UNA EXPOSICIÓN AGUDA A DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

El índice de mutaciones espontaneas fue determinado de acuerdo a lo reportado por Mascio *et al* [96], de la siguiente forma:

$$\text{Indice de mutaciones espontaneas} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias}}{n^{\circ} \text{ de colonias sembradas}}$$

También se determinó la “**CIM**<sub>aparente</sub>” definida como el valor de CIM cuantificado por el método de dilución en agar, sobre las placas que contenían compuestos por separado. Adicionalmente, se estableció la “**CIM**<sub>determinada</sub>” de los compuestos la que fue obtenida tomando colonias de las placas de mayor concentración para cada compuesto y sometiéndolas a microdilución en caldo siguiendo el protocolo de CLSI [65] (Tabla 24). Estos valores se compararon con lo reportado previamente por Campanini-Salinas *et al* [77]. Este último valor se le denominó “**CIM**<sub>reportada</sub>”.

Los resultados indican que sobre *S. aureus* ATCC® 29213 que el antibiótico control vancomicina no registró cambio en su CIM (99). Ahora al analizar la diferencia entre la CIM<sub>reportada</sub> y la CIM<sub>determinada</sub>, se puede observar que el derivado DFUCh-O5 exhibe un CIM<sub>determinada</sub> igual a la CIM<sub>reportada</sub>, esto indica que el derivado no altera su CIM a pesar de que la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 fue expuesta previamente a este. La CIM<sub>aparente</sub> observada para este derivado pudo deberse a que el compuesto no se distribuye homogéneamente en las placas de agar, debido a su pobre solubilidad. Al analizar los resultados para el derivado DFUCh-P4, observamos que, si se establece una clara diferencia entre la CIM<sub>aparente</sub> y la CIM<sub>determinada</sub>, esta última no se pudo cuantificar informándose como >32 µg/mL. Esto indica que al exponer previamente a la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 a DFUCh-P4, se seleccionan poblaciones que sobreviven a la exposición. Esto resulta fenotípicamente en una elevación de la CIM de los derivados sobre la cepa estudiada. Los valores del índice de mutaciones espontaneas está informado como



intervalos, debido a que los conteos observados eran superiores a 300. El método indica que al observar esos conteos se debe calcular el índice con el número arbitrario de 300 UFC[96], e informarse el índice como intervalo. Estos intervalos dificultan la interpretación ya que no se pudo establecer el valor  $p$  de las comparaciones entre DFUCh-P4, DFUCh-O5 y vancomicina, al no ser una variable discreta. De acuerdo a esto se discutirá el ensayo en términos de la variación de la CIM observada, al igual que otros autores que han utilizado la metodología[96].

**Tabla 24.** Resultados del ensayo de incidencia de mutaciones para los compuestos DFUCh-O5 , DFUCh-P4 y vancomicina.

Especie	Compuestos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			Índice de Mutaciones espontaneas
		Reportada	Aparente	Determinada	
SARM ATCC® 29213	DFUCh-O5	2	8	2	$<5,9 \times 10^{-7}$
	DFUCh-P4	4	16	>32	$>1,8 \times 10^{-4}$
	vancomicina	0.5	0.5	0.5	$<5,9 \times 10^{-7}$
SARM CL 178	DFUCh-O5	2	4	>32	$>2,7 \times 10^{-6}$
	DFUCh-P4	4	8	>32	$>2,7 \times 10^{-6}$
	vancomicina	1	1	4	$<9,1 \times 10^{-7}$

SARM: *S. aureus* resistente a metilicina

Al analizar los resultados sobre el aislamiento SARM Cl 178, se observa que ambos derivados duplicaron sus valores de CIM respecto a la  $CIM_{reportada}$  con la  $CIM_{aparente}$ . El antibiótico control vancomicina validó el ensayo, ya que no alteró su CIM en ninguno de los experimentos realizados [97]. Sobre este aislamiento se observó que no se pudo cuantificar la CIM determinada ambos derivados se informaron como  $>32 \mu\text{g/mL}$ , lo que indica que sobre este aislamiento que ambos derivados seleccionan poblaciones que pueden sobrevivir ante estos.

Estos resultados muestran, que tanto DFUCh-P4 y como DFUCh-O5 pueden seleccionar poblaciones de *S. aureus* que sobreviven a las concentraciones de

ambos. Se demostró que DFUCH-O5 tiene un menor potencial de inducción de de selección que DFUCH-P4.

Como experimento adicional se buscó determinar si la exposición previa de la especie en estudio, podría alterar la CIM Determinada de cualquiera de los derivados, con esto se busca comprobar si los derivados pueden seleccionar poblaciones de forma cruzada.

**Tabla 25.** Incidencia de mutación para los compuestos DFUCH-O5, DFUCH-P4.

Especie	Exposición previa a:	Compuesto ensayado	CIM (µg/mL)	
			Determinada	Reportada
<b>SASM ATCC® 29213</b>	DFUCH-O5	DFUCH-O5	2	2
		DFUCH-P4	>32	4
		vancomicina	1	0.5
	DFUCH-P4	DFUCH-O5	8	2
		DFUCH-P4	>32	4
		vancomicina	1	0.5
	vancomicina	DFUCH-O5	4	2
		DFUCH-P4	4	4
		vancomicina	1	0.5
<b>SARM CL 178</b>	DFUCH-O5	DFUCH-O5	>32	2
		DFUCH-P4	>32	4
		vancomicina	1	1
	DFUCH-P4	DFUCH-O5	>32	2
		DFUCH-P4	>32	4
		vancomicina	1	1
	vancomicina	DFUCH-O5	4	2
		DFUCH-P4	4	4
		vancomicina	1	1

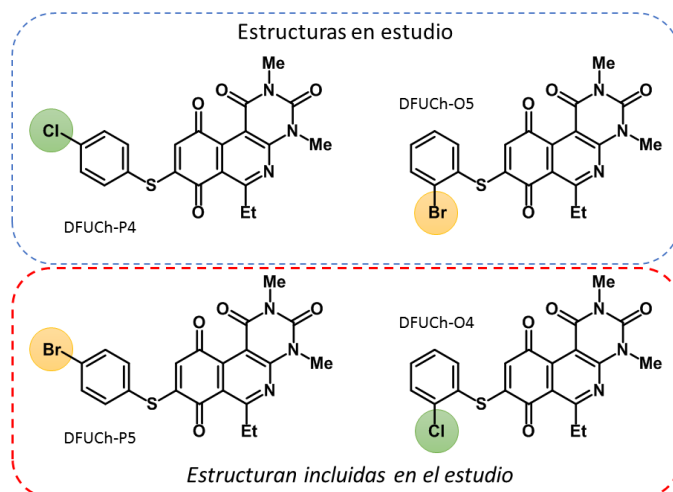
SARM: *S. aureus* resistente a metilina

Sobre la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 expuesta previamente a DFUCH-O5, no se altera el valor de la CIM, de igual forma que en los ensayos anteriores. Para el derivado DFUCH-P4 sobre esta misma cepa se produce un aumento en el valor su CIM superior a 8 veces. Para el antibiótico control vancomicina sobre la cepa resulta un incremento del doble de su CIM. Estos resultados indican que la exposición previa a DFUCH-O5 pueden inducir resistencia sobre la cepa que afecten la susceptibilidad a DFUCH-P4.

Sobre la misma cepa *S. aureus* ATCC® 29213 pero, esta vez expuesta previamente a DFUCh-P4, el valor de la CIM para DFUCh-O5 se produce un aumento en el valor de CIM de 4 veces. Sobre esta cepa, no se pudo determinar valor de la CIM para DUCH-P4 lo que demuestra un incremento de 8 veces en el valor de la CIM. La cepa muestra también alterada la CIM de vancomicina, ya que muestra un incremento de 2 veces su valor. Se puede concluir que la exposición previa a DFUCh-P4 pueden inducir mutaciones sobre *S. aureus* ATCC® 29213 que afecten la susceptibilidad de ésta frente a DFUCh-P4 y DFUCh-O5. Para la misma cepa expuesta a vancomicina, los valores de la CIM aumentaron al doble para los compuestos estudiados. Estos resultados no son concluyentes, ya que el incremento de la CIM es en una dilución ( $n \pm 1$ ). La metodología utilizada tiene un error de dilución equivalente a  $n \pm 1$ , de acuerdo a esto es que no se logra establecer si hay una alteración en los valores de la CIM por mutación de los aislamientos utilizados o es solo un error metodológico [65].

Al analizar los resultados de la exposición previa de los compuestos, DFUCh-O5, DFUCh-P4 y vancomicina, del aislamiento clínico estudiado SARM CL178, se puede observar que la exposición previa a DFUCh-O5, DFUCh-P4, produce un aumento superior a 8 veces en la CIM.. Esto nos indica que la exposición previa tanto a DFUCh-P4 como DFUCh-O5 pueden inducir mutaciones sobre el aislamiento clínico estudiado que afecten su susceptibilidad frente a ambos derivados.

Los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 poseen en el anillo tiofenólico un átomo de bromo en posición 2, y un átomo de cloro en posición 4. Ambos halógenos, poseen pequeñas diferencias en tamaño, lipofilia y electroafinidad. Con el fin de estudiar si estas diferencias estructurales son responsables de la potencial inducción de mutaciones observada, es que se incluyeron dos compuestos previamente sintetizados, donde los átomos de halógeno se encuentran intercambiados, generando los compuestos DFUCh-P5 o DFUCh-O4 (Figura 20) [77]:



**Figura 20.** Estructura DFUCh-P5 (a la izquierda) y DFUCh-O4 (a la derecha),

Se le aplicaron los mismos protocolos que los utilizados anteriormente para estudiar DFUCh-O4 y DFUCh-P5, los resultados se muestran en la tabla 26.

**Tabla 26.** Incidencia de mutaciones para los compuestos DFUCh-P5 y DFUCh-O4.

Especie	Compuestos	CIM( $\mu\text{g/mL}$ )			Índice de Mutaciones espontaneas
		Reportada	Aparente	Determinada	
SARM ATCC <sup>®</sup> 29213	DFUCh-P5	4	16	>32	$>1,0 \times 10^{-4}$
	DFUCh-O4	2	8	2	$<3,4 \times 10^{-7}$

SARM: *S. aureus* resistente a meticilina

Ahora si comparamos la CIM reportada con la CIM determinada, el derivado DFUCh-O4 no ve alterada su CIM sobre la cepa estudiado. Por otra parte, DFUCh-P5 exhibe un incremento superior a 8 veces su CIM, indicando que este tiene la capacidad de inducir mutaciones espontáneas con mayor probabilidad que DFUCh-O4. Tomando estos resultados con los exhibidos anteriormente en la tabla 23, podemos notar que los derivados sustituidos en posición 4, sin importar el átomo utilizado, tiene mayor potencial de inducción de resistencia.

Se aplicó el mismo protocolo que en los estudios previos pero esta vez se buscó determinar si la exposición previa de SARM ATCC<sup>®</sup> 29213 a DFUCh-O4 y

DFUCh-P5, podría alterar la CIM Determinada de cualquiera de los derivados, con esto se busca determinar cuál es la variante estructural que modula el potencial de inducción de mutaciones espontaneas. Los resultados se presentan en la tabla 27.

**Tabla 27.** Incidencia de mutaciones para los compuestos 4-Br y 2-Cl.

Especie	Compuesto Exposición previa	Compuesto Microdilución	CIM (µg/mL)	
			Determinada	Reportada
<b>SASM ATCC® 29213</b>	DFUCh-P5	DFUCh-O4	8	2
		DFUCh-P5	>32	4
		DFUCh-P4	>32	4
		DFUCh-O5	4	2
		vancomicina	1	0.5
	DFUCh-O4	DFUCh-O4	2	2
		DFUCh-P5	>32	4
		DFUCh-P4	>32	4
		DFUCh-O5	4	2
		vancomicina	1	0.5

SASM: *S. aureus* susceptible a metilina

Se puede observar que la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 expuesta previamente al derivado sustituido en *para*- (DFUCh-P5) ve alterada su susceptibilidad a ambos compuestos. En tanto cuando la cepa al estudio es expuesta al DFUCh-P4 solo se ve alterada la susceptibilidad a DFUCh-P5. Estos resultados indican que ambos derivados pueden inducir mutaciones espontáneas a la cepa estudiada, alterando la susceptibilidad de esta los derivados sustituidos en la posición 4, DFUCh-P5 y DFUCh-P4.

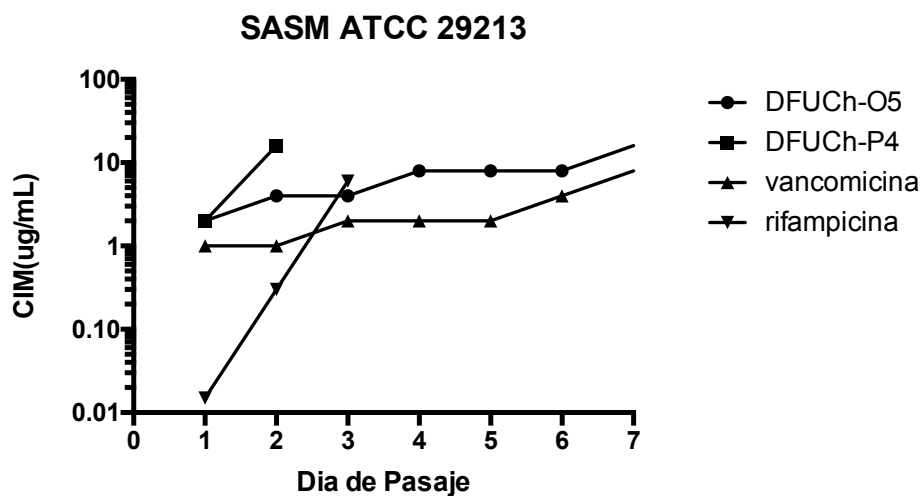
## 9. EXPLORAR LA POTENCIAL INDUCCIÓN DE MUTACIONES DE *S. aureus* FRENTE A UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA A DFUCH-P4 Y DFUCH-O5.

Para estudiar el potencial de inducción de resistencia de los derivados, se utilizó el método de resistencia por pasajes en serie, de acuerdo a protocolo reportado por Silverman y col. [68]. Se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213. Se utilizaron los antibióticos control vancomicina y rifampicina. El primero como control negativo, ya que posee un bajo potencial de inducción de resistencia de acuerdo a lo reportado por Clark y col [98]. Rifampicina fue utilizada como control positivo por su alto potencia de generación de resistencia de acuerdo a lo reportado por Mascio y col [96]. Los valores de CIM, DFUCH-O5 y DFUCH-P4 para la preparación de los tubos, fueron reportados por Campanini-Salinas y col. [77], para vancomicina se utilizaron los valores de control de calidad de la cepa de acuerdo CLSI [65], y para rifampicina de acuerdo a lo reportado por Mascio y col. [96].

Brevemente, se estudiaron 5 tubos con concentraciones de  $\frac{1}{4}$ xCIM,  $\frac{1}{2}$ xCIM, CIM, 2xCIM y 4xCIM. Cada tubo fue sembrado con 10 $\mu$ L de suspensión bacteriana de concentración 10<sup>8</sup>UFC/mL. Los tubos fueron dejados en la estufa a 37°C en agitación constante por 24h. Transcurrido las 24 horas (primer pasaje) se registró la “CIM<sub>inicial</sub>” para cada compuesto frente a dicha bacteria, en los tubos. Después del primer pasaje la concentración más baja de cada compuesto utilizado que permitió crecimiento bacteriano fue traspasada a otra serie de tubos. La CIM fue determinada diariamente a través del método de microdilución. De los tubos en los que hubo crecimiento se sembró en una placa MHA previamente preparada para dejarlas crecer entre 18 y 24h y así poder determinar la CIM por el método de microdilución siguiendo el protocolo CLSI [65]. Los pasajes se terminaron sólo cuando hubo crecimiento bacteriano en todos los tubos que contenían el compuesto. Los resultados obtenidos del ensayo están resumidos en la Tabla 28.

**Tabla 28.** Resultados del ensayo de resistencia pasajes en serie para los compuestos DFUCH-O5 , DFUCH-P4, vancomicina y rifampicina.

Compuestos	N° de pasajes	CIM (µg/mL)				
		Reportada	inicial	Obtenida	Final	
DFUCH-O5	7	2	2	>8	DFUCH-O5	8
					DFUCH-P4	>32
					vancomicina	1
DFUCH-P4	2	4	2	>8	DFUCH-O5	16
					DFUCH-P4	>32
					vancomicina	1
vancomicina	7	0,5	0,5	4	DFUCH-O5	4
					DFUCH-P4	>32
					vancomicina	2
rifampicina	3	0,03	0,015	>0,06	DFUCH-O5	4
					DFUCH-P4	>32
					vancomicina	>0,12



**Figura 21.** Cambios diarios en la MIC en los estudios de resistencia de pasajes en serie de DFUCH-O5, DFUCH-P4, vancomicina y rifampicina contra SASM ATCC® 29213.

La cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 expuesta a 7 pasajes con el compuesto DFUCH-O5 incrementó su valor de CIM 4 veces (Figura 21). La cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 expuesta a 2 pasajes con el compuesto DFUCH-P4 incrementó su valor de CIM 4 veces.

La cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 expuesta a 7 pasajes con el compuesto vancomicina incrementó su valor de CIM 4 veces. A concentraciones del compuesto

DFUCH-O5 produce un incremento en su valor de CIM al doble. Expuesto a DFUCH-P4 produce un incremento en su valor de CIM más de 8 veces. La cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 expuesta a 3 pasajes con el compuesto Rf incrementó su valor de CIM 4 veces.

La susceptibilidad de *S. aureus* ATCC® 29213 para DFUCH-O5 cambió de 2 µg/mL a >8 µg/mL después de 7 pasajes seriados y para DFUCH-P4 cambió de 2 µg/mL a >8 µg/mL después de 2 pasajes seriados (figura 21). De acuerdo a lo reportado por Clark y col. [98], la susceptibilidad de vancomicina en cepas de *S. aureus* sensible a meticilina cambia de 2 µg/mL a 8 µg/mL después de 10 pasajes seriados. En el estudio actual vancomicina cambió de 0.5µg/mL a 4µg/mL después de 7 pasajes seriados, estos resultados son similares a lo observado por Clark y col. Para rifampicina, según Franz-Josef Schmitz y col. [99], la susceptibilidad de rifampicina en cepas de *S. aureus* sensible a meticilina cambia de 0.015µg/mL a >1024 µg/mL después de 10 pasajes seriados. La susceptibilidad para rifampicina para el estudio actual cambió de 0.015µg/mL a >0.06µg/mL después de 3 pasajes seriados. De acuerdo a lo resultados, es posible aseverar que DFUCH-O5 tiene una menor potencia de inducción de resistencia que DFUCH-P4; sin embargo, ambos pueden inducir mutaciones en cepas que son expuestas repetitivamente a concentraciones de estos derivados.

Es necesario estudiar si estos cambios fenotípicos de las especie expuesta a los compuestos, permanecerán en pasajes posteriores sin la exposición a estos.

Para esto las poblaciones resultantes del estudio de pasajes en serie, se traspasaron sucesivamente por 3 días. Para dar lugar así a 3 generaciones de poblaciones (G1, G2 y G3). que no fueron expuestas a los derivados. A cada generación se le determinó la CIM por el método de microdilución en caldo, Lo resultados se presentan en la tabla 29.



**Tabla 29.** Susceptibilidad de las generaciones sin exposición previa a tratamiento.

Exposición previa	Compuesto ensayado	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		G0	G1	G2	G3
DFUCH-O5	DFUCH-O5	8	8	4	2
	DFUCH-P4	>32	>32	4	4
	vancomicina	1	1	0.5	0.5
DFUCH-P4	DFUCH-O5	8	4	4	2
	DFUCH-P4	>32	>32	4	4
	vancomicina	1	1	0.5	0.5
Vancomicina	DFUCH-O5	4	8	4	2
	DFUCH-P4	8	>32	>32	>32
	vancomicina	2	2	2	2
Rifampicina	DFUCH-O5	4	8	4	4
	DFUCH-P4	4	4	4	4
	rifampicina	>0,12	>0,12	>0,12	>0,12

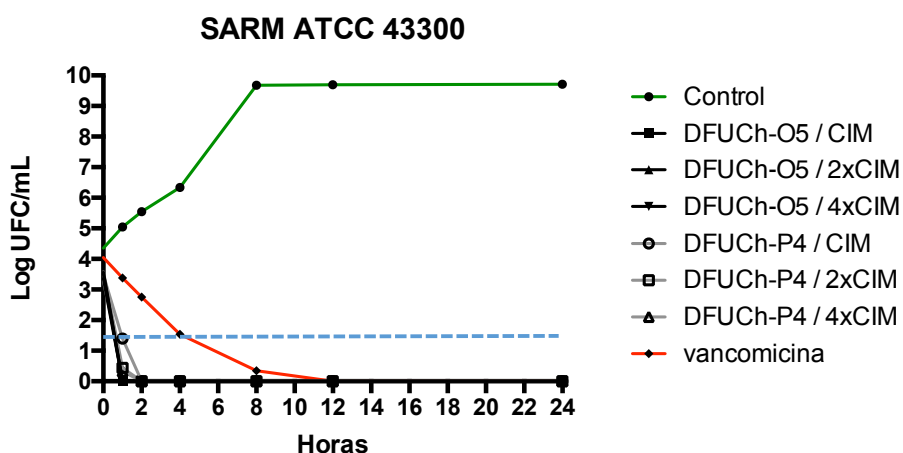
La cepa de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 expuesta al compuesto DFUCH-O5 finalizados los pasajes cambió su valor de CIM para DFUCH-O5 de 8  $\mu\text{g/mL}$  a 2  $\mu\text{g/mL}$ , para DFUCH-P4 de >32  $\mu\text{g/mL}$  a 4  $\mu\text{g/mL}$  y para vancomicina se mantuvo constante con un valor de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  después de 3 pasajes seriados entre placas MHA libres de compuestos. La cepa de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 expuesta al compuesto DFUCH-P4 finalizados los pasajes cambió su valor de CIM para DFUCH-P4 de >32  $\mu\text{g/mL}$  a 4  $\mu\text{g/mL}$ , para DFUCH-O5 de 8  $\mu\text{g/mL}$  a 2  $\mu\text{g/mL}$  y para vancomicina se mantuvo constante con un valor de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  después de 3 pasajes seriados entre placas MHA libres de compuestos. La cepa de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 expuesta al compuesto vancomicina finalizados los pasajes cambió su valor de CIM para vancomicina se mantuvo constante con un valor de 2  $\mu\text{g/mL}$ , para DFUCH-O5 de 4  $\mu\text{g/mL}$  a 8  $\mu\text{g/mL}$  y para DFUCH-P4 de 8  $\mu\text{g/mL}$  a >32  $\mu\text{g/mL}$  después de 3 pasajes seriados entre placas MHA libres de compuestos. La cepa de *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 expuesta al compuesto Rf finalizados los pasajes, su valor de CIM se mantuvo constante con un valor de >0,12  $\mu\text{g/mL}$ , para DFUCH-O5 se mantuvo constante con un valor de 4  $\mu\text{g/mL}$  y para DFUCH-P4 se mantuvo constante con un valor de 4  $\mu\text{g/mL}$  después de 3 pasajes seriados. Los resultados observados sobre la cepa por la exposición previa a los derivados no se mantiene fenotípicamente, ya que la susceptibilidad a estos es recuperada luego de 3 generaciones. Los fenómenos observados no necesariamente se deben a mutaciones que surgen frente a la exposición a los derivados, se ha observado

cambios en el perfil de susceptibilidad de ciertos aislamientos de *S. pneumoniae* cuando están expuestos a la combinación de los antibióticos trimetoprim y sulfametoxazol [100]. Al revisar el análisis fenotípico se ha evidenciado que los aislamientos toman vías metabólicas alternativas que resultan en el cambio en la susceptibilidad [100]. De acuerdo al mecanismo de acción propuesto para los derivados evaluados, es probable que los aislamientos obtengan energía de otras vías metabólicas distintas a la que proponemos bloquear, la CTeB. Esto podría explicar el cambio en la susceptibilidad de *S. aureus* a los derivados.

Por otra parte, la especie utilizada experimenta un fenómeno llamado heteroresistencia [25], para glicopéptidos como la vancomicina. Este concepto es definido como la cepas de *S. aureus* que en las pruebas estándar (CLSI) se interpretan como sensibles a vancomicina, pero que al realizar un perfil de análisis poblacional que presentan subpoblaciones con susceptibilidad intermedia[101]. El análisis fenotípico de las poblaciones indican que existen distintos mecanismos de resistencia expresados en distintas subpoblaciones. Esto se traduce en que se observen poblaciones que tengan un CIM distinta, a la que muestra cuando se analiza la totalidad. Un fenómeno similar podríamos estar observando en con la cepa utilizada frente a la exposición a DFUCH-O5 y DFUCH-P4. En la primera parte del ensayo seleccionamos solo la población que sobrevive a las concentraciones de los compuestos. Pero cuando se deja de exponer la cepa a concentraciones de los derivados, sobrevive la población mayoritaria la cual tiene una CIM baja.

## 10. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE MUERTE, DE CEPAS GRAM POSITIVAS DE RELEVANCIA CLÍNICA FRENTE A DFUCH-O5 Y DFUCH-P4.

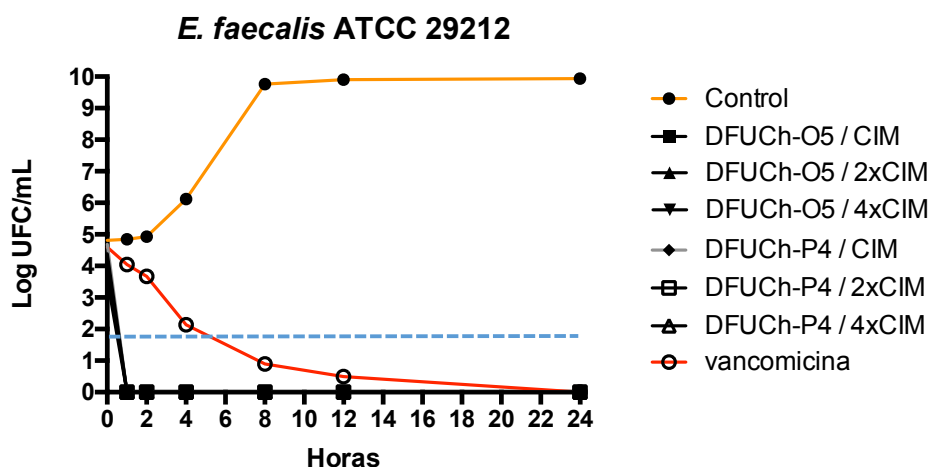
Otro de los métodos *in vitro* que existe para medir actividad antibacteriana de nuevos compuestos, es a través de la exposición de cultivos bacterianos a diferentes concentraciones de estos, tomando muestras a diferentes tiempos durante un período de 24 horas y determinando la cantidad de bacterias viables en cada muestra. Esta metodología se conoce como curvas de tiempo-muerte (Time-Kill Curves *en inglés*) y permite conocer la cinética de muerte de las bacterias frente a un compuesto con actividad antibacteriana.



**Figura 22.** Cinética de muerte de SARM ATCC® 43300, expuesto a DFUCh-O5 y DFUCh-P4, a diferentes concentraciones. La línea punteada azul representa el 99,9% de muerte.

Como se demostró anteriormente en la **sección 3**, DFUCh-O5 y DFUCh-P4, poseen actividad bactericida a todas las concentraciones iguales o superiores a la CIM sobre los aislamientos clínicos de SARM y VRE. Los resultados de las curvas de tiempo-muerte para ambos compuestos evidencian que ambos son bactericidas sobre la cepa SARM ATCC® 43300 (Figura 22). Antes de las 2 horas ambos compuestos redujeron el 99,9% de la población bacteriana a la que fueron enfrentados. Al comparar la actividad bactericida de los compuestos versus vancomicina, podemos encontrar que vancomicina tarda el doble de tiempo en

alcanzar la eliminación del 99,9% de población bacteriana. Cabe destacar que a las 8 horas se detectan bacterias viables en el experimento con vancomicina. Esto resulta en una ventaja significativa para los compuestos estudiados en comparación a vancomicina ya que Sakoulas y col. y Kollef y col., señalan que una de las principales limitaciones de vancomicina en el manejo de infecciones asociadas a MRSA, es su baja capacidad bactericida [102, 103].



**Figura 23.** Cinética de muerte de *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 43300, expuesto a DFUCh-O5 y DFUCh-P4, a diferentes concentraciones. La línea punteada azul representa el 99,9% de muerte.

En la Figura 23, se observa un comportamiento similar a lo visto en SARM ATCC<sup>®</sup> 43300, ambos derivados poseen actividad bactericida sobre la cepa *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212. Se evidencia que transcurrida 1 hora tanto DFUCh-O5 como DFUCh-P4, eliminan una cantidad superior al 99,9% de las bacterias inoculadas inicialmente. Su comparador vancomicina, tarda 8 horas en superar el 99,9% de eliminación bacteriana. Uno de los factores que puede explicar esta diferencia, es que las especies de *Enterococcus*, como *E. faecalis* o *E. faecium* posee resistencia intrínseca a vancomicina [86, 104], lo que dificulta en ocasiones los tratamientos de infecciones asociados a estos patógenos [105]. En un escenario clínico en donde la resistencia a vancomicina de *E. faecalis* o *E. faecium* ha incrementado exponencialmente en los últimos años [26, 29], se hace necesario buscar alternativas terapéuticas contra este patógeno de alta relevancia hospitalaria.

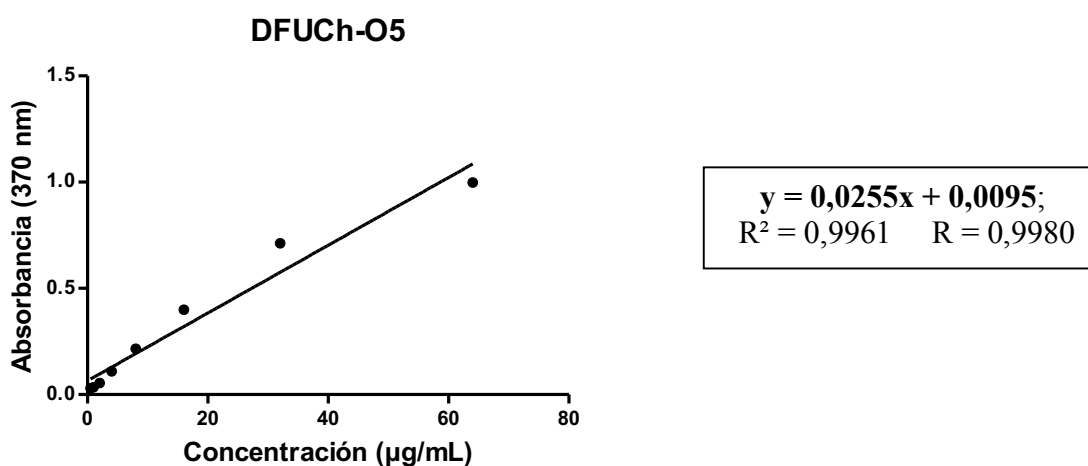
## Caracterización farmacocinética de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

### 11. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PERMEABILIDAD DE DFUCH-O5 Y DFUCH-P4

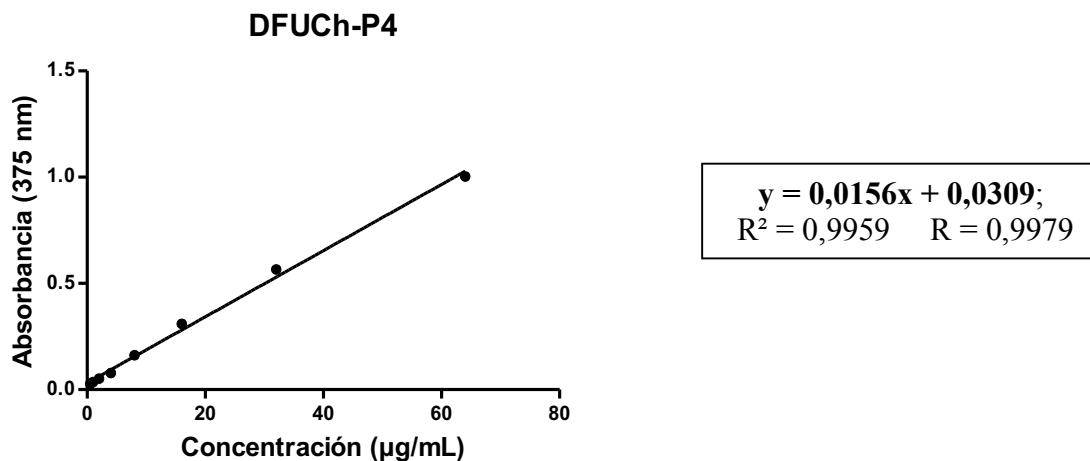
#### a. MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE DFUCH-O5 Y DFUCH-P4.

Para la determinación del porcentaje de permeabilidad y el porcentaje de unión a albúmina es necesario cuantificar los compuestos en agua. Se realizó un barrido espectrofotométrico entre 200-600 nm para establecer los peaks absorbancia a una concentración definida. Se determinó que los compuestos presentan máximos de absorbancia a 370 nm para DFUCh-O5 y a 375 nm para DFUCh-P4. Estas longitudes de onda se seleccionaron para generar curva de calibrado.

Para la curva de calibrado, se prepararon concentraciones de 64, 32, 16, 8, 4 y 2 µg/mL de ambos derivados. Se determinó la absorbancia de las soluciones, obteniéndose la siguiente curva de calibrado (Figura 24 y 25). Los datos fueron procesados mediante el software GraphPad Prism v4.01.



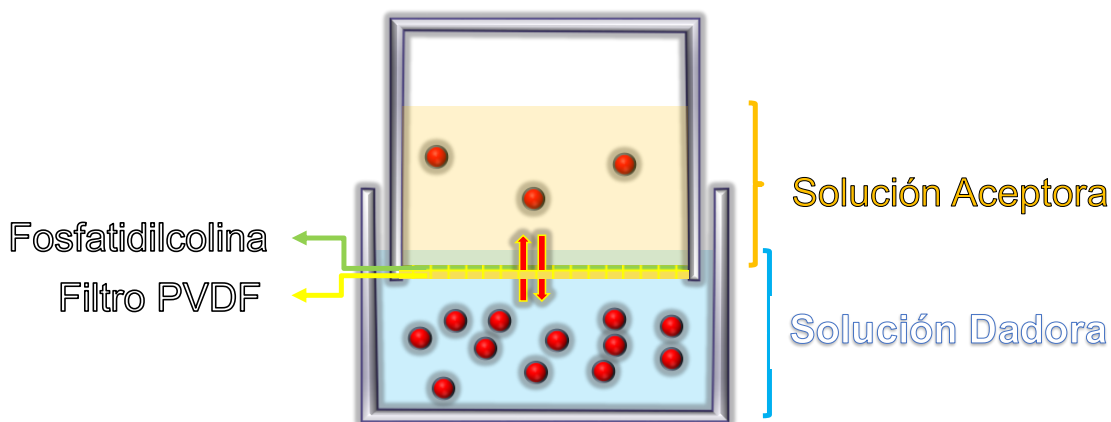
**Figura 24.** Curva de calibrado absorbancia v/s tiempo de DFUCh-O5.



**Figura 25.** Curva de calibrado absorbancia v/s tiempo de DFUCh-P4.

### b. Ensayo PAMPA

Mediante el modelo de permeabilidad con membranas artificiales en paralelo (del inglés parallel artificial membrane permeation assay, PAMPA), fue evaluada la capacidad de los derivados para atravesar pasivamente una monocapa lipídica, para así estimar si los fármacos pueden ser absorbidos por transporte pasivo. Este sistema se desarrolla en placas de 96 pocillos en donde se coloca la solución dadora (figura 26), un filtro en donde se colocará la solución de fosfatidilcolina en dodecano para generar el modelo de membrana celular, arriba de este filtro se encuentra el solución aceptora (figura 26) [106].



**Figura 26.** Esquema del sistema de PAMPA.

Se realizó el ensayo PAMPA para determinar el porcentaje de permeabilidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, los valores de absorbancia obtenidos se muestran a continuación:

**Tabla 30.** Valores de absorbancias obtenidos en la realización de PAMPA para DFUCh-O5 y DFUCh-P4. (n=4).

Tiempo (horas)	Absorbancia de DFUCh-O5 Compartimiento		Absorbancia de DFUCh-P4 Compartimiento	
	Dador	Aceptor	Dador	Aceptor
0	1,181±0,165	0±0,000	0,515±0,211	0±0,000
2	0,392±0,066	0,0062±0,004	0,225±0,069	0,028±0,003
4	0,180±0,051	0,0206±0,006	0,050±0,003	0,030±0,004

Los resultados obtenidos (Tabla 29) indican que la absorbancia de los compuestos es variable. Al comparar el valor de la absorbancia del compartimiento dador no coincide con la absorbancia determinada a tiempo 0, además la sumatoria de las absorbancias de los compartimientos aceptor y dador no coinciden con la absorbancia del compartimiento dador a tiempo 0. Esto indica que no existía la misma cantidad de compuesto al inicio y a las 2 horas. En base a los resultados obtenidos se realizó un estudio cinético de absorbancia a través del tiempo con el fin de observar la estabilidad de los compuestos a la longitud de onda que se realizó la curva de calibración en iguales condiciones (37 °C, pH ≈ 7, 2 h, 25 µg/mL, solvente: agua) a las utilizadas en el ensayo PAMPA. A continuación, en la Tabla 31 observan valores de absorbancia obtenidos:

**Tabla 31.** Estudio cinético de degradación para DFUCh-O5. (n=4).

Tiempo en minutos	Absorbancia observada
0	0.234±0.009
5	0.234±0.006
10	0.233±0.008
20	0.183±0.006
30	0.160±0.009
40	0.139±0.009
50	0.122±0.008
60	0.108±0.008

Los resultados obtenidos (Tabla 30) indicaron que en las condiciones del ensayo (37°C, pH ≈7, 2 h, 25 µg/mL, solvente: agua) la absorbancia de los compuestos disminuye gradualmente con el tiempo, esto puede deberse a secuestro o interacción del compuesto con la membrana. Este análisis muestra que mediante esta técnica no es posible cuantificar el porcentaje de permeabilidad de los compuestos.



## 12. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE UNIÓN A ALBÚMINA.

Se procedió a realizar la determinación del porcentaje de unión a albumina de los derivados a través del ensayo de diálisis al equilibrio para DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

La validación del método se muestra en el **Anexo 1**. Para la medición espectrofotométrica se consideró que el equilibrio se alcanza luego de obtener 3 medidas con valores sin diferencias significativas. El estado estacionario se alcanzó transcurridas 7,5 h.

A continuación se exhibe el perfil de concentraciones de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 (Figura 27).

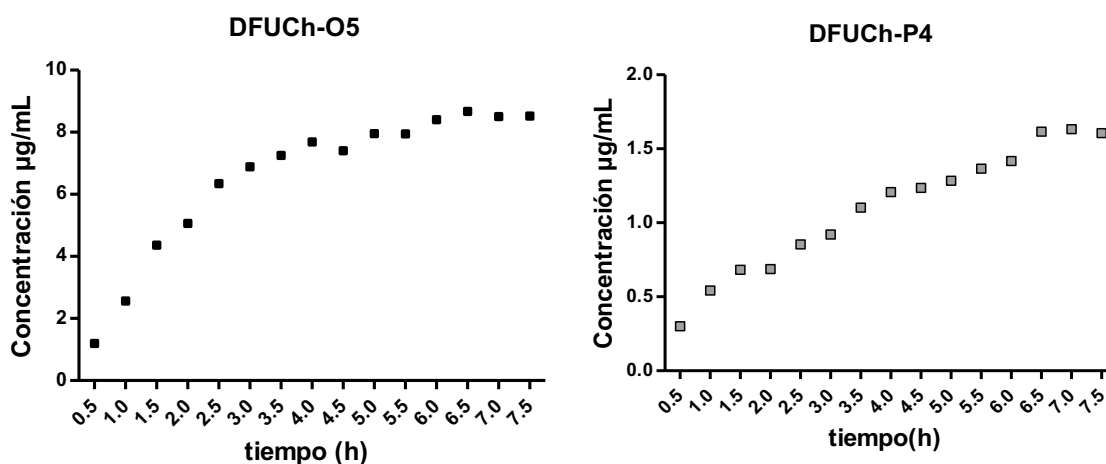


Figura 27. Concentración compuestos v/s tiempo en el ensayo de “Diálisis al equilibrio”.

El porcentaje de unión a albúmina se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\%F_U = \left( \frac{F_T - F_L}{F_T} \right) * 100$$

Donde:

% Fu = porcentaje compuesto unido a albúmina

F<sub>T</sub> = mg compuesto total

F<sub>L</sub> = mg compuesto libre

El compuesto libre estará dado por el promedio de las últimas 3 mediciones del experimento, esta absorbancia será interpolada en las curvas de calibrado previamente preparadas para ambos derivados, obteniéndose así la cantidad en mg de compuesto libre. El compuesto total estará dado por la cantidad en mg de compuesto utilizado en el experimento. Se utilizó 1,2 g de compuesto en 6 mL de solución. Esta cantidad se pudo obtener debido a la interacción inmediata que se establece entre el compuesto y la proteína, mejorando la solubilidad de ambos derivados.

**Tabla 32.** Porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 y DFUCh-P4. *n* =3

	<b>DFUCh-O5</b>	<b>DFUCh-P4</b>
<b>Fármaco Total (mg)</b>	1200	1200
<b>Fracción Libre (mg)</b>	0,180	0,034
<b>Fracción Unida (mg)</b>	1,020	1,162
<b>% de unión a albumina</b>	<b>84,99 ± 2,64</b>	<b>97,18 ± 2,32</b>

Estos resultados muestran que ambos fármacos poseen una alta unión a proteínas plasmáticas (porcentaje de unión a albumina > 80 %) [90], DFUCh-O5 85 % y DFUCh-P4 97 %. Para explicar las diferencias en los porcentajes de unión a albumina de los derivados, se realizaron estudios de Docking, con albumina humana (*PDB N°: 2BX8*) y DFUCh-P4 o DFUCh-O5. Se puede evidenciar que establecen diferentes interacciones fisoquímicas, el derivado DFUCh-O5 interacciona con la Lisina-439 y el residuo de arginina-194 (Anexo 5, Figura A11). DFUCh-P4 también establece 2 interacciones con residuos de arginina en las posiciones 217 y 194 (Anexo 5, Figura A10). Al analizar las energías obtenidas encontramos valores de -3.47 kcal/mol para DFUCh-O5 y -5,06 kcal/mol para DFUCh-P4, por lo que se puede concluir que el complejo DFUCh-P4-Albumina está más favorecido que el formado con DFUCh-O5 (Anexo 5).

El valor determinado para DFUCh-O5 indica que el 85% de la fracción de que alcance la sangre, circulará unido a albumina, la fracción restante teóricamente podrá atravesar tejidos, acceder a su blanco y ejercer su efecto [92]. Mediante este ensayo podemos evidenciar que la interacción con la albumina de los compuestos

es reversible, ya que la metodología propicia la interacción forzada de ambos compuestos al inicio del experimento. Finalmente, se comprueba que los derivados se ceden desde la albumina a través de un gradiente de concentración.

En la *Sección 4 Resultados y Discusión*, pudimos comprobar que los valores observados en este ensayo correlacionan con los resultados del estudio de la actividad antibacterianas de los compuestos en presencia de albumina, y también que a pesar de los altos porcentajes de unión a albumina exhibidos, queda disponible una fracción para ejercer la acción.

Estos resultados a futuro, nos permitirán seleccionar la dosis a administrar en ensayos *in vivo*, para estudiar la efectividad y toxicidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

### 13. DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD *in vivo* DE DFUCh-05 Y DFUCh-P4, SOBRE UN MODELO DE INFECCIÓN SISTÉMICA POR *S. aureus* Y *E. faecalis* EN LARVAS DE *Galleria mellonella*.

*Galleria mellonella* (polilla de la cera o la polilla del nido de abeja) se ha introducido como un modelo alternativo para estudiar las infecciones microbianas [63]. Este es un insecto del orden Lepidoptera y de la familia *Pyralidae* (polillas de hocico). Esta especie sufre 2 metamorfosis a lo largo de su vida. Comienza siendo larvas que son clasificadas en distintos estadios dependiendo de su tamaño, desde el estadio 1 al 7. Luego del estadio 7 la larva entra en estado de pupa y finalmente se convierte en polilla. Las larvas utilizadas estaban en estadios 6 y 7, con un tamaño de aproximado de 2 - 2,5 cm de largo. En este modelo se usa la oruga o larva de la polilla [107] cuyo ciclo de vida es de 21 días (Figura 28). Si comparamos el modelo murino con el de *G. mellonella*, las larvas son económicas y no requieren equipamiento de laboratorio para mantenerlas, su corto periodo de vida las hace excelentes para obtener resultados de alto rendimiento y muy importante es el tema ético, ya que las larvas no necesitan de autorización por un comité de ética para su uso [107]. Otro punto a favor es que las larvas de *G. mellonella* pueden sobrevivir a 37°C, lo que nos permite reproducir esa condición fisiológica humana para la evaluación de nuevos antibacterianos [107].



14.

**Figura 28 .** *G. mellonella* (polilla de la cera). Su desarrollo larvario se compone de siete estadios, luego de eso pasan estado de transición y latencia (pupa).

Otro de los factores que hace a *G. Mellonella* un buen modelo es su sistema inmune, dividido respuestas celulares y humorales. La respuesta celular está

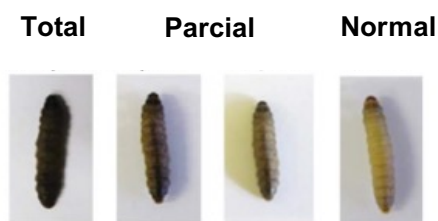
mediada por las células fagocíticas, denominadas hemocitos. Estos se encuentran dentro de la hemolinfa, que funciona de forma análoga a la sangre de mamíferos. Estas células no sólo están involucradas en la fagocitosis, sino también en la encapsulación y la coagulación. Por su parte, la respuesta humoral se compone por moléculas efectoras solubles que inmovilizan o matan al patógeno y que incluye el complemento como las proteínas, la melanina y péptidos antimicrobianos[108]

En un principio el modelo de infección de *G. mellonella* fue utilizado para determinar virulencia bacteriana y su evolución en el tiempo; sin embargo, en los últimos 6 años se ha utilizado como un modelo de efectividad antibacteriana *in vivo* alternativo al modelo murino debido a las ventajas mencionadas [63, 74-76, 107, 109]. Los nuevos antibacterianos son evaluados en primera instancia *in vitro* para determinar su eficacia y potencial toxicidad. Con el tiempo, los candidatos tendrán que ser evaluados en un modelo *in vivo* que por lo general es el modelo murino y luego su potencial aplicación en seres humanos [63]. Las pruebas *in vivo* son importantes para identificar la posible pérdida de actividad debido a factores del huésped, por ejemplo, la degradación por enzimas del huésped y el efecto de las condiciones fisiológicas tales como temperatura, osmosis o pH [110]. Las larvas de *G. mellonella* además pueden ser inyectadas con precisión a dosis definidas de bacterias [107].

El modelo *G. mellonella* es una alternativa sencilla y de bajo costo para la rápida evaluación de la eficacia del antibacteriano *in vivo* y reduce la probabilidad de que un antibacteriano que se comportó bien en los estudios *in vitro* no tenga éxito en un modelo *in vivo* [63].

Durante los experimentos se controlaron factores que generan estrés en las larvas; la luz, la manipulación excesiva, los cambios constantes de temperatura y la humedad. Los signos de estrés que se observaron durante los ensayos fueron, oscurecimiento parcial y total del cuerpo de la larva, este fenómeno se conoce en entomología como melanización (Figura 29), y está relacionado con la activación del sistema inmune [108]. Cabe señalar que durante este proceso la larva no pierde funcionalidad. Otros rasgos que se pudieron observar son hiperactividad y

aceleración de la transformación a pupa [63]. Cuando se evidenciaban estos fenómenos previos al ensayo, lo especímenes eran descartados.



**Figura 29.** Niveles de melanización de las larvas.

De acuerdo a los reportado por Ramarao y col. [107], definimos la muerte de la larva en los siguientes estados; Melanización total; Melanización parcial u oscurecimiento + ausencia de respuesta a estímulo; o pérdida de turgencia e inmovilidad de la larva (Figura 29).

Para implementar el modelo de infección sobre larvas de *G. mellonella*, y poder evaluar efectividad *in vivo* de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, se plantearon los siguientes sub-objetivos:

- a) Elección método de infección de larvas de *G. mellonella*.
- b) Infección sistémica de larvas de *G. mellonella* por *S. aureus*.
- c) Infección sistémica de larvas de *G. mellonella* por *E. faecalis*.
- d) Desarrollo formulación inyectable de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
- e) Determinación de la toxicidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre larvas de *G. mellonella*
- f) Evaluación de la efectividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre larvas de *G. mellonella* infectadas con *S. aureus*.
- g) Evaluación de la efectividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre larvas de *G. mellonella* infectadas con *E. faecalis*.

### a) ELECCIÓN METODO DE INFECCIÓN

Diversos artículos reportan la utilización de larvas de *G. mellonella* como especies aptas para generar modelos de infección bacterianos [63, 74-76, 107, 109]. Dentro de estos reportes, se utilizan varios métodos para la administración del inóculo bacteriano, desde la alimentación forzada, hasta la inyección directa a la hemolinfa por diversas vías [107]. Para estudiar la correcta administración del inóculo a las larvas, se utilizó azul de Evans, un colorante polar que permite ver como se distribuye el inóculo en la hemolinfa de la larva. Se estudiaron 2 grupos de 3 larvas, al primero se le inyectaron 10  $\mu$ l de una solución de azul de Evans 200  $\mu$ g/mL con una jeringa Hamilton. Al segundo se le administraron 10  $\mu$ l de la misma solución azul de Evans por alimentación forzada, esta se hizo aproximando la aguja a la estructura bucal de la larva, esto se mantuvo hasta que la larva absorviera toda la gota.

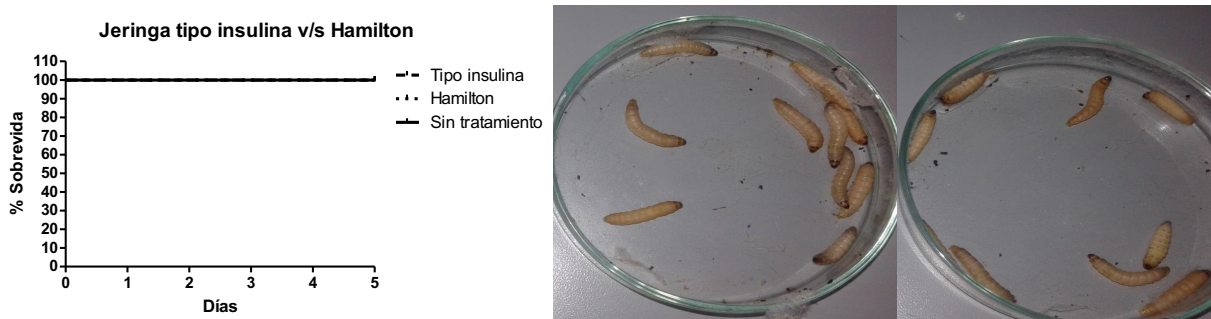


**Figura 30.** Larvas de *G. mellonella* inoculadas con 10  $\mu$ L de una solución 200  $\mu$ g/mL de azul de Evans (*a la izquierda*) versus Larvas de *G. mellonella* alimentadas con 10  $\mu$ L de una solución 200  $\mu$ g/mL de azul de Evans (*a la derecha*).

Se puede apreciar en la Figura 30, que la inyección del colorante logra una distribución homogénea en la hemolinfa de la larva, no así la alimentación forzada del colorante, en donde no se logra visualizar la tinción de la hemolinfa con el colorante.

Establecido el método de administración, se probaron dos dispositivos; Jeringa insulina de autoadministración comercial (Beckton-Dickenson©) y Jeringa

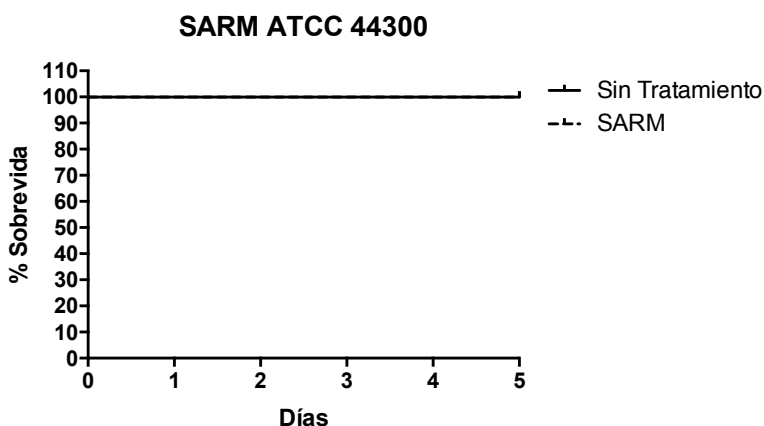
hamilton de punta biselada(Hamilton Co.). Se estudiaron 2 grupos de 10 larvas, uno inoculadas con 50  $\mu$ L de una solución de búfer fosfato (PBS, *por sus siglas en inglés*) con una jeringa de insulina y 50  $\mu$ L solución de PBS con una jeringa Hamilton (Figura 31). Se logró evidenciar que el tipo de jeringa no influencia en la sobrevivida de los grupos utilizados. Se definió utilizar la jeringa tipo Hamilton por la facil manipulación.



**Figura 31.** Porcentaje de sobrevivida de larvas de *G. mellonella* inoculadas con 50  $\mu$ L de PBS con jeringa Hamilton v/s 50  $\mu$ L de PBS con jeringa insulina (*izquierda*). Experimento realizado por duplicado. Larvas de *G. mellonella* inoculadas con 50  $\mu$ L de PBS con una jeringa Hamilton (*Centro*) v/s 50  $\mu$ L de PBS con una jeringa de insulina (*derecha*) a las 24 horas de incubación.

### b) INFECCIÓN SISTÉMICA POR *S. aureus* SOBRE LARVAS DE *G. mellonella*.

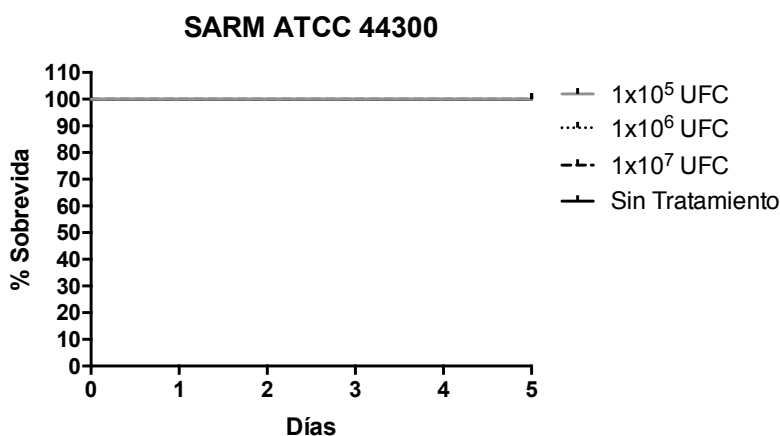
En primer término, se probó infectar las larvas (n=10) de *G. Mellonella* con un inoculo de  $4 \times 10^6$  UFC total de SARM ATCC<sup>®</sup> 43300 de acuerdo a lo reportado por Desbois *et al.*[76] Los resultados se muestran a continuación en la Figura 32.



**Figura 32.** Porcentaje de sobrevivida de larvas de *G. mellonella* inoculadas con de  $4 \times 10^6$  UFC total de SARM ATCC<sup>®</sup> 43300. (n=10)



Se evidenció que la cepa utilizada no afectó la sobrevivencia de las larvas, en las condiciones replicadas de acuerdo a lo reportado por Desbois *et al.* [76]. Debido a esto, se realizó un experimento con inóculos a diferentes concentraciones de SARM ATCC® 43300, con el fin de lograr la infección de las larvas. (Figura 33)

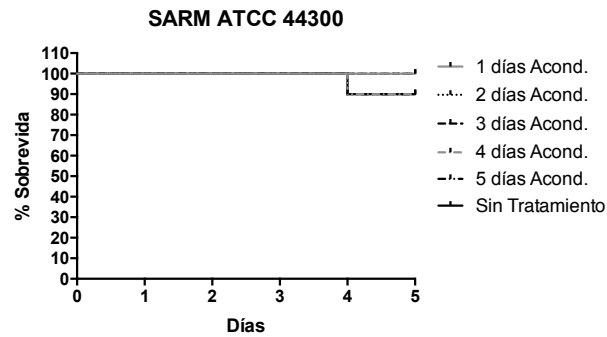


**Figura 33.** Porcentaje de sobrevivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas con  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFC totales de SARM ATCC® 43300. (n=10)

Se evidenció que ninguno de los inóculos pudo alcanzar una sobrevivencia menor o igual al 20% a las 72 horas de realizada la inoculación, porcentaje definido como éxito de la infección por Harding y col. [109]

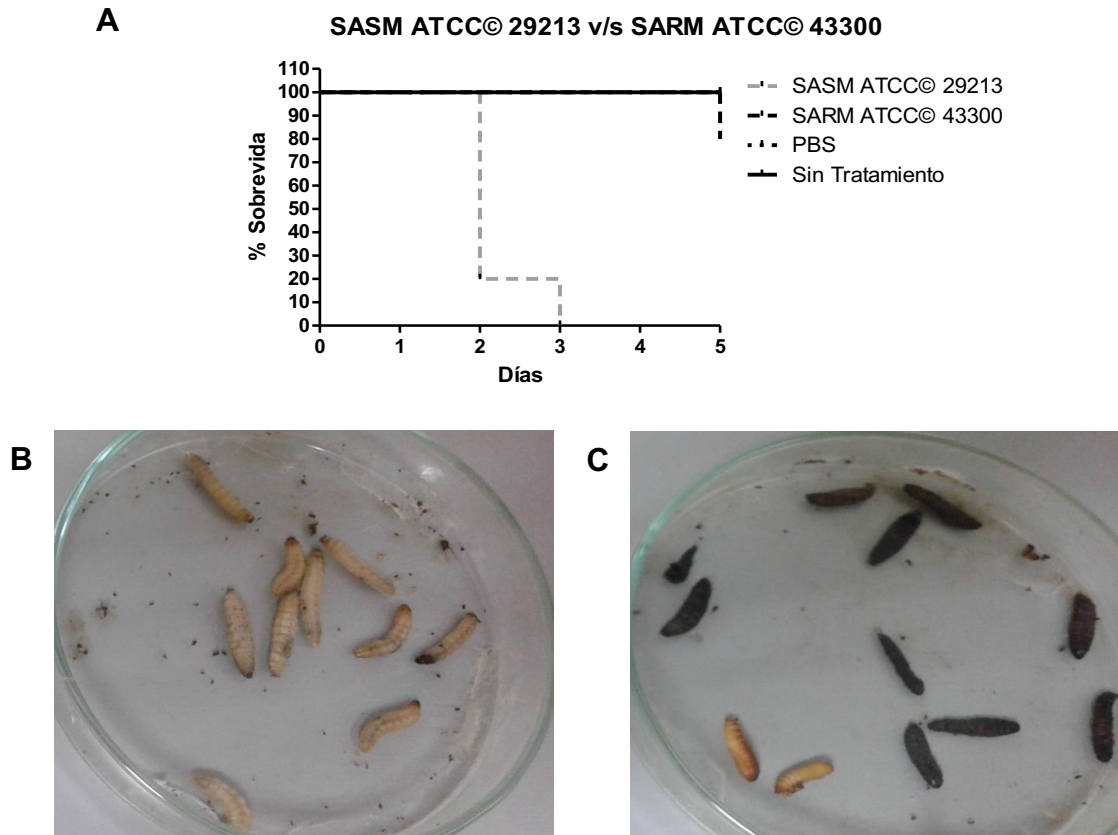
De acuerdo a estos resultados, se buscó acondicionar la cepa a *G. mellonella*, para esto se inyectaron larvas con  $4 \times 10^6$  UFC totales SARM ATCC® 43300, a las 24 horas se sacrificó la larva, se extrajo su hemolinfa, y esta se suspendió en suero fisiológico a 37°C. De la suspensión resultante se inyectaron a un nuevo grupo de larvas. Una muestra de suspensión resultante se sembró en placas de agar Mueller-Hinton I para verificar la viabilidad de las bacterias inyectadas previamente en las larvas. Posteriormente se repitieron los pasos antes mencionados por 5 días.

Finalmente, se observó que las bacterias extraídas desde la hemolinfa permanecían viables. A pesar de esto, ninguna de los inóculos extraídos de hemolinfa de SARM ATCC® 43300, logró la infección significativa de las larvas de *G. mellonella* (los grupos 4 días Acond.; 5 días Acond.; y sin tratamiento, mostraron un 90% de sobrevivencia al Día 5) (Figura 34).



**Figura 34.** Porcentaje de sobrevida de larvas de *G. mellonella* inoculadas con diferentes inóculos de SARM ATCC® 43300. (n=10)

De acuerdo a estos resultados, se optó cambiar la cepa por SASM ATCC® 29213 disponible en el laboratorio, los resultados se muestran a continuación (Figura 35).



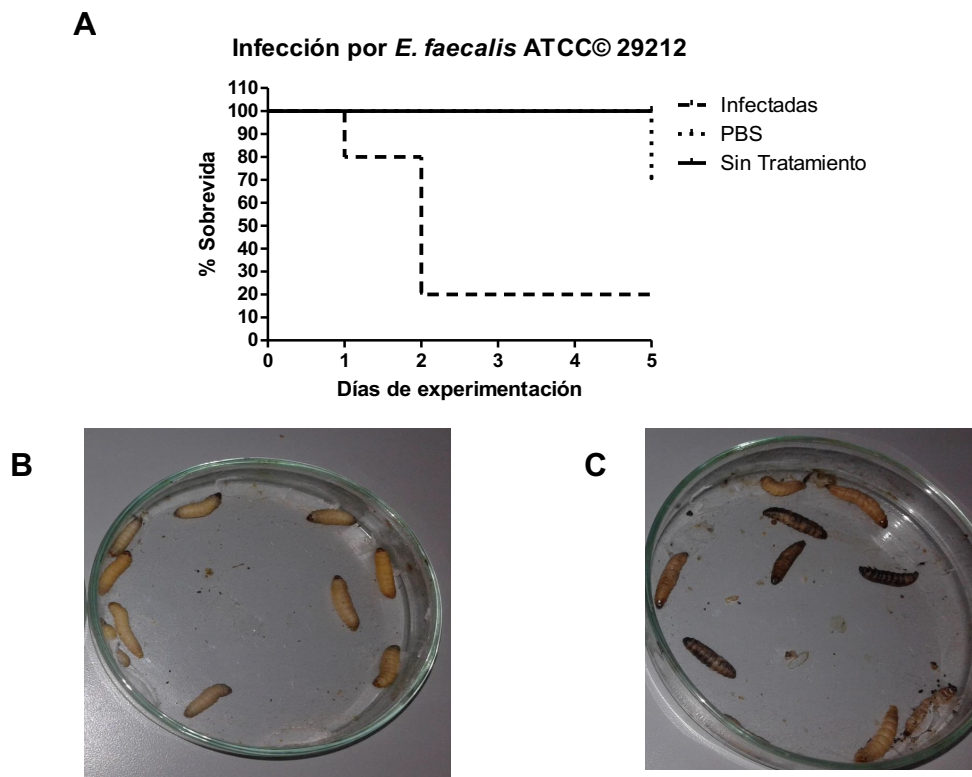
**Figura 35. A.** Porcentaje de sobrevida de larvas de *G. mellonella* inoculadas con una solución de PBS v/s suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de SARM ATCC® 43300 v/s suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de SASM ATCC® 29213. **B.** Larvas de *G. mellonella* inoculadas con suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de SARM

ATCC® 43300 a las 48 horas C. Larvas de *G. mellonella* inoculadas con suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC/mL de SASM ATCC® 29213 a las 48 h de incubación.

Se evidenció que la cepa SASM ATCC® 29213 afecto negativamente la sobrevivida del grupo tratado con esta. A las 72 horas no hubo sobrevivida el grupo infectado por SASM. En cambio, la cepa de SARM no afecto la sobrevivida de las larvas. De acuerdo a esto, para evaluar la efectividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, se utilizó la cepa SASM ATCC® 29213.

### c) INFECCIÓN SISTÉMICA POR *E. faecalis* SOBRE LARVAS DE *G. mellonella*.

Se estudiaron 2 grupos de 10 larvas, uno inoculadas con una solución de PBS como control, y el otro grupo inoculado con una suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de *E. faecalis* ATCC® 29212. Se observa que la suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC/mL de *E. faecalis* ensayado logra la infección de larvas de *G. mellonella* según lo definido por Maekawa y col. [111].



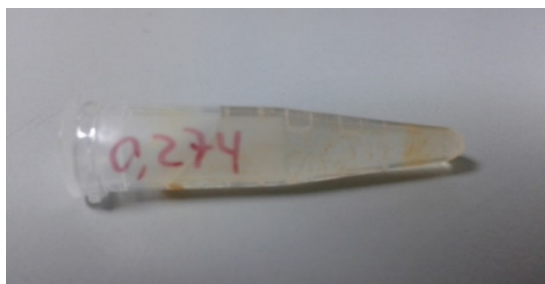
**Figura 36.** A. Porcentaje de sobrevivida de larvas de *G. mellonella* inoculadas con una solución de PBS v/s suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de *E. faecalis* ATCC® 29212. B. Larvas de

*G. mellonella* inoculadas con suspensión de bacterias de PBS a las 48 horas **C.** Larvas de *G. mellonella* inoculadas con suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de *E. faecalis* ATCC® 29212 a las 48 horas de incubación.

#### **d) DESARROLLO FORMULACION INYECTABLE DFUCH-O5 y DFUCH-P4.**

Los compuestos DFUCH-O5 y DFUCH-P4, tiene un pobre solubilidad acuosa. Una vez alcanzadas concentraciones superiores a 64  $\mu\text{g/mL}$  son inestables en agua con 2% DMSO si se mantienen por más de 5 min a temperatura ambiente, después de este tiempo se forman precipitados que pueden redisolverse con agitación y calor. De acuerdo a esto, se buscó un vehículo que permitiera solubilizar o suspender de forma estable los compuestos en estudio, y además debe ser inocuo para la larva.

La glicerina, es un solvente polar utilizado en tecnología farmacéutica para generar formulaciones de compuestos de alto peso molecular, por su poder tensoactivo y estabilizante [111]. En primer término, se probó utilizar solo glicerina para disolver el compuesto (Figura 37).



**Figura 37.** DFUCH-P4 en glicerina.

Se evidencia que DFUCH-P4 no es compatible con glicerina, ya que, se observan precipitados de color naranja, los cuales no se pueden disolver con agitación ni calor. De acuerdo a esto, se intentó disolver el compuesto en DMSO, replicando el protocolo de disolución aplicado durante ensayos anteriores. Para eso el compuesto se disuelve en DMSO, luego se diluye en Glicerina conservando solo un 2% DMSO en la solución final (Figura 38).

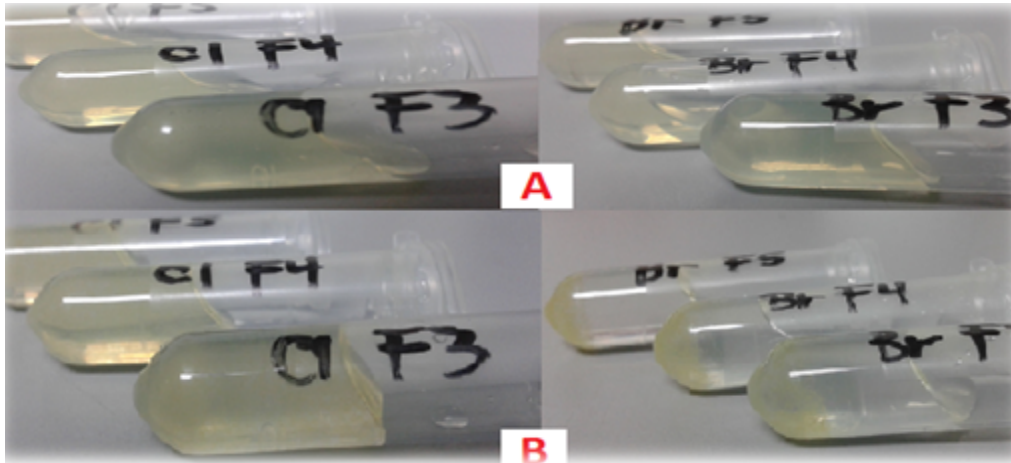


**Figura 38.** DFUCH-O5(Br) y DFUCH-P4(Cl) en 2% DMSO + 98% Glicerina.

Se puede apreciar en la figura 38 que ambos compuestos se disuelven en la mezcla DMSO/glicerina, se observa una suspensión homogénea. Se realizó un estudio de estabilidad por 24 horas; 100% de humedad, condiciones estáticas y a 37°C. Se observó que los compuestos permanecen estables. La suspensión resultante tiene una alta viscosidad, lo que genera una limitante al momento de llenar la jeringa Hamilton y también en la posterior inyección del contenido. De acuerdo a esto, se debió variar la viscosidad de la formulación utilizando distintas proporciones de agua y glicerina. Para esto, los compuestos fueron disueltos en DMSO y luego diluyendo en distintas formulaciones que contenían variadas proporciones glicerina y agua. Las formulaciones preparadas fueron:

- F3: 40% glicerina + 60% agua.
- F4: 50% glicerina + 50% agua.
- F5: 60% glicerina + 40% agua.

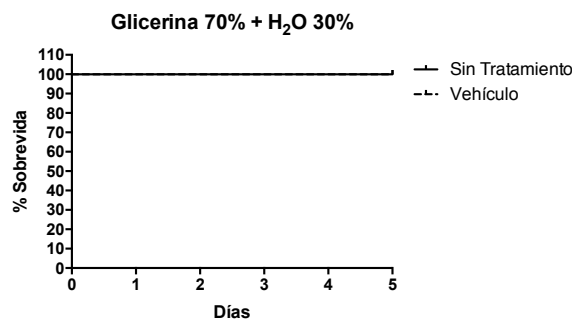
En la Figura 39 se aprecian las suspensiones correspondientes a las distintas formulaciones. Transcurridas 24h, en todas las formulaciones, ambos compuestos precipitaron, pero con agitación moderada el precipitado se puede suspender.



**Figura 39.** A. DFUCH-P4 (CI) y DFUCH-O5(Br) suspendidos en F3, F4 y F5 a las 0 horas. B. DFUCH-P4(CI) y DFUCH-O5(Br) suspendidos en F3, F4 y F5 a las 24 horas.

Se puede notar una relación directa entre la proporción de glicerina y la viscosidad de la formulación obtenida. Además, se evidencia que la estabilidad del compuesto es mayor, en un mayor proporción de glicerina. Esto se puede apreciar en la **Figura 39B**, donde se observa en el compuesto DFUCH-O5 en la formulación F3 existe mayor precipitado que en la F5, lo que demuestra el aumento de estabilidad directamente relacionada con la cantidad de glicerina contenida en la formulación. De acuerdo a esto se buscará utilizar un vehículo con mayor proporción de glicerina.

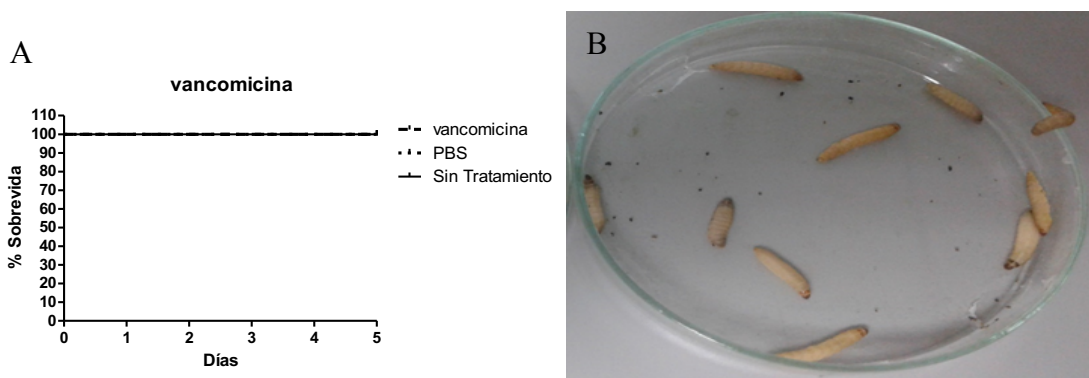
Se optó por utilizar un vehículo compuesto de 70% de glicerina y 30% de agua. El cual se ensayó sobre larvas. En la figura 40 se puede apreciar que el vehículo formulado no afecta la viabilidad de las larvas de *G. Mellonella*, por lo que es apto para la administración de los derivados en estudio.



**Figura 40.** Porcentaje de sobrevida de larvas de *G. mellonella* con el vehículo formulado (n=10)

### e) DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE DFUCh-O5 y DFUCh-P4 SOBRE LARVAS DE *G. mellonella*

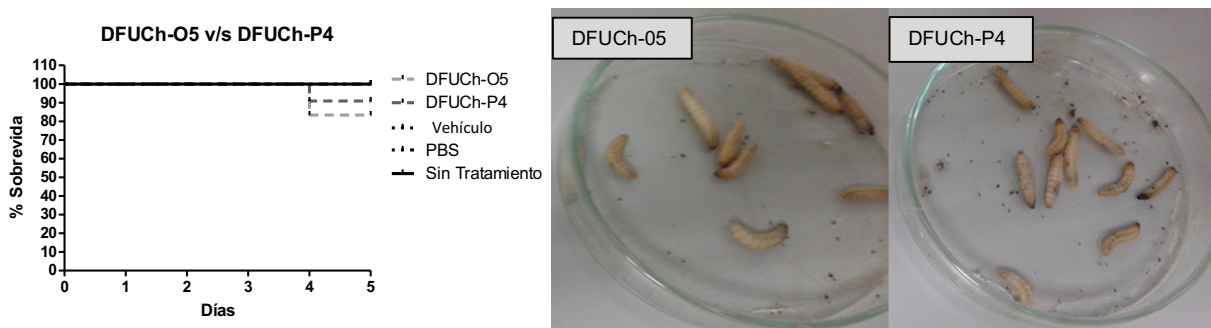
Para estudiar la inocuidad del antibacteriano que utilizaremos como control, se estudiaron 2 grupos de 10 larvas, uno inoculadas con 10  $\mu$ L de una solución de PBS y una dosis de 10mg/kg de vancomicina, concentración reportada por bibliografía para larvas de *G. mellonella* [76]. En la Figura 41, se muestra que vancomicina no afecta la sobrevivencia de larvas de *G. mellonella*. Previo a los ensayos de toxicidad de los derivados, se hicieron estudios para formular un vehículo farmacéutico en el cual se pudiera administrar la dosis de 10 mg/kg (igual dosis que vancomicina) de DFUCh-O5 y DFUCh-P4. Glicerina (30%) + H<sub>2</sub>O (70%) resultó ser un vehículo que no afecta la actividad antibacteriana de los derivados.



**Figura 41. A.** Porcentaje de sobrevivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas con vancomicina. **B.** Grupo de 10 larvas inoculadas con vancomicina a una concentración de 220 $\mu$ g/mL transcurridos 5 días desde el inicio del ensayo.

Se observa una sobrevivencia de las larvas del 100%, por lo que el antibacteriano vancomicina es inocuo(Figura 41).

Para determinar la toxicidad de los compuestos, se estudiaron 4 grupos de 10 larvas, uno inoculadas con 10  $\mu$ l de una solución de PBS, otro 10  $\mu$ L del vehículo donde se inyectará el compuesto, otro grupo será inyectado con una dosis 10 mg/kg de DFUCh-O5 y finalmente un grupo de una dosis 10 mg/kg mL de DFUCh-P4. (Figura 42). Se pudo demostrar que ninguno de los compuestos afecta la sobrevivencia de las larvas, ya que no hay diferencias significativas con el control positivo de sobrevivencia.



**Figura 42. A.** Porcentaje de sobrevivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas con 10  $\mu$ L de una solución de PBS v/s 10  $\mu$ L de una solución del vehículo v/s DFUCh-O5 v/s DFUCh-O5. (n=10)

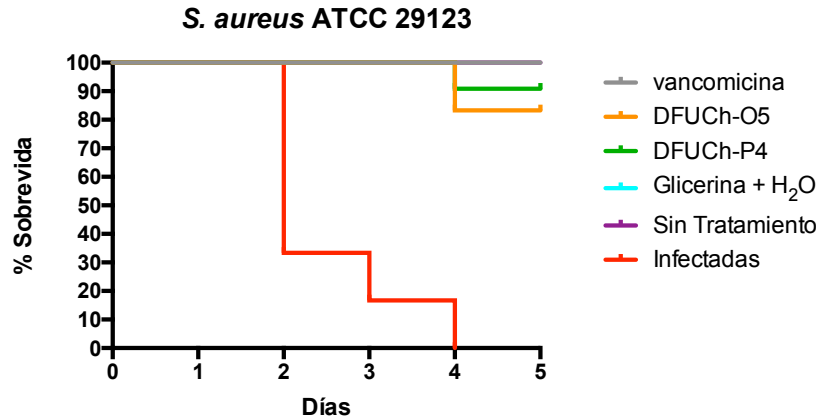
#### **f) EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DFUCh-O5 Y DFUCh-P4 SOBRE LARVAS DE *Galleria mellonella* INFECTADAS CON *S. aureus*.**

La efectividad de los compuestos en estudio fue evaluada con el modelo de *G. mellonella* infectadas *S. aureus* ATCC® 29213. Grupos de 10 larvas fueron inoculados con  $4 \times 10^6$  UFC totales, inóculo suficiente para matar al menos al 90% de las larvas dentro de 72h desde la inoculación (Sección 12b). Transcurridas 2h desde la inoculación de *S. aureus*, se administró a las larvas compuestos DFUCh-O5, DFUCh-P4 y vancomicina a concentraciones de 10 mg/kg.

Los controles validaron el ensayo; el grupo infectado sin ningún tratamiento mostró un 30% de sobrevivencia al tercer día de tratamiento. El grupo al cual solo se le administró el vehículo (Glicerina+H<sub>2</sub>O) no presentó disminución sobrevivencia al quinto día de tratamiento. (Figura 43).

Se observa una sobrevivencia de 80% al día 5 para el grupo tratado con DFUCh-O5. En tanto el tratamiento con DFUCh-P4, es comparable con vancomicina (100% sobrevivencia, Día 5), de esta forma se puede señalar que los derivados no presentan diferencias significativas en su efectividad respecto a vancomicina.





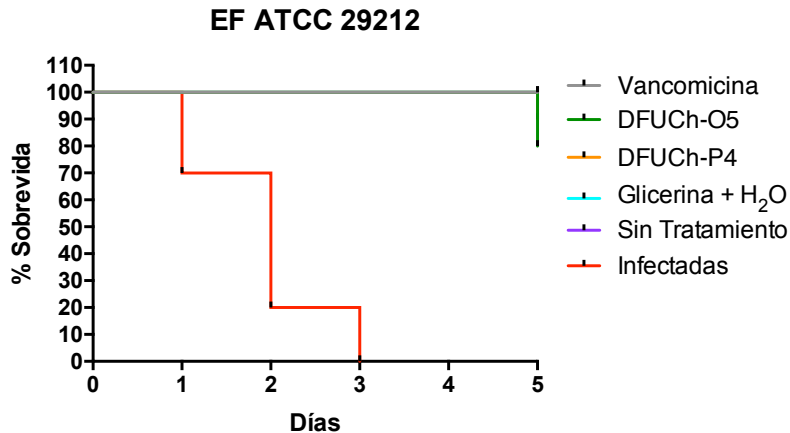
**Figura 43.** Porcentaje de sobrevivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas con 10mg/Kg de vancomicina v/s 10mg/Kg de DFUCh-O5 v/s 10mg/Kg de DFUCh-P4 v/s 10µL Glicerina + H<sub>2</sub>O v/s 10 µL de suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de SASM ATCC<sup>®</sup> 29213. (n=10)

**g) EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DFUCh-O5 Y DFUCh-P4 SOBRE LARVAS DE *Galleria mellonella* INFECTADAS CON *E. faecalis*.**

A continuación, se ensayaron los compuestos sobre el modelo de infección con *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212. Se probó DFUCh-P4 y DFUCh-O5 sobre grupos de 10 larvas fueron inoculados con  $4 \times 10^6$  UFC totales, conteo bacteriano determinado previamente. Transcurridas 2h desde la inoculación, se procedió a inocular larvas con 10µL de los compuestos DFUCh-P4, DFUCh-O5 y vancomicina a concentraciones de 10 mg/kg.

En la Figura 44, se puede apreciar que tanto DFUCh-O5 (80% sobrevivencia, Día 5) como DFUCh-P4 (90% sobrevivencia, Día 5) aparentemente erradican la infección de las larvas previamente infectadas. Comparados con vancomicina (100% sobrevivencia, Día 5) se puede señalar que los derivados tienen una efectividad similar a esta.

Por lo tanto, los compuestos DFUCh-P4 y DFUCh-O5 tienen efectividad equivalente en el modelo con *G. mellonella* frente a *E. faecalis*.



**Figura 44.** Porcentaje de supervivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas con 10mg/Kg de vancomicina v/s 10mg/Kg de DFUCh-O5 v/s 10mg/Kg de DFUCh-P4 v/s 10µL Glicerina + H<sub>2</sub>O v/s 10 µL de suspensión de bacterias de  $4 \times 10^6$  UFC totales de EF ATCC<sup>®</sup> 29213. (n=10)

Las larvas de *G. mellonella* han sido utilizadas anteriormente para estudiar factores de virulencia y patogenicidad de bacterias de relevancia clínica [112-117], así como también han surgido como un modelo eficiente para probar la efectividad de nuevos fármacos antibacterianos [63, 74-76, 107, 109, 111]. En el desarrollo del modelo de infección que utilizamos, no se pudieron replicar los resultados observados por Desbois *et al* [76], ya que no se pudo lograr la mortalidad deseada provocada por la infección con SARM ATCC<sup>®</sup> 43300. El factor que pudo influenciar esta disparidad en los resultados fue que los autores utilizaron la cepa *S. aureus* (Newman), y en este estudio se utilizó una diferente. Relacionado a esto, ambas cepas tienen factores de virulencia distintos [118, 119], que pudieron influenciar en la patogenicidad sobre *G. mellonella* en estado larvario. Otros factores como la temperatura del inóculo o el fitness de la bacteria también pudieron influir pero no se alteraron en este estudio. Se probó acondicionar la cepa en estudio a *G. mellonella*, inoculando en varios pasajes la cepa a la larva, sin resultados favorables. De acuerdo a esto se optó por cambiar a la cepa SAMS ATCC<sup>®</sup> 29213, pudiendo lograr la mortalidad adecuada para ensayar los compuestos. Se utilizó vancomicina como antibiótico control en las dosis reportadas por Desbois y col. [76], con resultados favorables ya que el compuesto previene la muerte inducida por el patógeno inoculado. Estos autores reportaron que las dosis utilizadas para tratar las larvas infectadas eran similares a las que se necesitaban para tratar humanos [76]. Se confirman que el modelo de *G. mellonella* posee utilidad para evaluar la

efectividad in vivo de nuevos agentes antibacterianos. En el caso del modelo de infección por *E. faecalis* ATCC® 29212 se pudieron replicar las condiciones reportadas Maekawa *et al.* [111], ya que en este estudio se utilizó la misma cepa que la reportada por estos autores. Finalmente, no se detectaron diferencias significativas entre la efectividad DFUCh-P4 y DFUCh-O5 sobre los modelos de infección en *G. mellonella* provocado por *S. aureus* o *E. faecalis*, ambos lograron rescatar a las larvas con una efectividad similar al antibiótico control vancomicina. Adicionalmente, se pudo formular un vehículo que permitió aumentar la concentración de los compuestos, y mostró ser inocuo para las larvas. Este paso es fundamental para poder avanzar hacia la utilización de un modelo mamífero, debido a la pobre solubilidad de los compuestos. De acuerdo a esto se proyecta probar la compatibilidad del vehículo con la fisiología murina, como primer paso para probar los derivados.

## 7. CONCLUSIONES

---

En el presente trabajo se buscó estudiar el potencial de los derivados DFUCh-P4 y DFUCh-O5, de avanzar en el desarrollo como fármacos antibacterianos de uso clínico. Para esto, se caracterizó su acción antibacteriana desde el punto de vista farmacodinámico y farmacocinético. De estos estudios se puede concluir:

- DFUCh-O5 y DFUCh-P4 no afectan la viabilidad de células mamíferas; HeLa, SH-SY5Y y H4-II-E-C3, a las concentraciones que son activos como antibacterianos.
- Los derivados tienen una actividad similar a vancomicina sobre los aislamientos clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina. Frente a las cepas de *E. faecium* estudiadas, DFUCh-P4 resultó 64 veces más activo que vancomicina y DFUCh-O5 128 veces más activo que este fármaco.
- Los compuestos poseen un modo de acción bactericida sobre los aislamientos clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina y *E. faecium* resistente a vancomicina.
- Los agentes no tienen efecto post antibiótico significativo sobre las especies *S. aureus* y *Enterococcus* spp. estudiadas.
- La exposición de los derivados a concentraciones fisiológicas de albumina o suero fisiológico, aumentan la CIM de estos sobre SARM y *Enterococcus* sp., debido al alto porcentaje de unión a albumina de los compuestos.
- Al analizar la actividad antibacteriana de los derivados en asociación con antibacterianos de uso clínico, se concluye que no existen interacciones de

relevancia en la asociación de los derivados con vancomicina y linezolid, ni entre los 2 compuestos coadministrados.

- Ambos derivados exhiben potencial de seleccionar poblaciones no susceptibles de *S. aureus* estudiados. Este potencial de selección afecta en mayor proporción la susceptibilidad de la especie a los derivados sustituidos en *para*- analizados.
- Los resultados indican que ambos derivados pueden seleccionar poblaciones de *S. aureus* resistente a meticilina con susceptibilidad disminuida a DFUCh-P4 y DFUCh-O5. Sin embargo, estos cambios en la susceptibilidad de la población estudiada, no se mantienen luego de 3 pasajes.
- DFUCh-P4 y DFUCh-O5 reducen la población de SARM y ERV ensayadas en un 99,9% antes de 2 horas posteriores a la exposición a los compuestos.
- Los derivados son compatibles con un vehículo formulado con glicerina, DMSO y agua. La incorporación de DFUCh-P4 y DFUCh-O5 al vehículo, mejora la solubilidad de los compuestos, y posibilita la administración en un modelo *in vivo*.
- DFUCh-P4 y DFUCh-O5 poseen efectividad similar a vancomicina sobre los modelos de infección en *G. mellonella* provocado por *S. aureus* sensible a meticilina o *E. faecalis*.

## ANEXO 1

### TABLAS DE DATOS UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO POST-ANTIBIÓTICO

**Tabla A1** .Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SARM ®© 43300.

Tiempo (horas)	Log UFC					Diferencia de Log				Parámetros		
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0	C	T	PAE
Control	3.39	3.63	3.90	4.14	4.92	0.24	0.51	0.75	1.53	4	-	-
DFUCh-O5 CIM	3.22	3.32	3.46	3.75	4.58	0.10	0.24	0.53	1.36	-	4	0
DFUCh-O5 2 x CIM	3.01	3.06	3.43	3.90	4.34	0.05	0.42	0.89	1.33	-	4	0
DFUCh-P4 CIM	3.33	3.42	3.54	3.94	4.55	0.09	0.21	0.61	1.22	-	4	0
DFUCh-P4 2 x CIM	3.41	3.46	3.58	3.91	4.56	0.05	0.17	0.5	1.15	-	4	0

Cada valor fue medido en quintuplicado (n=5).

**Tabla A2.** Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SARM 178 clínico.

Tiempo (horas)	Log UFC					Diferencia de Log				Parámetros		
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0	C	T	PAE
Control	2.09	2.49	2.71	3.86	4.12	0.4	0.62	1.77	2.03	3	-	-
DFUCh-O5 CIM	2.19	2.42	2.92	3.87	4.06	0.23	0.73	1.68	1.87	-	3	0
DFUCh-O5 2 x CIM	2.13	2.30	2.37	3.60	3.90	0.17	0.24	1.47	1.77	-	3	0
DFUCh-P4 CIM	1.96	2.34	2.57	3.56	3.91	0.38	0.61	1.6	1.95	-	3	0
DFUCh-P4 2 x CIM	2.09	2.49	2.71	3.86	4.12	0.4	0.62	1.77	2.03	3	-	-

Cada valor fue medido en quintuplicado (n=5).

**Tabla A3.** Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a ESV ATCC® 29212.

Tiempo (horas)	Log UFC					Diferencia de Log				Parámetros		
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0	C	T	PAE
Control	2.97	3.52	4.63	4.82	5.03	0.61	1.66	1.85	2.06	3	-	-
DFUCh-O5 CIM	3.01	3.86	4.56	4.85	4.95	0.85	1.68	1.84	1.94	-	3	0
DFUCh-O5 2 x CIM	2.66	4.11	4.69	4.96	5.07	1.45	2.03	2.3	2.41	-	2	0
DFUCh-P4 CIM	2.98	4.07	4.60	4.88	4.97	1.09	1.62	1.9	1.99	-	2	0
DFUCh-P4 2 x CIM	2.90	4.06	4.67	4.90	5.00	1.16	1.77	2	2.1	-	2	0

### ANEXO 1 (Continuación)

**Tabla A4.** Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a ERV 828 clínico.

Tiempo (horas)	Log UFC					Diferencia de Log				Parámetros		
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0	C	T	PAE
Control	3.26	3.37	3.67	4.52	4.81	0.11	0.41	1.26	1.55	3	-	-
DFUCh-O5 CIM	3.19	3.36	3.63	4.52	4.66	0.17	0.44	1.33	1.47	-	3	0
DFUCh-O5 2 x CIM	3.08	3.10	3.39	4.37	4.43	0.02	0.31	1.29	1.35	-	3	0
DFUCh-P4 CIM	3.19	3.32	3.63	4.53	4.55	0.13	0.44	1.34	1.36	-	3	0
DFUCh-P4 2 x CIM	3.10	3.17	3.41	4.34	4.43	0.07	0.31	1.24	1.33	-	3	0

## ANEXO 2

### VALIDACIÓN MÉTODO PAMPA: DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD PASIVA DEL TIOPENTAL SÓDICO

Se realizó un control utilizando tiopental sódico como control positivo, en el siguiente gráfico se muestran los resultados obtenidos:

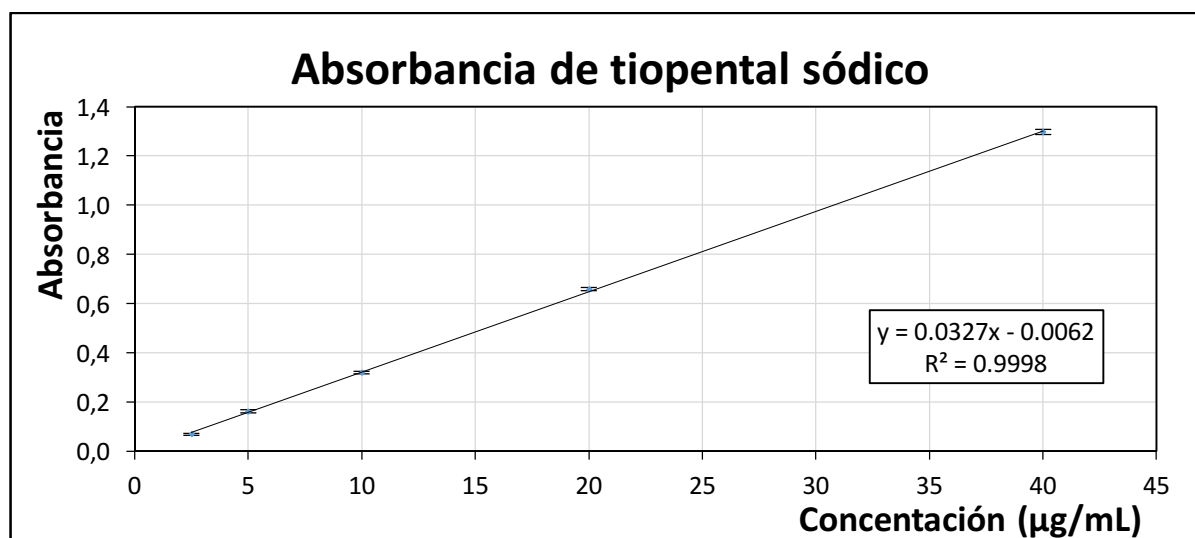


Figura A1. Curva de calibración para tiopental sódico. (n=4).

Se llevó a cabo el PAMPA para la determinación de la permeabilidad de tiopental sódico, al cabo de dos horas se tomaron muestras y con los valores de concentración obtenidos mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en la curva de calibración, se procedió a calcular el porcentaje de fármaco en cada compartimiento mediante la siguiente ecuación:

$$\% P = \frac{A}{D} \times 100$$

Dónde:

%P = Porcentaje de permeabilidad.

A = Concentración (µg/mL) del compartimiento aceptor a tiempo t.

D = Concentración (µg/mL) del compartimiento donador a tiempo cero.



Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

## ANEXO 2 (Continuación)

**Tabla A5.** Absorbancias, concentraciones y porcentaje de permeabilidad para tiopental sódico.

Compuesto	Abs. $t_0$	Abs. $t_t$	Conc. a $t_0$	Conc. a $t_t$	%PP
tiopental	0.67±0.02	0.09±0.004	20.30±1.59	3.37±0.21	19.59±0.29

%, Porcentaje de permeabilidad pasiva. (n=4).

En base a los resultados (**Tabla A5**) obtenidos, el porcentaje de permeabilidad para el tiopental sódico fue de 20 %, esto coincide con datos encontrados en bibliografía que muestran un porcentaje de permeabilidad cercano a 20 %, el cual fue determinado mediante PAMPA [120].

### ANEXO 3

#### VALIDACIÓN MÉTODO DIÁLISIS AL EQUILIBRIO: DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE UNIÓN A ALBUMINA DEL ÁCIDO SALICÍLICO.

Para la cuantificación de este compuesto se debe realizar una reacción colorimétrica, que consiste en la complejación entre el ácido salicílico con nitrato férrico noahidratado (Figura A6 ) que produce un color violeta oscuro en forma inmediata, y que es medido a 534 nm [121].

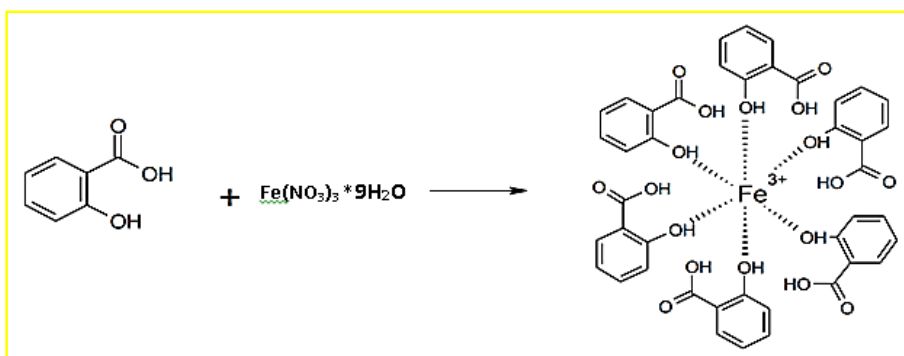


Figura A6 . Fundamento de la reacción para la cuantificación colorimétrica del ácido salicílico.

Primero se procedió a preparar la curva de calibración del ácido salicílico (Figura A7).

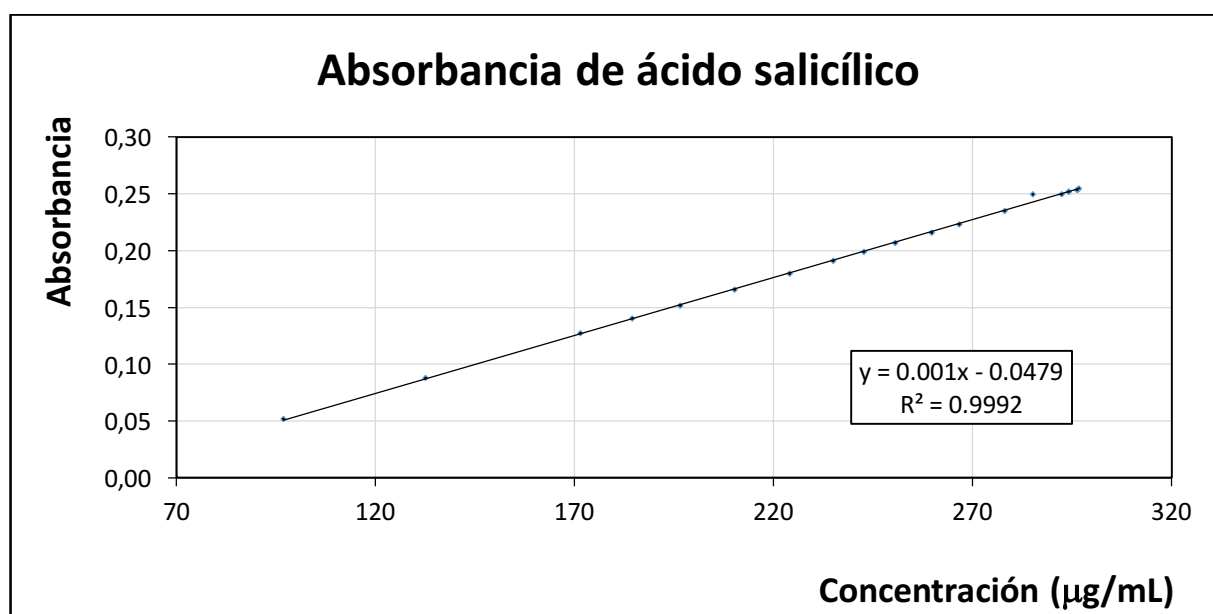
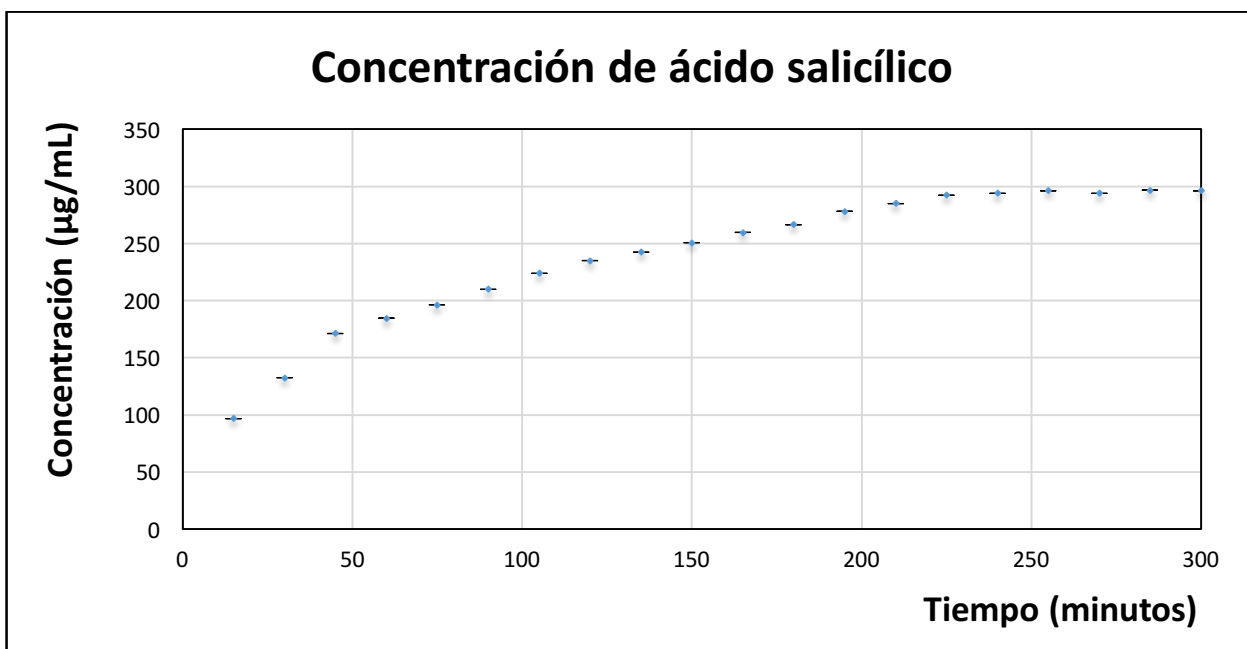


Figura A7. Curva de calibración para ácido salicílico. (n=3)

### ANEXO 3 (Continuación)

A continuación, se muestra el perfil de concentraciones obtenido del ácido salicílico (Figura A8).



**Figura A8.** Curva concentración versus tiempo para ácido salicílico en el ensayo de diálisis al equilibrio. (n=3)

Para el cálculo del porcentaje de unión a albúmina se consideraron los últimos tres valores de concentración en el equilibrio, y mediante las siguientes ecuaciones se procedió al cálculo:

$$F_U = F_T - F_L$$

Dónde:

$F_U$  = masa (mg) de compuesto unido a albúmina.

$F_T$  = masa (mg) de compuesto total.

$F_L$  = masa (mg) de compuesto libre.

$$\% F_U = \left( \frac{F_U}{F_T} \right) \times 100$$

Los datos (Tabla A6), corresponden al cálculo del porcentaje de unión a albúmina obtenidos para ácido salicílico.

### ANEXO 3 (Continuación)

**Tabla A6.** Resumen de datos para el cálculo del porcentaje de unión a albúmina de ácido salicílico (n=3)

Fármaco total (mg)	<b>12,05</b>
Fracción libre (mg)	6,24
Fracción unida (mg)	5,73
% unión a albúmina	48,15±2,13

Mediante el ensayo de diálisis al equilibrio se pudo determinar que el ácido salicílico presentó un 48.1 % de unión a albúmina, esto coincide con datos encontrados en bibliografía que muestran un porcentaje de unión a albúmina del 46 %, el cual fue determinado mediante el ensayo de diálisis al equilibrio [122].

## ANEXO 4

### **DETERMINAR EL ÍNDICE DE MUTACIONES ESPONTÁNEAS DE *S. AUREUS* MULTIRRESISTENTES FRENTE A UNA EXPOSICIÓN AGUDA A DFUCH-O5 y DFUCH-P4.**

**Preparación de las placas:** Se realizó en primer lugar la preparación de las placas MHA con los compuestos a distintas concentraciones, para esto se mezclaron 20mL de MHA más cada compuesto: para DFUCH-O5 a concentraciones de 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM y 16xCIM; para DFUCH-P4 a concentraciones de ¼xCIM, ½xCIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM y 8xCIM; para Vancomicina a concentraciones de ¼xCIM, ½xCIM, 1xCIM, 2xCIM y 4xCIM. Ya preparadas las placas, lo siguiente fue la preparación del inóculo inicial de las cepas *S. aureus* ATCC®29213 y SARM 178. Para esto se suspendió en un tubo de ensayo con agua estéril las bacterias de la cepa y el aislamiento clínico usadas hasta obtener una turbidez de 0.5 McFarland para ambas bacterias. De esta suspensión se agregaron 50µL en todas las placas preparadas para los compuestos en estudio, además se cultivó una placa control que sólo contiene MHA y la suspensión bacteriana para verificar que las bacterias crecen bajo las condiciones usadas en las otras placas.

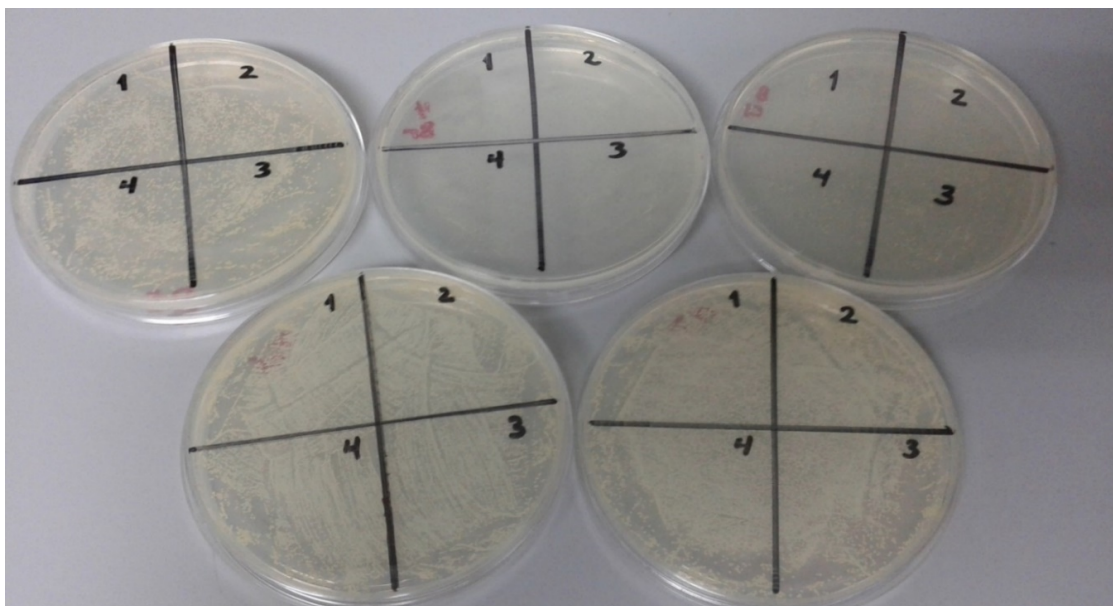
**Ensayo de homogeneidad para el inóculo inicial:** antes de la preparación del inóculo inicial, se determinó la homogeneidad en la distribución de las colonias bacterianas. Para esto se dividieron tres cuadrantes, denominados como SA1, SA2 y SA3, en la placa de agar sangre donde se cultivó la cepa de *S. aureus* ATCC®29213. A un grupo de colonias pertenecientes a cada uno de los cuadrantes se les determinó la CIM siguiendo los protocolos del CLSI [65]. Los resultados son presentados en la Figura A9 y muestran valores de CIM idénticas para los tres compuestos utilizados en los tres cuadrantes, lo que nos indica que existe homogeneidad entre las colonias bacterianas y, por ende, se puede preparar el inóculo inicial tomando colonias bacterianas desde cualquier zona de la placa.

#### ANEXO 4 (Continuación)

**Tabla A7.** Resultados de la distribución de las colonias bacterianas de *S. aureus* ATCC®29213 en la placa de agar sangre.

Cepa bacteriana		SAMS ATCC®29213		
Cuadrante		SA1	SA2	SA3
CIM obtenida por el método de microdilución (µg/mL)	DFUCH-O5	4	4	4
	DFUCH-P4	4	4	4
	Vancomicina	0.5	0.5	0.5

**Ensayo de homogeneidad:** una vez cultivadas las placas con la cepa bacteriana, se dejaron por 24h en la estufa a 37°C. De las 5 placas para cada compuesto a distintas concentraciones, sólo se utilizaron las placas donde hubo crecimiento. Al momento de extraer una muestra desde una determinada zona de la placa MHA cultivada, se verificó si la muestra tomada de distintas zonas de la placa nos brinda el mismo valor en el ensayo de microdilución. Para esto, cada placa cultivada fue dividida en cuatro cuadrantes (ver Figura A9) y se realizó el ensayo de microdilución para cada cuadrante de todas las placas con crecimiento bacteriano. Los resultados del control están expresados en la Tabla 2 e indicaron que las colonias obtenidas de distintos cuadrantes mostraron los mismos valores de CIM, en por lo menos 3 de los 4 cuadrantes.



**Figura A9.** Distribución de los cuadrantes en las placas donde hubo crecimiento en el ensayo de incidencia de mutaciones para los compuestos DFUCH-O5 y DFUCH-P4.

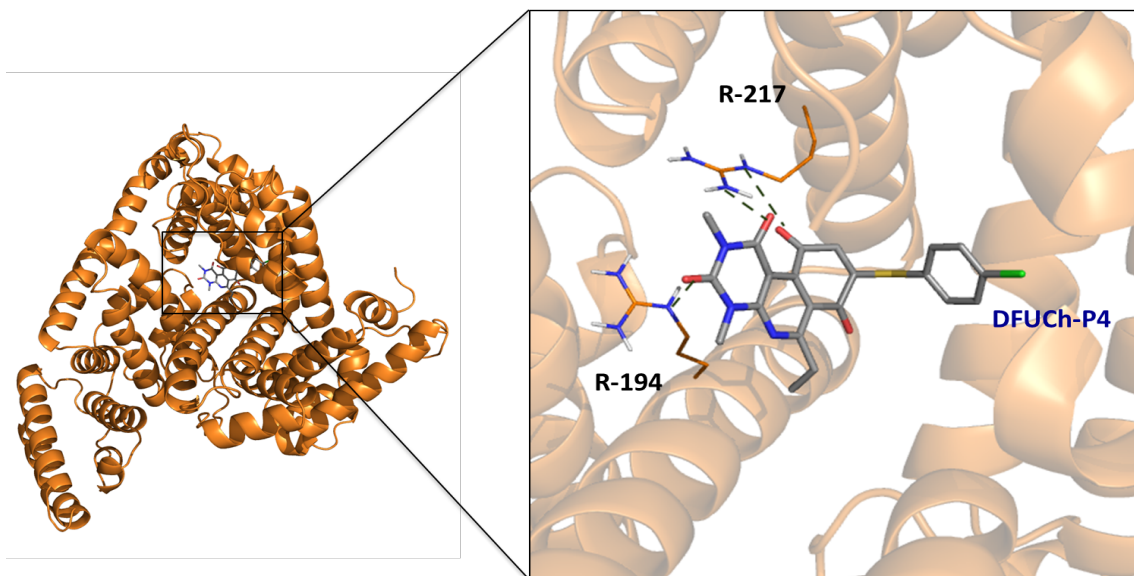
#### ANEXO 4 (Continuación)

**Tabla A8.** Resultados del ensayo de microdilución de colonias de *S. aureus* crecidas en 4 cuadrantes en placas con diferentes concentraciones de los compuestos DFUCH-O5 y DFUCH-P4.

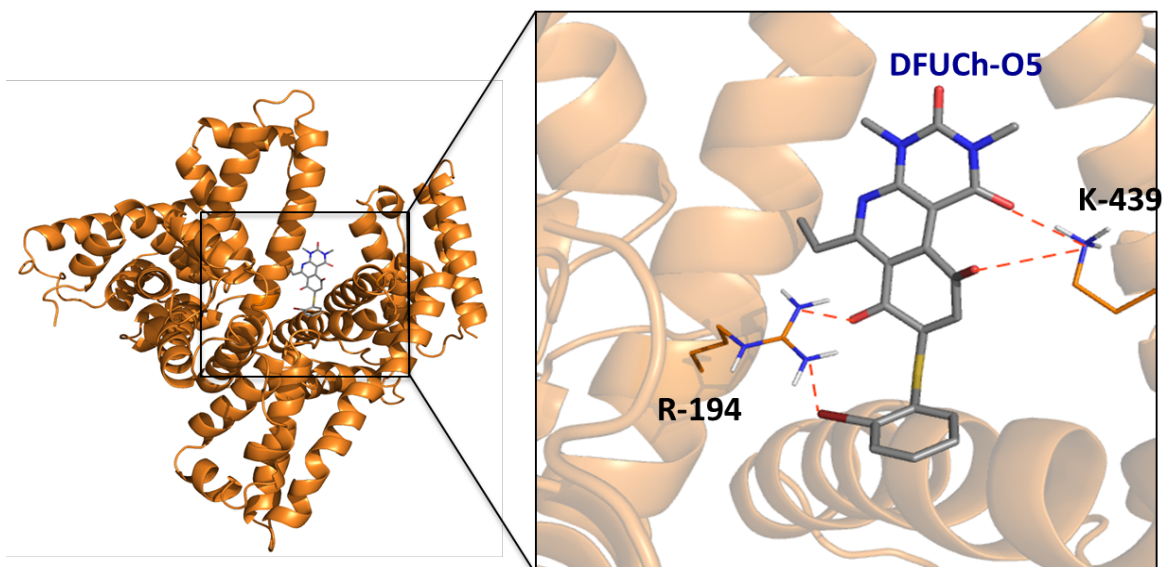
PLACAS EXPUESTAS A:		DFUCH-O5 2µg/mL	DFUCH-O5 4µg/mL	DFUCH-P4 8µg/MI	DFUCH-P4 4µg/mL	DFUCH-P4 2µg/mL
Cuadrante	Compuesto					
<b>1</b>	DFUCH-O5	8	8	8	8	8
	DFUCH-P4	>32	>32	>32	>32	>32
	Vancomicina	0.5	1	1	1	1
<b>2</b>	DFUCH-O5	8	8	8	8	8
	DFUCH-P4	>32	>32	>32	>32	>32
	Vancomicina	1	1	1	1	1
<b>3</b>	DFUCH-O5	8	16	16	8	8
	DFUCH-P4	>32	>32	>32	>32	>32
	Vancomicina	1	1	1	1	1
<b>4</b>	DFUCH-O5	8	8	8	>32	16
	DFUCH-P4	>32	>32	>32	>32	>32
	Vancomicina	1	1	1	1	1

## ANEXO 5

### Estudios de DOCKING, albumina humana versus DFUCH-O5 y DFUCH-P4.



**Figura A10.** Interacciones de DFUCH-P4 en el sitio I de albumina humana (*PDB N°: 2BX8*).



**Figura A11.** Interacciones de DFUCH-O5 en el sitio I de albumina humana (*PDB N°: 2BX8*).



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Bloom, B.R., *On the particularity of pathogens*. Nature, 2000. **406**.
2. Belloso, W.H., *Historia de los antibióticos*. Revista del Hospital Italiano de Buenos aires, 2009. **29**(2): p. 104-106.
3. Cohen, M.L., *Changing patterns of infections disease*. Nature, 2000. **406**: p. 762-767.
4. Yelin, I. and R. Kishony, *Antibiotic Resistance*. Cell, 2018. **172**(5): p. 1136-1136.e1.
5. Walsh, C., *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature, 2000. **406**: p. 775-781.
6. WHO, *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on surveillance*. 2014.
7. McGann, P., et al., *Escherichia coli Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of mcr-1 in the United States*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016. **60**(7): p. 4420-4421.
8. OMS, *Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report Early implementation 2016-2017*, in GLASS. 2018. p. 1-164.
9. O'Neill, J., *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. Review on antimicrobial resistance, 2014: p. 1-16.
10. Boucher HW, T.G., Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al, *bad drugs: no ESCAPE! An update from the infectious diseases society of America*. Clinical infections diseases, 2009. **48**: p. 1 -12.
11. OMS, *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. 2017. **1-7**.
12. Boucher, H.W. and G.R. Corey, *Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **46**(Supplement\_5): p. S344-S349.
13. World Health Organization, *Antimicrobial resistance : global report on surveillance*. xxii, 232 pages.
14. Álvarez Lam, I. and J. Ponce Bittar, *Staphylococcus aureus, evolución de un viejo patógeno*. Revista Cubana de Pediatría, 2012. **84**: p. 383-391.
15. Sung-Hsi Huang Y-CC, Y.-C.C., Shen-Kang Chiu, Chang-Phone Fung, Po-Liang Lu, Lih-Shinn Wang, Tsu-Lan Wu, Jann-Tay Wang, *Prevalence of vancomycin intermediate*

- Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin resistance *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012 - 2013. *Journal of Microbiology, Immunology and Infections*, 2015.
16. Lam, I.Á., *The evolution of an old pathogen called Staphylococcus aureus*. 2012.
  17. Sandra Ricón, L.D., Lina Carvajal, Jinnethe Reyes, José Munita y Cesar Arias, *Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina*. *Biomedica*, 2015. **34**: p. 191 - 208.
  18. Antonio Millan, C.B., Pau González, Benito Almirante, Emilia Cercenado, Miquel Pujol, Jesús Rodríguez, *Bacteriemias de presentación comunitaria y nosocomial por Staphylococcus aureus resistente a meticilina en hospitales de España*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2010. **28**: p. 336 - 41.
  19. Almirante, C.F.y.B., *Infecciones relacionadas con el uso de los catéteres vasculares* *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2014: p. 115 - 24.
  20. Gamba M, F.J., Ramírez K, Palmas S, Zitko P, Valenzuela MT, et al, *Incidencia y mortalidad de bacteriemia en un hospital clínico docente en Santiago de Chile*. *Revista médica de Chile*, 2012. **140**: p. 859 - 66.
  21. (ISP), M.d.S.P., *Instrucciones para la vigilancia nacional de resistencia a los antimicrobianos en bacterias que pueden producir infecciones asociadas a la atención en la salud (IAAS)*. 2013.
  22. Marcela Cifuentes, F.S., Helia Bello, Isabel Briceño, Mario Calvo y Jaime Labarca, *Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012*. *Revista chilena de infectología*, 2012. **31**: p. 123 - 30.
  23. Vega F, A.P., Domínguez M, Bello H, Riedel G, Mella S, et al, *Aislamiento de Staphylococcus aureus hetero resistente a vancomicina en hospital clínico regional de Concepción, Chile*. *Revista chilena de infectología*, 2015. **32**: p. 588 - 90.
  24. Howden, B.P., et al., *Reduced Vancomycin Susceptibility in Staphylococcus aureus, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010. **23**(1): p. 99-139.
  25. Labarca, J., *Heteroresistencia in vancomycin intermediate Staphylococcus aureus (VISA), susceptible or resistant?*. *Revista chilena de infectología*, 2015: p. 497 - 8.
  26. O`Driscoll, T., *Vancomycin resistance enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management*. *Infection and drug resistance*, 2015.

27. Alatorre, C., *Características clínicas y desenlace de pacientes con bacteriemia por Enterococcus faecium vancomicina sensible versus vancomicina resistente en pacientes hematooncológicos*. 2013.
28. B., W., *Historia de los antibióticos del hospital italiano de Buenos Aires*. 2009: p. 104 - 6.
29. Gonzalez, G., *Treatment of the infections by Enterococcus*. Revista clínica española, 2003: p. 203 - 482.
30. JA, M., *Biofilms of Enterococci*. Journal medicine microbiology, 2007: p. 1581 - 8.
31. Rasmussen, *Mature biofilms of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium are highly resistant to antibiotics*. Diagnostic microbiology and infectious diseases 2015.
32. Tan, S.Y. and Y. Tatsumura, *Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin*. Singapore Medical Journal, 2015. **56**(7): p. 366-367.
33. Aminov, R.I., *A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future*. Frontiers in Microbiology, 2010. **1**: p. 134.
34. Silver, L.L., *Challenges of Antibacterial Discovery*. Clinical Microbiology Reviews, 2011. **24**(1): p. 71-109.
35. Spellberg, B., et al., *The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 155-64.
36. Luepke Katherine, H., et al., *Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2016. **37**(1): p. 71-84.
37. Rascati, K.L., et al., *Adherence, Persistence, and Health Care Costs for Patients Receiving Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors*. Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy, 2017. **23**(3): p. 299-306.
38. D'Arcy, Y.M., B.; Parsons, B.; Behar, R.; Thorpe, A.; Alexander, A., *Pregabalin for the treatment of neuropathic pain: a narrative review for primary care providers*. Current Medical Research and Opinion, 2017: p. 1-16.
39. Fernandes, P. and E. Martens, *Antibiotics in late clinical development*. Biochemical Pharmacology, 2017. **133**: p. 152-163.

40. Review on Antimicrobial Resistance. 2014. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance, L., United Kingdom.
41. Gonzales, R.D., et al., *Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid*. The Lancet, 2001. **357**(9263): p. 1179.
42. Jones, R.N., et al., *Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2002. **42**(2): p. 137-139.
43. Tsiodras, S., et al., *Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus**. The Lancet, 2001. **358**(9277): p. 207-208.
44. Nigo, M., et al., *Ceftaroline-Resistant, Daptomycin-Tolerant, and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Infective Endocarditis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017. **61**(3).
45. Conly, J.M. and B.L. Johnston, *Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox*. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2005. **16**(3): p. 159-160.
46. Drlica, K.S. and D.S. Perlin, *Antibiotic Resistance: Understanding and Responding to an Emerging Crisis*. 2010: Pearson Education.
47. Madigan, M., J. Martinko, and J. Parker, *Biología de los Microorganismos* 10 ed. 2003. 1011.
48. Boyle, J., *Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2005. **33**(1): p. 74-75.
49. Lee EJ, L.H., Park HJ, Min HY, Suh ME, Chung HJ, et al. , *Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by a benz[f]indole-4,9-dione analog in cultured human lung (A549) cancer cells*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**: p. 5175-5178.
50. Song GY, K.Y., Zheng XG, You YJ, Cho H, Chung JH, et al. N, *Naphthazarin derivatives (IV): synthesis, inhibition of DNA topoisomerase I and cytotoxicity of 2- or 6-acyl-5,8-dimethoxy-1, 4-naphthoquinones*. 2000(35): p. 291-298.
51. Shchekotikhin AE, B.V., Preobrazhenskaya MN., *Synthesis of 1-(omegaaminoalkyl) naphthoindolediones with antiproliferative properties*. Bioorg Med Chem, 2004(12): p. 3923-3930.

52. dos Santos EV, C.J., Ferreira VF. Q., *Quantitative structure-activity relationship in aziridinyl-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method*. Bioorg Med Chem, 2004(12): p. 87-93.
53. Valderrama JA, B.J., Cortes M, Pessoa-Mahana H, Prina E, Fournet A., *Synthesis and leishmanicidal activity of sesquiterpene 1,4-Quinones*. Bioorg Med Chem, 2003(11): p. 4713-4718.
54. Kim SR, L.J., Lee MY, Chung SM, Bae ON, Chung JH. , *Association of quinone-induced platelet antiaggregation with cytotoxicity*. Toxicol Sci, 2001(62): p. 176-182.
55. Belisario MA, M.M., Avagnale G, De Rosa S, Scopacasa F, De Caterina M., *In vitro effect of avarone and avarol, a quinone/hydroquinone couple of marine origin, on platelet aggregation*. Pharmacol Toxicol, 1996(79): p. 300-304.
56. Rao GH, C.C., Gerrard JM, White JG., *Alpha tocopherol quinone (alpha TQ): a potent inhibitor of platelet function*. Prog Lipid Res, 1981(20): p. 549-559.
57. Cox AC, R.G., Gerrard JM, White JG. , *The influence of vitamin E quinone on platelet structure, function, and biochemistry*. Blood 1980(55): p. 907-914.
58. Kim DH, S.E., Kim YH, Lee BW, Jun JG, Park JH, et al., *Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinone methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii**. Eur J Clin Inves, 2009(39): p. 819-827.
59. Rushworth SA, M.D., O'Connell MA. , *Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes*. J Immunol, 2008(181): p. 6730-6737.
60. Prawan A, B.B., Kukongviriyapan U, Sripa B, Kukongviriyapan V., *Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells*. J Cancer Res Clin Oncol 2009(135): p. 515-522.
61. Asanuma M, M.I., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease: possible involvement of quinone formation*. Expert Rev Neurother, 2006(6): p. 1313-1325.
62. Didry N, P.M., Dubreuil L., *Antibacterial activity of naphthoquinones of plant origin*. Ann Pharm Fr, 1986(44): p. 73-78.
63. Tsai, C.J.-Y., J.M.S. Loh, and T. Proft, *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. Virulence, 2016. **7**(3): p. 214-229.
64. Mendes, R.E., et al., *Telavancin In Vitro Activity against a Collection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates, Including Resistant Subsets, from the United States*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015. **59**(3): p. 1811-1814.

65. CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, approved Standard*. 8<sup>o</sup> ed. Vol. 29. 2009. 85.
66. Craig WA, G.S., *Antibiotics in laboratory medicine: Postantibiotic effect*. . 4th ed ed. 1996, Baltimore: Williams & Wilkins.
67. Pearson, R.D., et al., *Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980. **18**(5): p. 699-708.
68. Silverman, J.A., et al., *Resistance Studies with Daptomycin*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. **45**(6): p. 1799-1802.
69. Mercier, R.-C., H.H. Houlihan, and M.J. Rybak, *Pharmacodynamic evaluation of a new glycopeptide, LY333328, and in vitro activity against Staphylococcus aureus and Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997. **41**(6): p. 1307-1312.
70. Lorian, V., *Antibiotics in laboratory medicine*. 2005: Lippincott Williams & Wilkins.
71. Vallner, J.J., L.A. Sternson, and D.L. Parsons, *Interaction of dantrolene sodium with human serum albumin*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1976. **65**(6): p. 873-877.
72. Lima, J., et al., *Influence of volume shifts on drug binding during equilibrium dialysis: Correction and attenuation*. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1983. **11**(5): p. 483-498.
73. Wilting, J., et al., *The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. The dependence of the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium, and chloride ion concentrations as studied by circular dichroism, fluorescence, and equilibrium dialysis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1980. **255**(7): p. 3032-3037.
74. Luther, M.K., et al., *Activity of Daptomycin or Linezolid in Combination with Rifampin or Gentamicin against Biofilm-Forming Enterococcus faecalis or E. faecium in an In Vitro Pharmacodynamic Model Using Simulated Endocardial Vegetations and an In Vivo Survival Assay Using Galleria mellonella Larvae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014. **58**(8): p. 4612-4620.
75. Gibreel, T.M. and M. Upton, *Synthetic epidermicin NI01 can protect Galleria mellonella larvae from infection with Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013. **68**(10): p. 2269-2273.
76. Desbois, A.P. and P.J. Coote, *Wax moth larva (Galleria mellonella): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011. **66**(8): p. 1785-1790.

77. Campanini-Salinas, J., et al., *A New Kind of Quinonic-Antibiotic Useful Against Multidrug-Resistant S. aureus and E. faecium Infections*. *Molecules*, 2018. **23**(7).
78. Monks, T.J., et al., *Quinone chemistry and toxicity*. *Toxicology and applied pharmacology*, 1992. **112**(1): p. 2-16.
79. Brunton, L.L., *Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics*. 2014: McGraw-Hill New York.
80. Choudhary, M.I. and W.J. Thomsen, *Bioassay techniques for drug development*. 2003: CRC Press.
81. LABARCA L., J., *Nuevos conceptos en farmacodinamia: ¿debemos repensar cómo administramos antimicrobianos?* *Revista chilena de infectología*, 2002. **19**: p. S33-S37.
82. Park, M.K., R.A. Myers, and L. Marzella, *Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses*. *Clinical infectious diseases*, 1992. **14**(3): p. 720-740.
83. Baño, J.R., *Multiresistant bacteria, nosocomially or community acquired*. 2004. **22**.
84. Lapenta, G., *Bacterias multirresistentes*. IBC instituto de bioquímica clínica.
85. Taylor, P.C., et al., *Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for Staphylococcus aureus: influence and significance of technical factors*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1983. **23**(1): p. 142-150.
86. John E. Bennett, R.D.M.J.B., *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 2015: Eighth edition. Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, [2015].
87. Liang, S.Y. and A. Kumar, *Empiric Antimicrobial Therapy in Severe Sepsis and Septic Shock: Optimizing Pathogen Clearance*. *Current infectious disease reports*, 2015. **17**(7): p. 493-493.
88. Nemeth, J., G. Oesch, and S.P. Kuster, *Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015. **70**(2): p. 382-395.
89. Pankey, G.A. and L.D. Sabath, *Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections*. *Clinical Infectious Diseases*, 2004. **38**(6): p. 864-870.
90. Flórez, J., *Farmacología humana*. 2003: Masson.

91. Ling, L.L., et al., *A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance*. Nature, 2015. **517**(7535): p. 455-459.
92. Flórez, J., J.A. Armijo, and Á. Mediavilla, *Farmacología humana*. 2008: Elsevier Masson.
93. Mandell, D., Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th Edition ed. Clinical Infectious Diseases. 2009, Philadelphia,: Churchill Livingstone Elsevier.
94. Goodman, L.S., Gilman, A.. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. 2012, New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
95. Porcel de Fernandez, U.R., Gaudio de Allori, *bactericida de hipoclorito de sodio sobre Staphylococcus cohnii productor de biofilm en una fabrica*. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 2013. **47**: p. 693 - 700.
96. Mascio, C.T.M., et al., *In Vitro and In Vivo Characterization of CB-183,315, a Novel Lipopeptide Antibiotic for Treatment of Clostridium difficile*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. **56**(10): p. 5023-5030.
97. Sakoulas, G., et al., *Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in Staphylococcus aureus by exposure to vancomycin*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2006. **50**(4): p. 1581-1585.
98. Clark, C., et al., *Resistance Selection Studies Comparing the Activity of Razupenem (PTZ601) to Vancomycin and Linezolid against Eight Methicillin-Resistant and Two Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Strains*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(7): p. 3118-3121.
99. Schmitz, F.-J., et al., *Development of Resistance to Ciprofloxacin, Rifampin, and Mupirocin in Methicillin-Susceptible and -Resistant Staphylococcus aureus Isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(11): p. 3229-3231.
100. Schmitz, F.-J., et al., *Resistance to trimethoprim–sulfamethoxazole and modifications in genes coding for dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in European Streptococcus pneumoniae isolates*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. **48**(6): p. 935-936.
101. Rodríguez, C.A. and O. Vesga, *Staphylococcus aureus resistente a vancomicina*. Biomédica, 2005. **25**: p. 575-587.
102. Sakoulas, G., et al., *Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia*. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(6): p. 2398-2402.



103. Kollef, M.H., *Limitations of vancomycin in the management of resistant staphylococcal infections*. Clinical infectious diseases, 2007. **45**(Supplement\_3): p. S191-S195.
104. Werner, G., et al., *Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe*. Euro Surveill, 2008. **13**(47).
105. McKay, G.A., et al., *Time-kill kinetics of oritavancin and comparator agents against Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2009. **63**(6): p. 1191-1199.
106. Lipinski C, D.B., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Drugs discovery, 2001: p. 3 - 26.
107. Ramarao, N., C. Nielsen-Leroux, and D. Lereclus, *The Insect Galleria mellonella as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis*. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2012(70): p. 4392.
108. Browne, N., M. Heelan, and K. Kavanagh, *An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes*. Virulence, 2013. **4**(7): p. 597-603.
109. Au - Harding, C.R., et al., *Use of Galleria mellonella as a Model Organism to Study Legionella pneumophila Infection*. JoVE, 2013(81): p. e50964.
110. Zak, O. and T. O'Reilly, *Animal models in the evaluation of antimicrobial agents*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991. **35**(8): p. 1527-1531.
111. Maekawa, L.E., et al., *Different Extracts of Zingiber officinale Decrease Enterococcus faecalis Infection in Galleria mellonella*. Brazilian Dental Journal, 2015. **26**: p. 105-109.
112. Brennan, M., et al., *Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2002. **34**(2): p. 153-157.
113. Reeves, E.P., et al., *Correlation between gliotoxin production and virulence of Aspergillus fumigatus in Galleria mellonella*. Mycopathologia, 2004. **158**(1): p. 73-79.
114. Peleg, A.Y., et al., *Galleria mellonella as a model system to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(6): p. 2605-2609.

115. Miyata, S., et al., *Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Infection and immunity, 2003. **71**(5): p. 2404-2413.
116. Dunphy, G.B., et al., *Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of Pseudomonas aeruginosa for larvae of Galleria mellonella: bacterial properties associated with virulence*. Journal of Invertebrate Pathology, 1986. **47**(1): p. 48-55.
117. Olsen, R.J., et al., *Virulence of serotype M3 Group A Streptococcus strains in wax worms (Galleria mellonella larvae)*. Virulence, 2011. **2**(2): p. 111-119.
118. Wardenburg, J.B., R.J. Patel, and O. Schneewind, *Surface Proteins and Exotoxins Are Required for the Pathogenesis of Staphylococcus aureus Pneumonia*. Infection and Immunity, 2007. **75**(2): p. 1040-1044.
119. Tan, H., et al., *The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus*. Biomaterials, 2012. **33**(2): p. 365-377.
120. Julio Benites, E.G.J.L., Mauricio Rojas, Leonel Rojo, Maria do Céu Costa, María Pilar Vinardell and Buc Calderon., *Evaluations of analgesic activities of tremetone derivatives isolated from the Chilean altiplano medicine Parastrephia lepidophylla*. Natural Product Communications, 2012. **7**.
121. Trinder, P., *Rapid determination of salicylate in biological fluids*. Biochemical Journal, 1954. **57**(2): p. 301-303.
122. Ali, M.A. and J.I. Routh, *The Protein Binding of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid*. Clinical Chemistry, 1969. **15**(11): p. 1027.