

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ESTUDIO DE PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS DE DOS DERIVADOS ARILMERCAPTOQUINÓNICOS, SOBRE AISLAMIENTOS CLÍNICOS GRAM POSITIVOS MULTIRRESISTENTES”

"CHARACTERIZATION OF ACTIVITY AND STUDY ANTIBACTERIAL PROPERTIES PHARMACODYNAMIC OF TWO DERIVATIVES ARILMERCAPTOQUINÓNICOS, INSULATION ON GRAM POSITIVE CLINICAL MULTIRESISTANT"

MEMORIA PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

POR:

NICOLÁS ANTONIO HINOJOSA TORRES

Director de Memoria:

Prof. Dr. David Vásquez Velásquez
Departamento Química Farmacológica y
Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Patrocinante de Memoria:

Prof. Dr. David Vásquez Velásquez
Departamento Química Farmacológica y
Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Codirector de Memoria:

QF. Javier Campanini Salinas
Departamento de Química Farmacológica y
Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2016

"A mis padres y hermano, ustedes siempre creyeron en mí y me apoyaron todos estos años, al señor akiles que siempre estuvo a mi lado en este proceso tan extenso, ustedes saben que no soy de muchas palabras solo diré de todo corazón, Gracias por todo".

AGRADECIMIENTOS

En mi vida y en este proceso de formación profesional que culmina con la realización y defensa de mi memoria de título, he conocido a mucha gente con la que he compartido, cada uno de ustedes ha sido parte de mi historia y los recuerdo con mucho cariño, agradezco a todos.

Primero que todo agradecer a Leslie Angélica Torres Múndaca y Fabián Antonio Hinojosa Martínez, ustedes son mis padres y siempre me apoyaron en todo momento, haciendo lo imposible para que nada me faltara. Madre, sé que te esforzaste al máximo para que lograra llegar a esta instancia de mi vida y por eso debes estar orgullosa de todo lo que has hecho por mí, Padre, siempre tenías una palabra de motivación para alentarme cuando estaba deprimido, te agradezco por despertarme esos días que si no es por ti, no hubiese despertado nunca, gracias a los dos por su apoyo incondicional y siéntanse orgullosos, han culminado una etapa de su vida, han logrado el objetivo que tenían para mi hermano y para mí.

A Fabián Alejandro Hinojosa Torres mi hermano, siempre tenías una palabra para subirme el ánimo y ayudarme cuando no entendía algo, acompañarme en esas largas noches de estudios con sus cervezas y/o mate.

A Daniela Fernanda Mardones Vega mi polola, si bien el destino nos unió los últimos años de universidad, este tiempo siempre me has brindado tu apoyo, recordándome que soy el mejor y cantándome esa canción que tanto me hace reír "Soy Nicolaaaaas, soy un guerrero....." jajajajaja, comprendes a la perfección lo complejo de esta carrera, ya que también la estudias, gracias por tu apoyo.

A los docentes y funcionarios de la Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile, cada uno de ellos contribuyo de menor o mayor medida a mi formación personal y académica, pero sin importar la magnitud, tuve el agrado de conocerlos e incluso con algunos jugar a la pelota, aunque perdíamos porque soy re malo, pero lo pasábamos bien y nos divertíamos.

A mis amigos y compañeros, Benjamín Palma, Ulises Gajardo, Alejandro Ricci, entre otros, a cada uno de ustedes los conocí en tiempos diferentes, antes y durante estos años de universidad, buenas juntas realizábamos, pero sin importar eso, ustedes siempre me apoyaron y me decían "dale wn, sigue adelante, vo podi", gracias por su apoyo.

A Karen Salinas mi mejor amiga, siempre me has apoyado y has confiado en mí todos estos años de amistad, Siempre recordare como me dices: " Amigo de mi cucharón", gracias por las conversaciones y salidas, gracias por tu buena voluntad y consejos cada vez que tenía problemas, gracias por todo.

A Jorge Barriga mi amigo, gracias por tu apoyo y buenos consejos, durante los primeros años de universidad me ayudaste a estudiar y entender los ramos matemáticos que me costaban más que los otros, gracias por tu compañía y esas pláticas interesantes que teníamos sobre diversos temas.

A Agustín Núñez, Fernando Toro y a Juan Andrade, que compartimos en el laboratorio Desarrollo de Fármacos, tanto en la sección de química como en la de microbiología, realizando ensayos, trabajando como equipo, tirando chistes y haciendo cosas sin sentido para hacer más a meno el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros de básquet, que si bien no ganamos muchos partidos en los TIF, jugábamos, peleábamos, nos divertíamos y compartíamos ese sentimiento de jugar, quizás no por ganar sino por ser una pasión, ocupando tiempo extra programático y dejando de lado nuestras labores como estudiantes con el fin de participar en los torneos, las charlas entretenidas que se generaban en los camarines, recordare siempre que todos tenían la voluntad de participar en el equipo aunque fuéramos pocos y no nos fuera como queríamos que nos fuera, gracias chicos a todos ustedes por ser parte de mi carrera universitaria y dejarme lindos recuerdos de esta época de mi vida.

A David Vásquez, mi director de memoria de título, por su apoyo y orientación en este mundo de la ciencia, gracias totales por aceptarme en su laboratorio, guiarme y orientarme en todo lo que necesitaba, gracias por esas juntas como equipo que realizábamos con sus asados y cosas para beber, fue grato el tiempo que estuve trabajando el laboratorio, gracias totales profesor.

A Javier Campanini, Co-director y tutor de mi memoria de título, te conocí porque compartimos en el equipo básquet, un día tuvimos una charla, después de entrenamiento en la cual te comente que me sentía desmotivado porque en el laboratorio que iba a realizar mi tesis no era lo que yo esperaba que fuera y tú me propusiste que trabajara en el laboratorio contigo, empecé algo desmotivado, pero con el pasar de los días eso cambio totalmente, además de ser mi tutor en este proceso también fuiste un amigo y un guía, orientándome y explicándome hasta lo más mínimo del porque realizábamos las cosas, con el tiempo tuve la fortuna de que me consideraras para realizar labores de extensión por parte de CONICYT y fue así que viajamos a Punta Arenas al campamento de verano realizado en la Universidad de Magallanes, y estuvimos a cargo del taller "Fármacos en la naturaleza", fue una experiencia tremendamente enriquecedora, al final todo resultado de la mejor forma posible, gracias por esa experiencia que pude vivir, y gracias por todo tu apoyo en este proceso.

A todos ellos, por siempre estaré agradecido por todo lo que me han enseñado y apoyado en este proceso, de todo corazón, Gracias totales.

ÍNDICE TEMÁTICO

Dedicatoria.	2
Agradecimientos.	3
Índice temático.	5
Índice de figuras.	7
Índice de gráficos.	8
Índice de tablas.	10
Glosario.	13
Abreviaturas	14
Resumen	16
Summary	17
I. Introducción.	18
II. Hipótesis y objetivos.	28
2.1 Hipótesis.	28
2.2 Objetivo general.	29
2.3 Objetivos específicos.	29
III. Materiales y métodos.	30
IV. Resultados y discusión.	35
4.1 Determinación de CIM₅₀ y CIM₉₀ para DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	35
4.2 Determinación del modo de acción de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV.	44
4.3 Influencia de albúmina y de suero humano en la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV.	47

4.4 Porcentaje de unión a albúmina de los derivados quinónicos DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	49
4.5 Cuantificación de efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	55
4.6 Determinación del porcentaje de permeabilidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	64
4.7 Actividad sinérgica en la coadministración de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 Con linezolid y vancomicina sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV.	67
V. Conclusiones.	74
VI. Proyecciones.	75
VII. Bibliografía.	76
VIII. Anexos.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cronología de introducción de familias de antibacterianos al mercado.	18
Figura 2: Antimicrobianos aprobados por la FDA entre 1983-2016.	19
Figura 3: Cronología de introducción de familias de antibacterianos al mercado y aparición de la resistencia.	21
Figura 4: Modificaciones estructurales a antibióticos ya existentes.	25
Figura 5: Estructura de la ubiquinona y los compuestos DFUCh-P4 y DFUCh-O5.	26
Figura 6: Imágenes de placas agar sangre con bacterias SARM (Izquierda) y VRE (derecha), respectivamente.	27
Figura 7. Fundamento de la reacción para la cuantificación colorimétrica del ácido salicílico.	49
Figura 8: Esquema del sistema PAMPA.	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibración para ácido salicílico.	50
Gráfico 2. Curva concentración versus tiempo para ácido salicílico en el ensayo de diálisis al equilibrio.	50
Gráfico 3. Curva de calibración para DFUCh-O5	52
Gráfico 4. Curva de calibración para DFUCh-P4.	52
Gráfico 5. Curva concentración versus tiempo para DFUCh-O5 en el ensayo de diálisis al equilibrio.	53
Gráfico 6. Curva concentración versus tiempo para DFUCh-P4 en el ensayo de diálisis al equilibrio.	53
Gráfico 7. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC© 29213	58
Gráfico 8. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC© 29213	59
Gráfico 9. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 178 clínico	60
Gráfico 10. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 178 clínico.	60
Gráfico 11. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC© 29212	61

Gráfico 12. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC© 29212	62
Gráfico 13. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a <i>Enterococcus faecium</i> 828 clínico	62
Gráfico 14. Crecimiento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a <i>Enterococcus faecium</i> 828 clínico.	63
Gráfico 15. Curva de calibración para tiopental sódico	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorización de aislamientos SARM por características clínicas y patrón de susceptibilidad.	36
Tabla 2. Categorización de aislamientos ERV por características clínicas y patrones de susceptibilidad.	36
Tabla 3. Perfil de susceptibilidad de SARM frente a DFUCh-05.	37
Tabla 4. Perfil de susceptibilidad de SARM frente a DFUCh-P4.	37
Tabla 5. Perfil de susceptibilidad de SARM frente a vancomicina y daptomicina.	38
Tabla 6. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de SA aislados en el año 2012 y 2014 en población adulta.	39
Tabla 7. Perfil de susceptibilidad de ERV frente a DFUCh-05.	40
Tabla 8. Perfil de susceptibilidad de ERV frente a DFUCh-P4.	40
Tabla 9. Perfil de susceptibilidad de ERV frente a vancomicina.	41
Tabla 10. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de ERV aislados en el año 2012 y 2014 en población adulta.	42
Tabla 11. Actividad bactericida de DFUCh-05 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.	44
Tabla 12. Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.	45
Tabla 13. Actividad bactericida de DFUCh-05 sobre <i>Enterococcus spp.</i> resistente a vancomicina.	45
Tabla 14. Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre <i>Enterococcus spp.</i> resistente a vancomicina.	46

Tabla 15. Efecto del suero humano (SH) en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	47
Tabla 16. Efecto de la albúmina 40 g/dL en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	48
Tabla 17. Resumen de datos para el cálculo del porcentaje de unión a albúmina de ácido salicílico.	51
Tabla 18. Resumen de datos para el cálculo del porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	54
Tabla 19. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300, UFC: unidades formadoras de colonia.	56
Tabla 20. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 178 clínico, UFC: unidades formadoras de colonia.	56
Tabla 21. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212, UFC: unidades formadoras de colonia.	57
Tabla 22. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a <i>Enterococcus faecium</i> 828 clínico, UFC: unidades formadoras de colonia.	57
Tabla 23. Absorbancias, concentraciones y porcentaje de permeabilidad para tiopental sódico.	65
Tabla 24. Valores de absorbancias obtenidos en la realización de PAMPA para DFUCh-O5 y DFUCh-P4.	65
Tabla 25. Absorbancias obtenidos en estudio cinético de degradación para DFUCh-O5.	66
Tabla 26. Efecto de la asociación de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SASM ATCC® 29213	68
Tabla 27. Efecto de la asociación de DFUCh-O5 y linezolid.	69
Tabla 28. Efecto de la asociación de DFUCh-P4 y linezolid.	70
Tabla 29. Efecto de la asociación de DFUCh-O5 y vancomicina.	71

Tabla 30. Efecto de la asociación de DFUCh-P4 y vancomicina. 72

Tabla 31. Efecto de la asociación de DFUCh-P4 y DFUCh-O5. 73

GLOSARIO

Abiótico: medio que no permite que haya vida.

Aislamiento clínico: corresponde a una bacteria no caracterizada, de la cual no se tienen datos sobre su fenotipo.

Bactericida: sustancia que destruye bacterias.

Bacteriostático: efecto que impide reproducción de bacterias; envejecen y mueren sin dejar descendencia.

Biogénicos: sustancias o elementos que son necesarios para originar la vida, constituyen la materia viva.

Biótico: medio que permite la vida.

Catéter: un dispositivo con forma de tubo estrecho y alargado que puede ser introducido dentro de un tejido o vena.

Cepa ATCC: bacteria totalmente caracterizada, de la cual se conoce casi todo su fenotipo.

Fosforilación oxidativa: proceso metabólico que produce adenosina trifosfato (ATP).

Lisis bacteriana: proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida de material intracelular.

Mc Farland: unidad de medida usada en bacteriología con el fin de poder determinar la turbidez o las unidades formadoras de colonias (UFC).

Morbilidad: cantidad de personas que enferman en un lugar y un período de tiempo determinados en relación con el total de la población.

Neutropenia: es la disminución aguda o crónica de granulocitos de la sangre, condición anormal de la sangre que puede predisponer al cuerpo humano a contraer infecciones, también conocida como granulocitopenia.

Nosocomiales: se refiere a infecciones contraídas durante la estancia en un medio hospitalario.

Patógeno: que causa o produce enfermedad.

ABREVIATURAS

Bacterias

ESV: *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina.

ERV: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina.

SARV: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina.

VISA: *Staphylococcus aureus* resistencia intermedia a vancomicina (del inglés vancomycin intermedia *Staphylococcus aureus*).

Instituciones

CLSI: instituto de estándares clínicos y de laboratorio (del inglés Clinical & Laboratory Standards Institute).

FDA (Food and Drug Administration): agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos.

ISP: Instituto de salud pública.

OMS: organización mundial de salud.

NNIS: sistema nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales (del inglés National Nosocomial Infection Surveillance).

GCRB: grupo colaborativo de resistencia bacteriana.

EARS: sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana Europeo (EARS, del inglés European Antimicrobial Resistance Surveillance).

Unidades

mL: mililitro.

nm: nanómetro.

rpm: revoluciones por minuto.

UFC: unidades formadoras de colonia.

μg: microgramos.

Otras

ATCC: american type culture collection.

CIM: concentración inhibitoria mínima.

CBM: concentración bactericida mínima.

MDR: resistencia múltiple a fármacos (del inglés Multiple Drug Resistance).

NEMs: nuevas entidades moleculares que corresponden a nuevas sustancias químicas biológicamente activas.

PAE: efecto post antibiótico (del inglés post antibiotic effect)

RAM: reacción adversa a medicamentos, cualquier respuesta a un medicamento que sea nociva y no intencionada, y que tenga lugar a dosis que se apliquen normalmente en el ser humano.

SH: suero humano.

RESUMEN

La introducción de los antibacterianos en la práctica clínica constituye uno de los avances más grandes en la medicina moderna, ya que permitió el control de las enfermedades infecciosas que hasta ese momento eran intratables. Sin embargo, una amenaza creciente disminuye la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana frente los antibacterianos, es la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibacterianos que inhiben o matan a otras de la misma especie. Frente esta problemática, varias organizaciones internacionales entre ellas la organización mundial de la salud (OMS) han promovido el desarrollo de nuevos y mejores antibacterianos, enfatizando que si la problemática continua en aumento, la humanidad se quedara sin fármacos para combatir las infecciones bacterianas. En base a los antecedentes, en este trabajo se caracterizarán dos compuestos arilmercaptoquinónicos, diseñados a partir de la estructura de la ubiquinona, buscando intervenir en la cadena transportadora de electrones, componente esencial del metabolismo bacteriano. En estudios previos se demostró que los derivados tienen una potente actividad antibacteriana sobre cepas Gram positivas, ahora es necesario determinar la actividad antibacteriana sobre una población heterogénea de aislamientos clínicos multirresistentes, mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada aislamiento y con esto el cálculo de parámetros estadísticos como la CIM₅₀ y CIM₉₀. También se determinó la concentración bactericida mínima (CBM) para poder establecer el modo de acción de los compuestos a través del cálculo de la relación CBM/CIM. Por otro parte, se determinó la CIM en presencia de suero humano y albúmina, además del porcentaje de unión a está, para evaluar la actividad de los compuestos en un entorno fisiológico y como se ve influenciada por la presencia de proteínas plasmáticas. Paralelamente, se evaluó el efecto post antibiótico (PAE) de los compuestos, el cual los clasificara en fármacos tiempo-dependiente o concentración-dependiente, y por último se evaluó su actividad en asociación a antibacterianos de uso clínico como lo son vancomicina y linezolid.

SUMMARY

The introduction of antibacterial agents in clinical practice is one of the greatest advances in modern medicine, as it allowed the control of infectious diseases that were hitherto untreatable. However, an increasing threat decreases the effectiveness of these drugs: bacterial resistance antibacterials, is the ability of bacteria to survive in concentrations of antibacterials that inhibit or kill other of the same species. Faced this problem, several international organizations including the World Health Organization (WHO) have promoted the development of new and better antibacterial, stressing that if the problem continues increasing, humanity was left without drugs to fight bacterial infections. Based on the background, in this paper two arilmercaptoquinonicos compounds, designed from the structure will be characterized ubiquinone, seeking to intervene in the electron transport chain, an essential component of bacterial metabolism. Previous studies demonstrated that derivatives have potent antibacterial activity against Gram positive strains, it is now necessary to determine the antibacterial activity of a heterogeneous population of multiresistant clinical isolates, by determining (MIC) minimum inhibitory concentration of each isolate and this calculating statistical parameters such as MIC50 and MIC90. minimum bactericidal concentration (MBC) was also determined in order to establish the mode of action of the compounds by calculating CBM / CIM relationship. On the other hand, the MIC was determined in presence of human serum albumin and also the percentage binding is to evaluate the activity of the compounds in a physiological environment and as influenced by the presence of plasma proteins. In parallel, the post antibiotic (PAE) of the compounds, which classified in drugs time-dependent or concentration-dependent, and finally its activity was evaluated in association antibacterials clinical use such as vancomycin and linezolid was evaluated.

I. INTRODUCCIÓN

A través de la historia muchas teorías han intentado explicar el origen de las enfermedades infecciosas, hasta que en 1859 Louis Pasteur sentó las bases de la "Teoría microbiana de la enfermedad", que explicaba que sustancias biogénicas podrían ser patogénicas para el ser humano, lo cual permitió dilucidar la causa verdadera de las patologías que afectaban a la población.(1)

En 1889 Rudolf Emmerich y Oscar Loew centraron sus esfuerzos en la búsqueda de un antibacteriano. Estudiaron un pigmento producido por la *Piocianasa*, y demostraron que este pigmento no solo inhibía el crecimiento, si no que destruía las bacterias patógenas, sin embargo, era muy tóxico para los humanos.(2)

En 1928 se descubrió el primer antibacteriano de uso clínico, la penicilina, que dio inicio a la era de los agentes antimicrobianos.(3) Este fármaco proviene originalmente de un hongo llamado *Penicillium Notatum* (4) y tiene la capacidad de provocar la ruptura de las membranas celulares de cepas de *Staphylococcus aureus* induciendo su lisis. Este hallazgo le otorgó a Alexander Fleming en 1942, el premio Nobel en Medicina.(5)

El desarrollo de nuevos antibióticos fue en aumento y con el pasar de los años, se posibilitó el tratamiento de una multitud de enfermedades infecciosas, salvando la vida de millones de pacientes.

A lo largo del último siglo se han descubierto o sintetizado 18 clases o tipos de antibióticos, tal y como se muestra en la **Figura 1**.

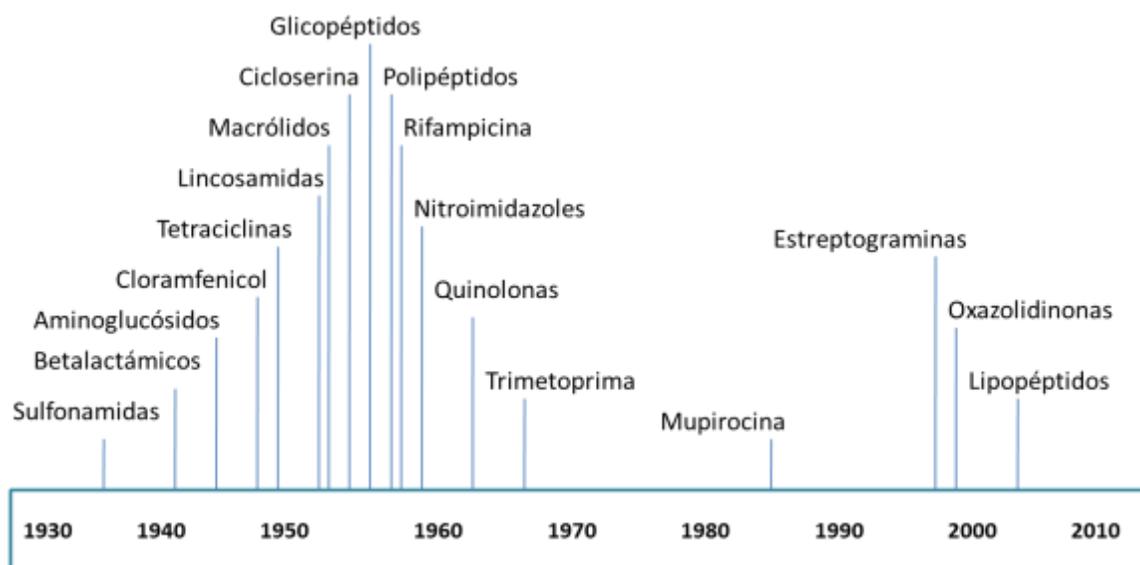


Figura 1: Cronología de introducción de familias de antibacterianos al mercado.

La mayoría de estas familias se describieron antes de 1970, y desde entonces únicamente se han introducido al arsenal terapéutico otras 4 clases. Al analizar la aprobación de antibióticos en las últimas décadas, se puede observar una drástica disminución del número de estos fármacos que han ido incorporándose a la práctica clínica, hasta llegar a la nula introducción de nuevos antibióticos en los últimos años. **Figura 2.**

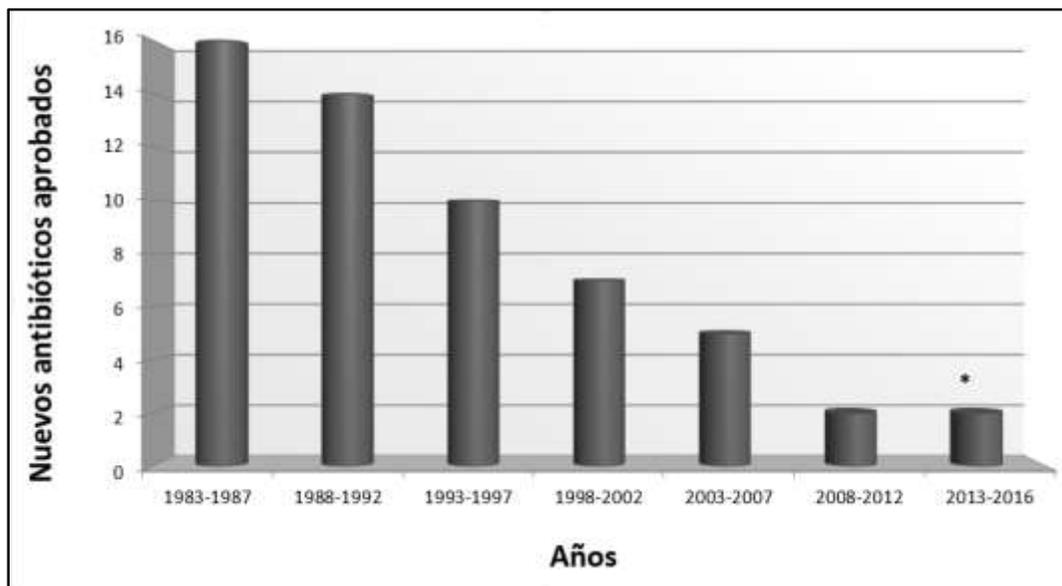


Figura 2: Antimicrobianos aprobados por la FDA entre 1983-2016, Adaptado de: ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States – 2013;*Dato extraído desde la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA), (2015), correspondiente a la introducción de dalbavancina(6).

A raíz del gran avance que representó la introducción de los fármacos antibacterianos a la medicina moderna, estos se han usado de forma excesiva, incontrolada y errónea, tanto por la automedicación, como por una inapropiada prescripción.(7)

De forma paralela, los avances tecnológicos en la industria alimentaria, han producido grandes cambios en la forma de producir alimentos, conservados y procesados.(8) Se han utilizado antibacterianos con el fin de promover el crecimiento de animales y como profilácticos en situaciones que no ameritan su uso. Por otro lado, los viajes intercontinentales han permitido el contacto de diferentes cepas bacterianas con la consecuente transmisión de material genético.(8)

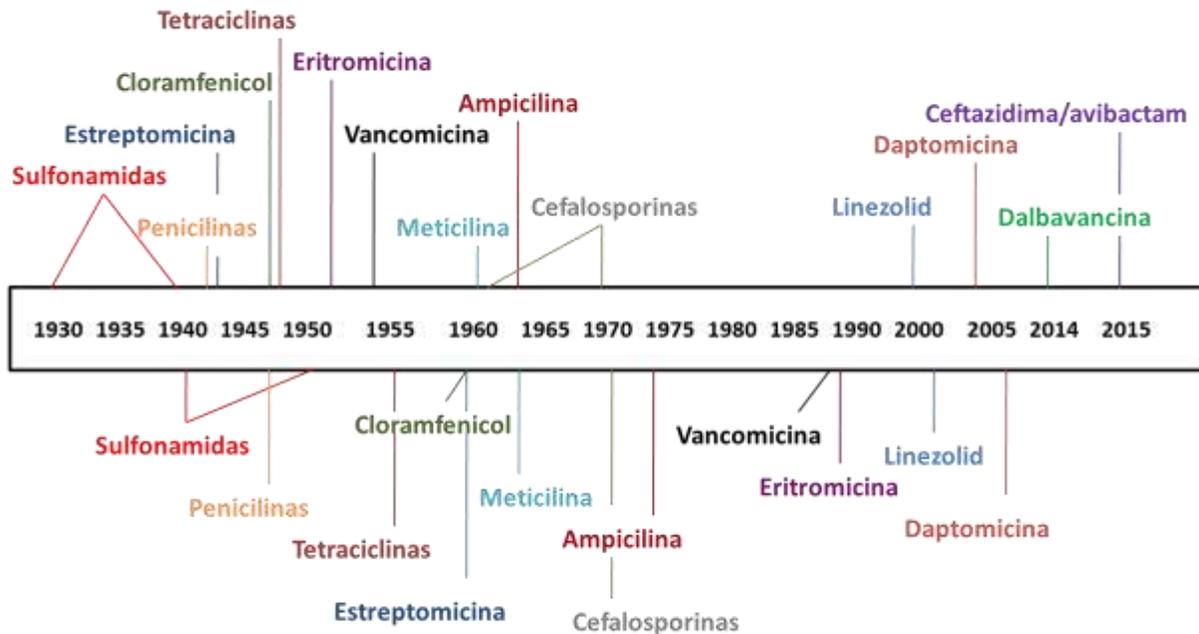
Como resultado de estas acciones se aceleró la aparición del fenómeno de resistencia a los antibacterianos, permitiendo que comenzara paulatinamente a perderse la efectividad de los antibióticos y con ello aumentando el riesgo de infecciones con patógenos multirresistentes.

De los mecanismos de resistencia a antibacterianos más conocidos se encuentran:

1. Producción de enzimas hidrolíticas, por ejemplo, las β -lactamasas que hidrolizan al anillo β -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas, modificando su estructura, lo cual conlleva a una pérdida de su actividad antibacteriana.(9, 10)
2. Expresión de bombas de eflujo, que corresponden a proteínas localizadas en la pared y membrana bacteriana, donde actúan eliminando el antibiótico del medio intracelular, con el fin de disminuir la concentración del fármaco que podría causar daño al microorganismo, este mecanismo afecta por ejemplo a macrólidos.(9, 10)
3. Modificación del sitio de acción, los microorganismos son capaces de modificar el sitio de acción de los antibióticos sin perder su funcionalidad, evitando que estos puedan ejercer su acción, por ejemplo las tetraciclinas.(9, 10)

Frente a este escenario, los laboratorios comenzaron a trabajar en el desarrollo de antibióticos que evadieran los mecanismos de resistencia. Un primer esfuerzo fue diseñar un fármaco que evite la acción de β -lactamasas, esta búsqueda dio por resultado la meticilina, que fue introducida en el mercado en 1960. Un año más tarde se informa en Inglaterra sobre la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y con el paso del tiempo aparecieron más reportes de resistencia, para cada una de las familias de antimicrobianos como se muestra en la **Figura 3**.

Introducción de antibacterianos al mercado



Aparición de resistencia reportada

Figura 3: Cronología de introducción de familias de antibacterianos al mercado y aparición de la resistencia. Adaptado de: Chatsworth, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for Antimicrobial therapy. *Nat Chembiol*, 3(9), 541-548.

La resistencia bacteriana no solo repercute en la salud de las personas, sino que trae consigo el aumento en los costos sanitarios, y de atención médica, debido a que se necesitan medicamentos más caros y un tiempo de hospitalización más prolongado. En los Estados Unidos el gasto total anual en los tratamientos antibacterianos ha alcanzado cifras por sobre los 20 mil millones de dólares.(11)

En Europa, a pesar de los avances tecnológicos, las bacteriemias, que corresponden a la presencia de bacterias en la sangre siguen ocasionando 150.000 muertes al año, considerándola como una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad. Alrededor de 2.000.000 de personas son diagnosticadas con infecciones bacterianas en los hospitales de los EE.UU cada año, aproximadamente el 70 % de esas infecciones son resistentes a al menos a una familia de antibióticos, lo que genera un total de 210.000 fallecimientos.(11-15)

La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas ha señalado que las bacterias que causan infecciones nosocomiales con mayor frecuencia en los Estados Unidos(16) son: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacterias*, a este grupo de bacterias se les denomina: "ESKAPE". Dentro de

estas destacan por su alta prevalencia *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

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

El primer aislamiento de SARM fue descrito en Inglaterra en 1961, este patógeno corresponde a un coco 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 patogenicidad y se asocia a patologías con alto índice de mortalidad.(11)

Del año 1990 al 2002 los aislamientos de SARM aumentaron su prevalencia de un 2 a un 43 %.(17) Dentro de este período, en Japón se describe el primer aislamiento de SARM con resistencia intermedia a vancomicina (VISA), siendo este antibiótico empleado como última alternativa terapéutica.(17) En Taiwán mediante un estudio epidemiológico, 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 estériles se elevó al 10 %. Hoy la prevalencia de VISA está en aumento, por lo que el impacto clínico será cada vez mayor.(18)

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 llegó 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).(17) 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 EE.UU 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*.(19)

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.(20) 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.(21)

En Chile, el GCRB reportó la susceptibilidad *in vitro* acumulada al año 2012 de 28 hospitales complejos, indicando que la resistencia de SARM alcanza un 50 %. En el año 2012 el Complejo Asistencial Barros Luco Trudeau, llevó a cabo un estudio sobre la incidencia y mortalidad por bacteriemias, el resultado arrojó que la mortalidad por bacteriemias adquiridas en la comunidad es del 10 al 13 % y nosocomial del 23 al 30 %.(15) Los antibióticos utilizados para tratar infecciones por *S. aureus* multirresistentes incluyen a vancomicina, linezolid y daptomicina.(22) Cifuentes y colaboradores informan un 100 % de susceptibilidad a vancomicina en aislamientos del 2012;(23) sin embargo, ya en el año 2015 la Revista Chilena de Infectología en una de sus publicaciones dio a conocer un aislamiento con resistencia intermedia a vancomicina (VISA), el estudio caracterizó la cepa mediante el uso de microscopía electrónica observando engrosamiento de la pared bacteriana.(24)

Este aumento de la resistencia en *S. aureus* se debe principalmente a tratamientos duraderos con vancomicina, infecciones que deben ser tratadas mediante uso de catéteres vasculares, de hecho, el aislamiento publicado por la Revista Chilena de Infectología fue encontrado en un paciente con catéter venoso central permanente para diálisis y administración de fármacos. 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 solo a vancomicina) *in vivo* de *Enterococcus spp.* a *S. aureus*, confiriéndole resistencia a vancomicina.(19, 25)

Enterococcus spp.

Este patógeno es una bacteria Gram positiva, catalasa negativa, no formadora de esporas y anaerobio facultativo, que es responsable de infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales y pélvicas entre otras. Fue descrito en 1986 en Francia e Inglaterra y un año después en los Estados Unidos se reporta el primer caso de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (ERV).(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 ERV 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 del 2010 se detectaron aislamientos resistentes a estos fármacos. La prevalencia de las infecciones intrahospitalarias por *Enterococcus spp.* 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 spp.* 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 *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. En el período estudiado las infecciones por *Enterococcus spp.* 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 halló en *E. faecalis*. Actualmente más del 70 % de los aislamientos de *E. faecium* son resistentes a vancomicina en Argentina.(2)

En un estudio de susceptibilidad realizado en Chile en el 2012, se informó que de un total de 1712 aislamientos clínicos de *E. faecium* en población adulta, el 76 % presentó resistencia a vancomicina, y en el 2014 esta se acrecentó hasta llegar al 100 %. Esta resistencia es producto de genes que codifican un precursor alternativo de la pared celular, este precursor 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 se clasifican en función de los fenotipos que presentan, si bien se han descrito muchos tipos de grupos de genes *van*, los dos fenotipos más frecuentes son el VanA y el VanB, diferenciadas entre sí en función del nivel de resistencia a vancomicina, susceptibilidad a teicoplanina y capacidad de inducción de la resistencia tras exposición a vancomicina.(19, 28) El subtipo de *Enterococcus spp.* que presenta la resistencia suele ser mayoritariamente *Enterococcus 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.(28) Por otro lado, un factor que contribuye a la resistencia antibiótica, es la capacidad de *Enterococcus spp.* de generar biofilms, esto consiste en una población de células unidas de forma irreversible en varias superficies bióticas y abióticas,(29) la formación de la biopelícula proporciona a los *Enterococcus spp.* 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 concentraciones tóxicas.(30) Se ha demostrado que las infecciones en donde se generan biofilm maduros disminuye el éxito del tratamiento antibiótico.(30)

Escenario actual

Las infecciones por bacterias multirresistentes no solo se sitúan como un problema de salud pública, sino que presentan implicancias a la seguridad nacional y global por las altas tasas de

morbilidad y mortalidad que generan. Diversas instituciones han identificado que la resistencia a los antibióticos y la escasez de estos, es una de las amenazas más significativas para la salud pública mundial.(31) Cabe entonces preguntarse, si el fenómeno de la resistencia se está extendiendo más rápidamente que la introducción de nuevos antibióticos al arsenal terapéutico. Al observar los programas de desarrollo de fármacos de las 15 compañías farmacéuticas y de las 7 compañías de biotecnología más importantes del mundo, se observa que de un total de 225 nuevas entidades moleculares (NEMs) aprobadas por la FDA (desde enero de 1998 hasta diciembre de 2002), 7 (3 %) correspondieron a nuevos agentes antimicrobianos. Luego se desarrollaron otros antibióticos, que presentaban modificaciones de los fármacos ya existentes, como por ejemplo, tigeciclina en el 2006 (tetraciclina), ceftobiprol en el año 2009 y ceftarolina en el año 2011 (cefalosporinas), dalbavancina en el año 2014 y telavancina 2008 (glucopéptidos). Todos estos fármacos no constituyen NEMs.(6, 32)

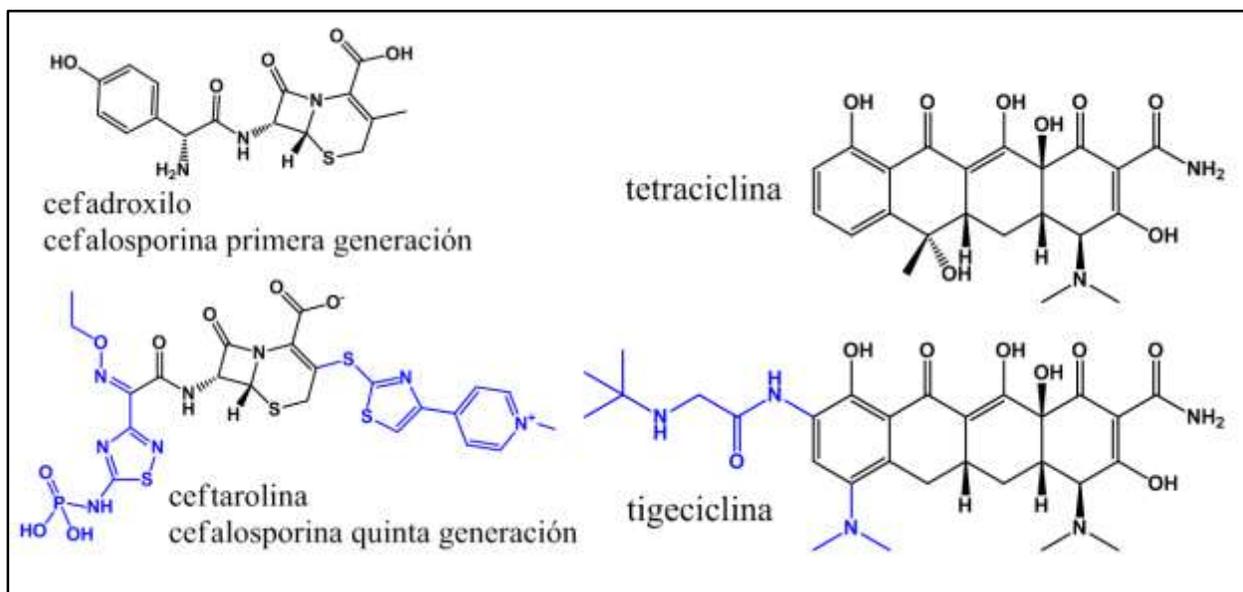


Figura 4. Modificaciones estructurales a antibióticos ya existentes.

Solo linezolid en el 2000 y daptomicina en el 2003, poseían nuevos mecanismos de acción.(33, 34)

En febrero de 2015 se aprobó ceftazidima/avibactam, asociación de un antibiótico que es una cefalosporina de 3^o generación y un inhibidor de la β -lactamasa.(35) A pesar de que esta asociación de fármacos puede atacar bacterias multirresistentes, avibactam no es capaz de inhibir las clases B y D de β -lactamasas, para las cuales actualmente no existen compuestos que permitan inhibir su acción.(36)

El desarrollo de nuevos antibióticos se ha estancado en las últimas décadas, mientras que la resistencia a los medicamentos sigue avanzando y se ha convertido en una amenaza cada vez

más grave para la salud humana. Estos antecedentes presentados, muestran que se debe cambiar la estrategia de búsqueda de nuevos fármacos antibacterianos, los esfuerzos se deben enfocar en desarrollar compuestos antibacterianos que ataquen nuevos blancos. Un nuevo mecanismo de acción que sea eficaz contra aislamientos multirresistentes, debe reunir ciertas características fundamentales, tales como: 1) que estructuralmente sean altamente conservados en el tiempo, 2) que estén presentes en un amplio espectro de bacterias de importancia clínica; y 3) que sean esenciales para la supervivencia bacteriana.(37) Una forma de evitar la aparición de resistencia bacteriana es usar como blanco una molécula pequeña, ya que tienen menor potencial de mutación.(38) Un ejemplo es el compuesto teixobactina que bloquea la acción del lípido II, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. La teixobactina ha demostrado tener menor potencial de desarrollo de resistencias.(39)

Nuestro laboratorio ha diseñado compuestos que buscan intervenir en la función de la ubiquinona, una molécula pequeña, involucrada en el transporte de electrones entre los complejos I y III y del II al III de la cadena transportadora de electrones, maquinaria energética esencial para la supervivencia bacteriana, a la fecha se han obtenido compuestos arilmercaptoquinónicos diseñados a partir de la estructura de la ubiquinona, pero con modificaciones estructurales que permiten modular características fisicoquímicas como la lipófila y la electrofilia, los compuestos han demostrado tener una potente actividad sobre bacterias Gram (+). Estudios anteriores han demostrado que la actividad se correlaciona con parámetros electroquímicos como el potencial de onda medio y la lipófila de los derivados. Dentro de una serie de 32 compuestos, destacan 2 en particular DFUCh-O5 y DFUCh-P4 (**Figura 5**) debido a las bajas CIM exhibidas en bacterias Gram (+).

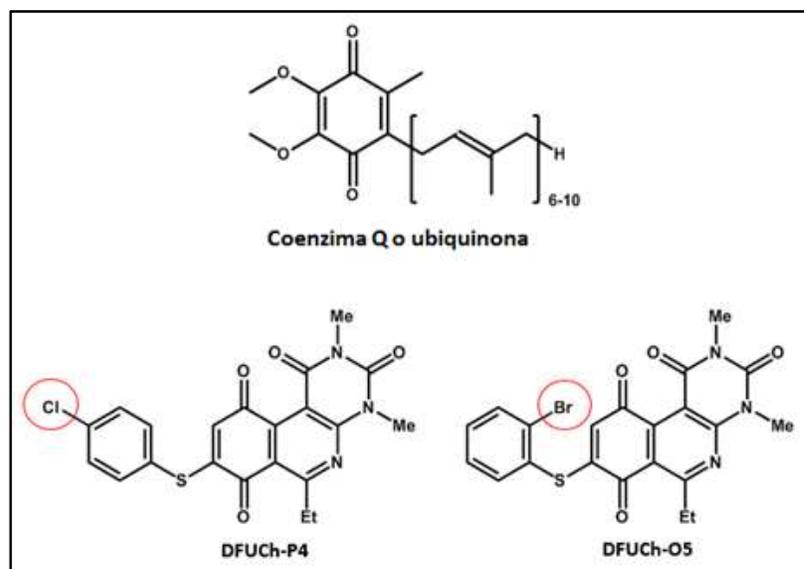


Figura 5: Estructura de la ubiquinona y los compuestos DFUCh-P4 y DFUCh-O5.

Para avanzar a estudios *in vivo* es necesario que las moléculas cumplan ciertas propiedades, es por ello que en el presente trabajo se propone evaluar algunas características relevantes que todo compuesto con potencial antibacteriano debe poseer. Se buscará caracterizar la actividad antibacteriana de ambos compuestos frente aislamientos clínicos SARM y ERV (**Figura 6**) multirresistentes provenientes de diferentes centros hospitalarios (**ANEXO A**).

Se entenderá por *S. aureus* multirresistentes aquellas, cepas que muestran un fenotipo resistente a la meticilina y al menos a otras tres clases adicionales de agentes antibacterianos (39, 40) y para cepas de *Enterococcus spp.* multirresistentes, la resistencia múltiple a fármacos (MDR) será definida como aislamientos que presenten fenotipo resistente a vancomicina y al menos a otras tres clases adicionales de antibacterianos.(39, 40)



Figura 6: Imágenes de placas agar sangre con bacterias SARM (izquierda) y ERV (derecha).

Considerando lo anteriormente expuesto, la investigación tendrá como finalidad aportar nuevos datos sobre la actividad antimicrobiana de DFUCh-05 y DFUCh-P4, candidatos a convertirse en nuevos agentes antibacterianos y dar pie a ensayos *in vivo*.

I. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

"Los derivados quinónicos DFUCh-O5 y DFUCh-P4: 1) presentan una actividad bactericida, 2) disminuye en presencia de proteínas plasmáticas debido a su alto porcentaje de unión a albúmina, 3) poseen efecto post antibiótico sobre aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.* Multirresistentes, provenientes de diferentes centros hospitalarios de Chile. Además, 4) los compuestos presentan capacidad para atravesar pasivamente una monocapa lipídica".

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* las propiedades farmacodinámicas y antibacterianas de los derivados quinónicos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos multirresistentes provenientes de diferentes centros hospitalarios de Chile.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la CIM₅₀ y CIM₉₀ de aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Enterococcus spp.* multirresistentes, frente a DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
2. Determinar la CBM₅₀ y CBM₉₀ de aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Enterococcus spp.* multirresistentes, frente a DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
3. Evaluar la influencia de albúmina y de suero humano en la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, sobre cepas de *S. aureus* y *Enterococcus spp.* sensibles y multirresistentes.
4. Determinar el porcentaje de unión a albúmina de los derivados quinónicos DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
5. Determinar el efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, sobre aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Enterococcus spp.* multirresistentes.
6. Evaluar la capacidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 para atravesar pasivamente una monocapa lipídica.
7. Evaluar el efecto antibacteriano de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 en coadministración con linezolid y vancomicina, frente a aislamientos clínicos *S. aureus* y *Enterococcus spp.* multirresistentes.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. **Cepas:** Se utilizaron las cepas de colección recomendadas por el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute)(41), *E. faecalis* ATCC® 29212, *S. aureus* ATCC® 29213 y *S. aureus* resistente a meticilina ATCC® 43300.

2. **Aislamientos clínicos:** se incluyeron 89 aislamientos clínicos de cocáceas Gram positivas aislados de distintos centros hospitalarios chilenos de durante el año 2014. Todas la 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* (45 cepas) y *Enterococcus* spp. (44 cepas) que cumplieran con un perfil de multirresistencia definido por aquellos aislamientos que presentaran resistencia a meticilina y al menos a otras tres familias adicionales de agentes antibacterianos para el caso de *S. aureus* (40) y que presentaran resistencia a meticilina y al menos a otras tres familias adicionales de agentes antibacterianos para. Los sitios de origen de aislamiento de las especies estudiadas fueron aspirado traqueal, herida y sangre para *S. aureus*, en tanto a los sitios para *Enterococcus* spp. fueron orina, liquido peritoneal, sangre y herida. Los aislamientos fueron sembrados desde cepario (donde se conservaban en glicerol (Ensure®, Merck, Darmstadt, Germany Lot N° Z0313094 406) 50% v/v y caldo de cultivo Brain Heart Infusion (AesLaboratoire, Ker Lann – Bruz, France) a -20°C) en agar Mueller-Hinton I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N°BCBG4771V). Como cepas para control de calidad se utilizaron *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC® 29213, SARM ATCC® 43300 y *E. faecalis* ATCC® 29212.

3. **Determinación de CIM, CIM₅₀ y CIM₉₀:** La susceptibilidad se determinó mediante el parámetro, Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 comparándolos con vancomicina como control. Esta determinación se realizó mediante 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 CLSI(41). Para ello se utilizó un inóculo bacteriano de 5x10⁵ 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 ug/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 dilución en la que no se observó crecimiento visible. Finalmente se determinaron los parámetros CIM₅₀, CIM₉₀, se entenderá el valor de la CIM₅₀ como la concentración que abarque al 50 % de los resultados, y el valor de la CIM₉₀ como la concentración que incluya al 90 % de los resultados.

4. **Determinación de la CBM:** Para evaluar si los compuestos actúan como bactericidas o bacteriostáticos, se determinó la Concentración Bactericida Mínima (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 de Microdilución de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI.(41) Se realizó el ensayo de susceptibilidad según lo descrito anteriormente, luego se tomó una alícuota de 100 uL desde cada uno de los pocillos antes de la dilución correspondiente a la CIM incluyéndola y también la dilución siguiente a la CIM como control de viabilidad bacteriana. Se traspasaron 100 uL a una placa de agar Mueller-Hinton y luego se sembró 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. Los compuestos podrán ser clasificados como bactericidas si se cumple el criterio de CBM/CIM es igual o menor a 2 y como bacteriostáticos si la relación es mayor a 2 según *Craig et al.*(42)

5. **Determinación de CBM₅₀ y CBM₉₀:** se determinó la CBM de distintas bacterias en una misma especie, al igual que el punto 3 se determinó la CIM por el método de microdilución descrito por la CLSI (43), y posteriormente se realizaron subcultivos en placas de agar Mueller-Hinton I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N°BCBG4771V), con diluciones que permiten el conteo de colonias aisladas (30 – 300 UFC), desde los pocillos donde no hubo crecimiento visible, luego las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, se entenderá el valor de la CBM₅₀ como la concentración que abarque al 50 % de los resultados, y el valor de la CIM₉₀ como la concentración que abarque al 90 % de los resultados.

6. **Determinación de CIM en presencia de proteínas plasmáticas:** Se determinó la CIM en presencia de albúmina (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N° SLBJ7867V), y suero humano (Human Serum, Male AB Plasme, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N° SLBJ1038V) inactivado utilizando vancomicina como control, mediante el ensayo de microdilución según el protocolo de la CLSI (41), en placas de 96 pocillos de fondo U (Ultra cruz™, Santa Cruz Biotechnology, inc.), se utilizó una solución de albúmina bovina (Sigma-Aldrich Ltda. USA) disuelta en medio Mueller Hinton (Beckton Dickinson, Sparks, USA) a una concentración de 40 g/L, simulando condiciones fisiológicas en caldo Mueller Hinton. Para determinar la influencia del suero en la actividad se ensayaron los derivados en presencia de suero humano inactivado por calor a una concentración final de 10 % en cada pocillo.(39) Los compuestos se ensayaron a concentraciones de 32 a 0.0625 µg/mL. Se utilizó un inóculo bacteriano de 5 x 10⁵ UFC por pocillo. Finalmente las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas.

7. **Determinación del efecto post antibiótico:** Los cultivos bacterianos fueron cultivados desde congelamiento (-20 °C) y luego subcultivados en agar sangre de cordero, en 3 pasajes, para que alcancen fase de crecimiento logarítmico, para posteriormente ser expuestos a distintas concentraciones de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, en tubos de ensayo estériles, se prepararon soluciones de cada compuesto con concentraciones de CIM y CIM x 2, se utilizó Mueller Hinton I (Beckton Dickinson, Sparks, USA) como medio de cultivo, se preparó una solución madre de bacterias de concentración 1.0 Mc Farland, luego esta solución de bacterias fue incubada durante 1 hora a 37 °C, pasado este tiempo se tomó una alícuota, la cual se agregó a los tubos de ensayo que contenían previamente medio y compuesto, fueron incubados a 37 °C por 30 minutos con agitación, después de 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 et al.*(42) luego se tomaron muestras cada hora por 6 horas las cuales fueron incubadas a 37 °C por 24 horas (44, 45), transcurridas las 24 horas de incubación se procedió al conteo de colonias bacterianas, paralelamente, se realiza el control bajo las mismas condiciones en ausencia de compuesto. Se calculó el logaritmo del conteo bacteriano en la muestra y en el control, el PAE se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PAE = T - C$$

En donde:

PAE = efecto post antibiótico.

T = horas para que el cultivo de prueba aumente en una unidad logarítmica la UFC por mL.

C = horas para que el cultivo de control aumente en una unidad logarítmica la UFC por mL.

8. **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.

9. **Determinación del porcentaje unión albúmina:** se preparó una solución de albúmina (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Lot N° SLBJ7867V) a una concentración de 40 g/L final y los compuestos a una concentración de 200 µg/mL en Mueller Hinton I (Beckton Dickinson, Sparks, USA), la solución fue agitada de 12 a 15 horas para favorecer la interacción de los compuestos con la albúmina, transcurrido el tiempo la solución fue introducida a una membrana de diálisis (\approx 10 cm) (Approximate Molecular Weight Cut Off is 6000-8000 Daltons, Spectrum®Lab, Rancho Dominguez, USA, Lot N° 3259012), la membrana sellada por ambos extremos se depositó dentro de un recipiente con solución salina, se extrajeron 400 µL de muestra en intervalos de tiempo de 0 a 8 horas, con reposición de medio, en agitación constante para homogenizar la solución, una vez transcurrido el tiempo se determinó a 381 nm las absorbancias de las muestras con el fin de obtener el porcentaje de unión a albúmina. Se utilizó ácido salicílico (Sigma Aldrich Ltda. USA) como patrón, para su cuantificación se utilizó solución reactivo compuesta por: nitrato férrico nonahidratado (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), triton™ x-100 (Sigma Aldrich Ltda. USA) para favorecer la disolución del nitrato férrico nonahidratado y ácido sulfámico (Winlker Ltda., USA), se forma un complejo entre ión férrico y ácido salicílico, la absorbancia se determinó a 534 nm.

10. **Determinación de la permeabilidad pasiva:** Se utilizó placas PAMPA (Sigma Aldrich Ltda. USA) de dos tipos, donora y 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 minutos para la correcta fijación. Luego se agregó una solución de buffer fosfato (pH: 7.4, en la placa aceptora, en la placa donora se colocaron los compuestos ensayados, posteriormente se ensamblaron las placas y se dejó en agitación a 250 rpm durante 2 horas. Una vez transcurridas las 2 horas de ensayo, se tomó una alícuota de cada pocillo (donor y acceptor) y se diluyeron con una solución de buffer 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.

11. **Determinación de la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 en asociación con antibacterianos de uso clínico:** 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".(46, 47) (48)Se determinó la CIM, por la técnica de microdilución en caldo, según las recomendaciones dadas por CLSI.(41) El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo U (Ultra cruz™, Santa Cruz Biotechnology, inc.), se probaron distintas combinaciones de los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 con linezolid (Abcam-Biochemicals®, Cambridge, UK. Lot N° APN13103-1-1.) y vancomicina (Abcam-Biochemicals®, Cambridge, UK. Lot N° APN12578-1-1.). Para la configuración del panel de

diluciones, se comenzó con una concentración 2xCIM 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, se utilizó un inóculo de 5×10^5 UFC por pocillo. Las placas fueron incubadas por 18-24 h a 37°C.(49)Para establecer el efecto de la asociación se calculó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC *por sus siglas en inglés*) (50). De acuerdo a Lorian *et al.*(51)un índice de FIC ≤ 0.5 se considerará sinergismo, valores > 0.5 hasta 1, adición, valores > 1 hasta 2 indiferencia y valores > 2 , antagónicos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de CIM₅₀ y CIM₉₀ de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

La actividad antibacteriana se refiere a la capacidad que tiene un compuesto de afectar la variabilidad de una especie bacteriana, esta se cuantifica a través de la CIM, que corresponde a la concentración más baja de un antibacteriano que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Se determina la CIM de distintas bacterias de una misma especie con la finalidad de calcular la CIM₅₀ y CIM₉₀ para esta especie, la primera corresponde a la concentración inhibitoria mínima a la cual el 50 % de las bacterias detienen su crecimiento y la segunda corresponde a la concentración inhibitoria mínima a la cual el 90 % de las bacterias detienen su crecimiento, son valores que revelan la efectividad de los compuestos en una población heterogénea de bacterias.(52, 53)

Se determinaron los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ de los compuestos sobre las bacterias *S. aureus* y *Enterococcus spp.* multirresistentes. Mediante un convenio con el ISP (**ANEXO B**), se obtuvieron los aislamientos clínicos que provienen de distintos servicios de salud de Chile (**ANEXO A**). Estos a su vez, provienen de diferentes sitios estériles corporales como por ejemplo; sangre, aspirado traqueal, orina, líquido peritoneal, entre otros. En las **tablas 1 y 2**, se presenta la distribución de frecuencias de los sitios de origen de los aislamientos ensayados y su clasificación con respecto a su perfil de susceptibilidad, para *S. aureus* y *Enterococcus spp.* Todos los aislamientos ensayados de *S. aureus* son resistentes a metilina y los aislamientos de *Enterococcus spp.* son resistentes a vancomicina. Algunos de estos aislamientos se pueden definir como resistentes a múltiples fármacos (MDR, del inglés Multiple Drug Resistance) o multirresistentes, esta clasificación se aplica a aquellas bacterias que presentan un fenotipo resistente a metilina y al menos a otras tres familias de agentes antibacterianos.(39, 40)

Por otro lado, compararemos la CIM de nuestros compuestos con la CIM de vancomicina, ya que vancomicina es la primera línea de tratamiento para Gram (+) en infecciones intrahospitalarias y también se utilizó como estándar, para la comprobación de que nuestra metodología estaba correcta, ya que se obtuvieron los mismos resultados de CIM de vancomicina obtenidos por el ISP bajo la misma metodología, para cada aislamiento ensayado.

Tabla 1. Categorización de aislamientos SARM por características clínicas y patrón de susceptibilidad.

Fuente de aislamiento	N° Total de aislamientos	N° de MDR
Aspirado traqueal	10	4
Herida	10	7
Sangre ^a	20	20
Otros*	5	4
Total	45	35

^a En la determinación de la CIM, 13 aislamientos fueron excluidos frente DFUCh-O5 y 16 aislamientos frente a DFUCh-P4, por presentar valores de CIM fuera de rango.

*Tejido, hueso, líquido ascítico y líquido pleural.

Para el caso de *Enterococcus spp.*, la resistencia múltiple a fármacos (MDR) será definida como aislamientos que presenten fenotipo resistente a vancomicina y al menos a otras tres clases adicionales de antibacterianos.(39, 40)

Tabla 2. Categorización de aislamientos ERV por características clínicas y patrón de susceptibilidad.

Fuente de aislamiento	N° Total de aislamientos	N° de MDR
Herida	10	10
Líquido peritoneal	10	10
Orina ^a	10	10
Sangre	10	9
Otros*	4	4
Total	44	43

^a En la determinación de la CIM, 3 aislamientos fueron excluidos frente DFUCh-P4, por presentar valores de CIM fuera de rango.

*Líquido articular, fístula y tejido.

En la **tabla 1** se observa un total de 45 aislamientos ensayados, 13 fueron excluidos para la determinación de CIM₅₀ y CIM₉₀ por poseer CIM mayor a 32 µg/mL, ya que es la máxima concentración que se puede utilizar, debido a la solubilidad que tiene el compuesto en estas condiciones y con este ensayo. La mayoría de los aislamientos excluidos provienen del subgrupo sangre, los resultados de susceptibilidad para SARM frente a DFUCh-O5, se presentan a continuación:

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad de SARM frente a DFUCH-05.

Fuente de aislamiento*	Cantidad	Rango de CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Aspirado traqueal	10	2-4	2	4
Herida	10	1-32	2	2
Sangre	10	2-4	2	4
Otros**	2	2	2	2
Total	32	2-4	2	2

*La CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 4 veces (n=4).

**Tejido, hueso, líquido ascítico, líquido pleural.

En la **Tabla 3** se observa que para SARM la CIM₅₀ es de 2 $\mu\text{g/mL}$ y la CIM₉₀ es de 2 $\mu\text{g/mL}$ para un total de 32 aislamientos clínicos estudiados. Se observa que la CIM₅₀ para las diferentes fuentes de aislamientos presentó un valor de 2 $\mu\text{g/mL}$, los aislamientos provenientes de subgrupo herida y otros presentan una CIM₉₀ de 2 $\mu\text{g/mL}$ y los subgrupos aspirado traqueal y sangre presentan una CIM₉₀ de 4 $\mu\text{g/mL}$, por lo que los subgrupos herida y otros son más susceptibles a DFUCH-05.

En la **tabla 1** se observa que con un total de 45 aislamientos ensayados, por la misma razón que en el caso anterior 16 fueron excluidos por poseer CIM mayor a 32 $\mu\text{g/mL}$, ya que es la máxima concentración que se puede utilizar, debido a la solubilidad que tiene el compuesto en estas condiciones y con este ensayo. La mayoría de los aislamientos excluidos provienen del subgrupo sangre, los resultados de susceptibilidad para SARM frente a DFUCH-P4, se presentan a continuación:

Tabla 4. Perfil de susceptibilidad de SARM frente a DFUCH-P4.

Fuente de aislamiento*	Cantidad	Rango de CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Aspirado traqueal	9	1-4	2	4
Herida	9	1-4	2	4
Sangre	9	1-2	2	2
Otros**	2	2-4	2	4
Total	29	2-4	2	4

*La CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 4 veces (n=4).

**Tejido, hueso, líquido ascítico y líquido pleural.

Se observa en la **Tabla 4** que de un total de 29 aislamientos la CIM₅₀ presenta un valor de 2 µg/mL y la CIM₉₀ un valor de 4 µg/mL, el subgrupo aspirado traqueal, herida y otros presentan el doble de CIM₉₀ que el subgrupo sangre.

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 donde se desarrollaron los aislamientos, *S. aureus* cuando está en condiciones anaeróbicas puede expresar genes que favorecen la fermentación por sobre la fosforilación oxidativa, esto afectaría la actividad de los compuestos, en base al mecanismo de acción propuesto, los compuestos requieren de una fosforilación oxidativa activa para ejercer su acción.(54) 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.

Los resultados muestran que DFUCh-O5 tiene mayor actividad antibacteriana que DFUCh-P4, esta información concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos sobre cepas *S. aureus* ATCC© 29213 y *S. aureus* resistente a meticilina ATCC© 43300, que demuestran que DFUCh-O5 es más activo que DFUCh-P4.(37)

Como control del ensayo de microdilución, en la **Tabla 5** se muestran los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ de SARM frente a vancomicina determinados en este ensayo versus los valores de vancomicina y daptomicina obtenidos por el laboratorio de Infectología del ISP.

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad de SARM frente a vancomicina y daptomicina.

Antibióticos	Rango de CIM (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
vancomicina*	1 - 2	1	2
vancomicina ISP	1 - 2	1	2
daptomicina ISP	0.25 - 2	0.5	1

*La CIM₅₀ y CIM₉₀ para vancomicina se reprodujo 4 veces (n=4).

Se observa que vancomicina presenta un rango de CIM entre 1 - 2 µg/mL frente los aislamientos clínicos estudiados, lo que concuerda con el rango de CIM de los datos del ISP sobre estos mismos aislamientos.

Se definirá como dilución en el ensayo de microdilución a la reducción de concentración de una sustancia en disolución en potencia de 2, a modo de ejemplo, si se tiene un valor de CIM de 2

µg/mL, se acepta como error del método +/- 1 dilución, es decir, la variación de esta puede ser entre 1 y 4 µg/mL.(55, 56) Por otro lado, el principio de no inferioridad aplicado para antibacterianos (57, 58), explica que la actividad de los nuevos agentes antibacterianos no debe ser superior sino que equivalentes o no inferior a los antibióticos ya establecidos, además de pertenecer a una nueva familia de antibacterianos y con un nuevo mecanismo de acción. 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.

Al comparar los aislamientos de SARM del año 2014 provistos por el ISP, con la susceptibilidad acumulada de SARM del año 2012 reportados por el GCRB (23) (**ANEXO A**), se puede observar que la susceptibilidad *in vitro* de *S. aureus* en adultos, frente a eritromicina, clindamicina y ciprofloxacino no superó el 30 %. El caso más crítico lo presentó cefoxitina, que tan solo muestra un 4 % de susceptibilidad frente a *S. aureus* en adultos; estos datos confirman que el arsenal antibacteriano está disminuyendo de manera acelerada en comparación a la inclusión de nuevos antibacterianos.

En la **Tabla 6** se muestran los perfiles de susceptibilidad de SARM de los años 2012 y 2014.

Tabla 6. susceptibilidad *in vitro* de SARM aislados en el año 2012 y 2014 en población adulta.

Antibacterianos	2012	2014
vancomicina y teicoplanina	100	100
daptomicina	-	96
cefoxitina	-	4
eritromicina	48	26
clindamicina	50	30
linezolid	-	98
ciprofloxacino	-	16
quinsupristina/dalfopristina	-	100
gentamicina	-	45

Las siguientes tablas muestran los datos de susceptibilidad obtenidos para ERV:

Tabla 7. Perfil de susceptibilidad de ERV frente a DFUCh-05.

Fuente de aislamiento*	Cantidad	Rango de CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Herida	10	2-4	2	4
Líquido peritoneal	10	2	2	2
Orina	10	2-4	2	4
Sangre	10	2-4	2	4
Otros**	4	2-4	2	4
Total	44	2-4	2	4

*La CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 4 veces (n=4).

**Líquido articular, fístula, y tejido.

En la **Tabla 7** se observa la susceptibilidad de ERV frente a DFUCh-05, de un total de 44 aislamientos clínicos estudiados, todos presentaron un valor de 2 $\mu\text{g/mL}$ para CIM₅₀ total, para CIM₉₀ total el valor fue de 4 $\mu\text{g/mL}$, se observa que cada uno de los subgrupos estudiados presentan un valor de 2 $\mu\text{g/mL}$ para CIM₅₀, por otro lado el subgrupo líquido peritoneal presenta un valor de CIM₉₀ de 2 $\mu\text{g/mL}$ con respecto a los demás subgrupo que presentan un valor de 4 $\mu\text{g/mL}$, esto nos muestra que DFUCh-05 es más activo en el subgrupo líquido peritoneal.

Por otro lado, de un total de 44 aislamientos ensayados, 3 fueron excluidos del estudio por poseer CIM mayor a 32 $\mu\text{g/mL}$, ya que es la máxima concentración que se puede utilizar, debido a la solubilidad que tiene el compuesto en estas condiciones y con este ensayo. La mayoría de los aislamientos excluidos provienen del subgrupo orina, los resultados de susceptibilidad para ERV frente a DFUCh-P4, se presentan a continuación:

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad de ERV frente a DFUCh-P4.

Fuente de aislamiento*	Cantidad	Rango de CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Herida	10	2-4	4	4
Líquido peritoneal	10	2-4	2	4
Orina	7	2-4	4	4
Sangre	10	4	4	4
Otros**	4	2-4	2	4
Total	41	4	4	4

*La CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 4 veces (n=4).

**Líquido articular, fístula y tejido.

A partir de los resultados mostrados en la **Tabla 8** se observa que de un total de 41 aislamientos estudiados, todos presentan la misma CIM₅₀ y CIM₉₀, que corresponde 4 µg/mL. También se puede observar que los subgrupos líquido peritoneal y otros presentan una CIM₅₀ de 2 µg/mL.

Con estos resultados se aprecia que DFUCh-P4 en el subgrupo orina presenta el doble de CIM₅₀ con respecto a su par DFUCh-05, del subgrupo líquido peritoneal se puede decir que tanto DFUCh-05 como DFUCh-P4 presentan la misma CIM₅₀, pero DFUCh-P4 presenta el doble de la CIM₉₀ con respecto a DFUCh-05. En el subgrupo herida comparando los compuestos queda demostrado que DFUCh-P4 presenta el doble del valor de la CIM₅₀ con respecto a DFUCh-05, lo mismo ocurre para el caso del subgrupo sangre, con estos antecedentes y en base a evaluaciones anteriores se puede señalar que DFUCh-05 y DFUCh-P4 presentan actividad antibacteriana sobre cepas multirresistentes y que DFUCh-05 es más activo que DFUCh-P4 en los diferentes subgrupos de las variadas fuentes de aislamientos.

En la siguiente tabla se recopilaron datos de CIM₅₀ y CIM₉₀ obtenidos en los ensayos con los aislamientos de ERV frente a vancomicina, además datos de CIM de vancomicina obtenidos desde el ISP.

Tabla 9. Perfil de susceptibilidad de ERV frente a vancomicina.

Antibiótico	RANGO DE CIM (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
vancomicina*	256 - 512	256	512
vancomicina ISP	256 - >256	256	>256

*La CIM₅₀ y CIM₉₀ para vancomicina se reprodujo 4 veces (n=4).

Los datos de la **Tabla 9** muestran que la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de vancomicina, presentaron valores de 256 µg/mL y 512 µg/mL, respectivamente, similares a los valores de CIM₅₀ y la CIM₉₀ de vancomicina reportados por el ISP. En los ensayos realizados en nuestro laboratorio se utilizó vancomicina a una concentración máxima de 512 µg/mL, comparado con la utilizada por el ISP que presentó una concentración máxima de 256 µg/mL.

Al comparar la CIM₉₀ de los compuestos que tuvieron el valor de 4 µg/mL, tanto para DFUCh-05 como para DFUCh-P4, con respecto al valor de CIM₉₀ obtenido para la vancomicina frente a ERV, se puede afirmar que DFUCh-05 y DFUCh-P4 son 128 veces más activos que vancomicina, frente a cepas multirresistentes de ERV en Chile.

Los datos obtenidos muestran que los compuestos DFUCh-05 y DFUCh-P4 presentan actividad antibacteriana frente aislamientos de ERV, específicamente los aislamientos de *Enterococcus*

faecium los cuales han demostrado ser terapéuticamente desafiantes, ya que son resistentes a diversas familias de antibióticos, al igual que los aislamientos de SARM. Los compuestos DFUCh-05 y DFUCh-P4 presentaron un valor de CIM₅₀ de 2 µg/mL, mientras que vancomicina presentó un valor de CIM₅₀ de 1 µg/mL frente a SARM, esto muestra que los derivados actúan a concentraciones similares a vancomicina frente a estos aislamientos de SARM. Por otro parte, los derivados presentaron valores de CIM₅₀ de 2 y 4 µg/mL, respectivamente, mientras que vancomicina presentó valores de CIM₅₀ de 256 µg/mL y de CIM₉₀ de 512 µg/mL frente a ERV, esto muestra que los compuestos presentan una elevada actividad antibacteriana comparada con vancomicina frente a estos aislamientos de ERV.

El GCRB reportó la susceptibilidad acumulada de ERV del año 2012, esta se comparó con los aislamientos de ERV provistos por el ISP (23) (**ANEXO A**), observando que la susceptibilidad *in vitro* de ERV en adultos, frente a ampicilina y teicoplanina disminuye cerca del 50 % en tan solo 2 años, pero los casos más graves son eritromicina, que presenta un 2 % de susceptibilidad y vancomicina exhibe un 100 % de resistencia en el año 2014.

En la **Tabla 10** se muestran los perfiles de susceptibilidad de ERV de los años 2012 y 2014.

Tabla 10. Susceptibilidad *in vitro* de ERV aislados en el año 2012 y 2014 en población adulta.

Antibacteriano	2012	2014
linezolid	-	93
ampicilina	9	4
vancomicina	24	0
eritromicina	-	2
teicoplanina	49	23

Se observa que la cantidad de antibióticos de uso clínico con actividad frente a estos aislamientos de ERV ha disminuido. Las infecciones que ERV puede causar son endocarditis, infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones intraabdominales y pélvicas, infecciones de piel y tejidos blandos. Presenta como alternativa terapéutica las estreptograminas (ej. quinupristina / dalfoipristina), las cuales pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones de *E. faecium*, pero no contra *E. faecalis*. Por otro lado, linezolid es un antibacteriano eficaz, con una alta actividad y gran susceptibilidad, sin embargo, en el 2014 ya se ha reportado que presenta un 7 % de resistencia, además su costo elevado dificulta su utilización, considerando que presenta restricción de uso, debido a la alta capacidad de adaptación de las bacterias que las lleva a desarrollar mecanismos de resistencia con frecuencia.(59)

En el 2015, se reportó que 17.9 % de aislamientos clínicos de ERV eran productores de biofilm, un biofilm consiste en una población bacteriana que se adhieren de forma irreversible formando capas, de estos aislamientos el 98 % presentaron un gen relacionado con la producción de biofilm, el gen *espfm*.(60, 61) De los aislamientos ensayados se observó que los provenientes de orina presentaban una mayor CIM, en comparación a los aislamientos de sangre y tejido. En nuestro estudio se determinó que la CIM₉₀ de DFUCh-P4 fue 8 µg/mL, frente a los aislamientos de ERV provenientes del subgrupo orina en comparación a los subgrupos sangre y herida que presentaron una CIM₉₀ de 4 µg/mL. Según lo expuesto anteriormente, uno de los factores que explicaría la diferencia entre los subgrupos herida y sangre, sería la mayor capacidad de aislamientos provenientes de orina de generar biofilm, que disminuye la actividad de los compuestos dificultando el tratamiento antibacteriano.

4.2 Determinación de la CBM₅₀ y CBM₉₀ de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV

El modo de acción de los antibióticos es la forma en la cual los antibacterianos generan su efecto, ya sea bactericida o bacteriostático y se mide determinando la relación entre CBM/CIM, para esto se determina la concentración bactericida mínima (CBM), que corresponde a la mínima concentración de antibiótico que es necesaria para matar al 99.9 % de una población bacteriana.(53, 62) Se determina la CBM de distintas bacterias de una misma especie para poder calcular la CBM₅₀ y CBM₉₀ para esta especie, la primera corresponde a la menor concentración de un compuesto que mata al 50 % de las bacterias ensayadas y la segunda equivale a la menor concentración de un compuesto que mata al 90 % de las bacterias ensayadas.(53) Si la relación de la CBM/CIM presenta un valor ≤ 2 el compuesto tendrá modo de acción tipo bactericida, por el contrario si el valor resultante es > 2 el modo de acción será tipo bacteriostático, (63) por ejemplo en el caso de clindamicina frente a *S. aureus*, presenta una CBM de 16 $\mu\text{g/mL}$ y una CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$, por lo que el valor de la relación CBM/CIM es de 4, lo que da cuenta de un modo de acción de tipo bacteriostático.(64)

A continuación se presentan los datos de la actividad bactericida de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre SARM en las **tablas 11 y 12**, respectivamente:

Tabla 11. Actividad bactericida de DFUCh-O5 sobre SARM.

Fuente de aislamiento*	N° de aislamientos	Rango de CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CBM₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Aspirado traqueal	10	2 - 4	4	4
Herida	10	2 - 4	2	4
Sangre	10	2 - 8	2	4
Otros**	2	4 - 4	4	4
Total	32	2 - 8	4	4

*La CBM₅₀ y CBM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 3 veces (n=3).

**Tejido, hueso, líquido ascítico y líquido pleural.

A partir de los datos obtenidos en la **Tabla 11** el derivado DFUCh-O5 presenta una CBM₅₀ y una CBM₉₀ de 4 $\mu\text{g/mL}$ sobre aislamientos de SARM. Con los datos de las **Tablas 3 y 11**, se calculó la relación de las CBM₅₀/CIM₅₀ y CBM₉₀/CIM₉₀, dando valores de 2 y 1, respectivamente, según la definición mencionada (efecto antibacteriano: CBM/CIM ≤ 2 = Bactericida, CBM/CIM > 2 = bacteriostático), y teniendo en cuenta que se acepta como error del método +/- 1 dilución (55, 56), el compuesto presenta actividad bactericida sobre aislamientos de SARM.

A continuación se presenta la susceptibilidad de SARM frente DFUCh-P4:

Tabla 12. Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre SARM.

Fuente de aislamiento*	N° de aislamientos	Rango de CBM (µg/mL)	CBM ₅₀ (µg/mL)	CBM ₉₀ (µg/mL)
Aspirado traqueal	9	2 - 4	4	4
Herida	9	2 - 4	2	4
Sangre	9	2 - 4	4	4
Otros**	2	4 - 4	4	4
Total	29	1 - 4	2	4

*La CBM₅₀ y CBM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 3 veces (n=3).

**Tejido, hueso, líquido ascítico y líquido pleural.

Se observa que DFUCh-P4 presenta una CBM₅₀ de 2 µg/mL y una CBM₉₀ de 4 µg/mL frente a aislamientos de SARM, con los datos de las **Tablas 4 y 12** se calcula la relación CBM₅₀/CIM₅₀ y CBM₉₀/CIM₉₀ y se obtiene un valor de 1 en ambos casos, esto indica que el derivado presenta actividad bactericida sobre los aislamientos de SARM ensayados.

En la **Tabla 13 y 14** se presentan los datos de la actividad bactericida de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre ERV:

Tabla 13. Actividad bactericida de DFUCh-O5 sobre ERV.

Fuente de aislamiento*	N° de aislamientos	Rango de CBM (µg/mL)	CBM ₅₀ (µg/mL)	CBM ₉₀ (µg/mL)
Herida	10	2 - 8	4	4
Líquido peritoneal	10	2 - 8	4	8
Orina	10	2 - 4	2	4
Sangre	10	2 - 4	4	4
Otros**	4	2 - 4	4	4
Total	44	2 - 8	4	4

*La CBM₅₀ y CBM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 3 veces (n=3).

**Líquido articular, fístula y tejido.

DFUCh-O5 presentó una CBM₅₀ de 4 µg/mL y una CBM₉₀ de 4 µg/mL sobre aislamientos de ERV, con los datos obtenidos en las **Tabla 7 y 13** se calcula la relación CBM₅₀/CIM₅₀ y CBM₉₀/CIM₉₀ y

da un valor de 2 y 1, respectivamente, esto indica que DFUCh-O5 posee actividad bactericida sobre los aislamientos de ERV.

Tabla 14. Actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre ERV.

Fuente de aislamiento*	N° de aislamientos	Rango de CBM (µg/mL)	CBM ₅₀ (µg/mL)	CBM ₉₀ (µg/mL)
Herida	10	2 - 8	4	8
Líquido peritoneal	9	2 - 8	4	8
Orina	8	4 - 8	4	8
Sangre	10	2 - 8	4	4
Otros**	4	4 - 4	4	4
Total	41	2 - 8	4	8

*La CBM₅₀ y CBM₉₀ para cada fuente de aislamiento se reprodujo 3 veces (n=3).

**Líquido articular, fístula y tejido.

DFUCh-P4 presenta una CBM₅₀ de 4 µg/mL y una CBM₉₀ de 8 µg/mL frente a aislamientos de ERV, con los datos obtenidos en las **Tablas 8 y 14** se calcula la relación CBM₅₀/CIM₅₀ y se obtiene un valor de 1 y para la relación CBM₉₀/CIM₉₀ un valor de 2, esto indica que DFUCh-P4 presenta actividad bactericida sobre aislamientos de ERV ensayados.

4.3 Influencia de albúmina y de suero humano en la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV

Se determinó la CIM de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 en presencia de suero humano y albúmina sobre distintos aislamientos bacterianos con el fin de simular un entorno fisiológico.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del efecto causado por el suero humano sobre la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4:

Tabla 15. Efecto del Suero Humano (SH) en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

Bacterias*	CIM (µg/mL)**			
	DFUCh-O5	DFUCh-O5 + SH	DFUCh-P4	DFUCh-P4 + SH
SASM ATCC® 29213	2	16	4	32
SARM ATCC® 43300	2	16	4	32
SARM Clínico 178	2	32	4	32
SARM Clínico 401	2	32	4	32
ESV ATCC® 29212	2	16	4	32
ERV Clínico 828	2	16	4	32
ERV Clínico 1666	2	16	4	32

* SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, ESV: *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina, ERV: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

**influencia de SH para cada bacteria se reprodujo 4 veces (n=4).

Los datos expuestos en la **Tabla 15** dan cuenta del efecto del suero humano en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente las diferentes cepas y aislamientos clínicos ensayados. La CIM de DFUCh-O5 es de 2 µg/mL para las 7 bacterias ensayadas, pero en presencia de suero humano esta CIM se eleva a valores de 16 y 32 µg/mL. Para DFUCh-P4 que presenta valores de CIM de 4 µg/mL para el 100 % de las bacterias ensayadas, estos se elevan a 32 µg/mL en presencia de suero humano, estos resultados muestran que la presencia de suero humano disminuye la actividad de DFUCh-O5 8 a 16 veces y de DFUCh-P4 8 veces, esto se debe a la interacción de las proteínas plasmáticas con los compuestos, disminuyendo el porcentaje de fármaco libre, que es el responsable de ejercer la acción antibacteriana.

A continuación se presenta el efecto causado por la presencia de albúmina sobre la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4:

Tabla 16. Efecto de la albúmina 40 g/dL en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

Bacterias*	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)**			
	DFUCh-O5	DFUCh-O5 + Albúmina	DFUCh-P4	DFUCh-P4 + Albúmina
SASM ATCC© 29213	2	32	4	>32
SARM ATCC© 43300	2	32	4	>32
SARM Clínico 178	2	32	4	32
SARM Clínico 401	2	32	4	>32
ESV ATCC© 29212	2	32	4	32
ERV Clínico 828	4	32	4	32
ERV Clínico 1666	2	32	2	32

* SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, ESV: *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina, ERV: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

**La influencia de albúmina para cada bacteria se reprodujo 4 veces (n=4).

Los datos expuestos en la **Tabla 16** dan cuenta del efecto de la albúmina en la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente las diferentes cepas y aislamientos clínicos ensayados. La CIM de DFUCh-O5 es de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la mayoría de las bacterias ensayadas, pero en presencia de albúmina esta CIM se eleva a valores de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para DFUCh-P4 que presenta valores de CIM de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el 86 % de las bacterias ensayadas, estos se elevan a ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia de albúmina, estos resultados muestran que la presencia de albúmina disminuye la actividad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 a 8 y 16 veces respectivamente, esto se debe a la interacción de la albúmina con los compuestos, debido que la fracción libre de fármaco es la que ejerce la acción y esta disminuye en presencia de albúmina.

Por otro lado, tenemos los datos de la CIM en presencia y en ausencia de albúmina para el derivado DFUCh-P4, en la tabla se muestra que la CIM del compuesto en ausencia de albúmina es de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 6 de los 7 casos ensayados y de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el caso restante, y en presencia de albúmina la CIM es de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 4 casos y para los 3 casos restantes la CIM fue mayor a la concentración ensayada, en base a esto se podría decir que la CIM de DFUCh-P4 en presencia de albúmina aumento de 8 a 16 veces en comparación a la CIM de DFUCh-P4 en ausencia de esta, de manera similar a lo que ocurre con DFUCh-O5.

4.4 Porcentaje de unión a albúmina de los derivados quinónicos DFUCH-O5 y DFUCH-P4

El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, como la albúmina, tiene influencia en el comportamiento farmacocinético de los fármacos. Los fármacos se unen a esta proteína transportadora, pero solo la fracción libre puede acceder a su blanco y ejercer su efecto. Conocer el porcentaje de unión a albúmina de los compuestos permite, por ejemplo, seleccionar la dosis a administrar en estudios *in vivo*.

Se determinó el porcentaje de unión a albúmina mediante el ensayo de diálisis al equilibrio, primero es necesario realizar una curva de calibración de los compuestos a estudiar.

Como validación del ensayo de diálisis al equilibrio se realizó la determinación del porcentaje de unión a albúmina 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 nonahidratado (**Figura 7**) que produce un color violeta oscuro en forma inmediata, y que es medido a 534 nm.(65)

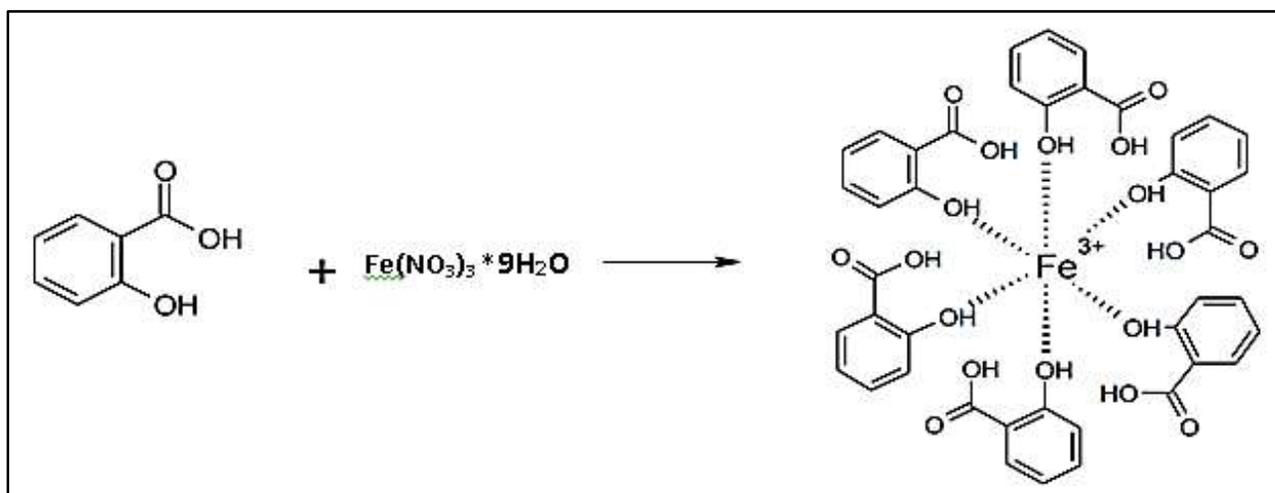


Figura 7. Fundamento de la reacción para la cuantificación colorimétrica del ácido salicílico.

Primero se procedió a preparar la curva de calibración del ácido salicílico (**Grafico 1**).

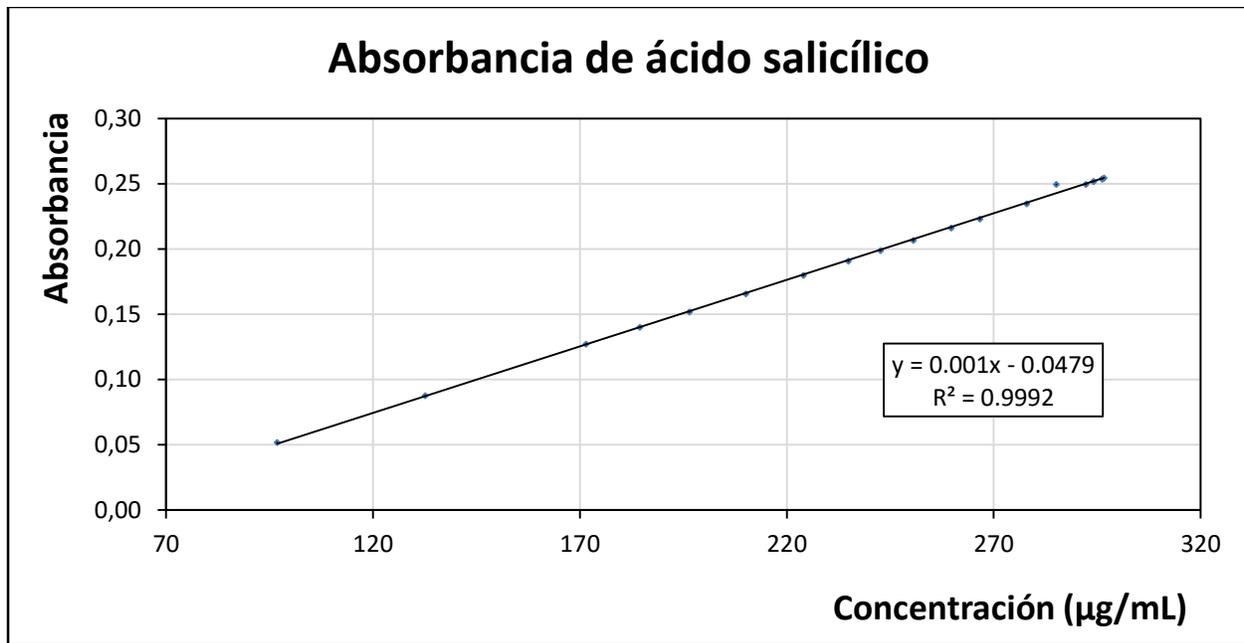


Grafico 1. Curva de calibración para ácido salicílico.
Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

A continuación se muestra el perfil de concentraciones obtenido del ácido salicílico (**Grafico 2**).

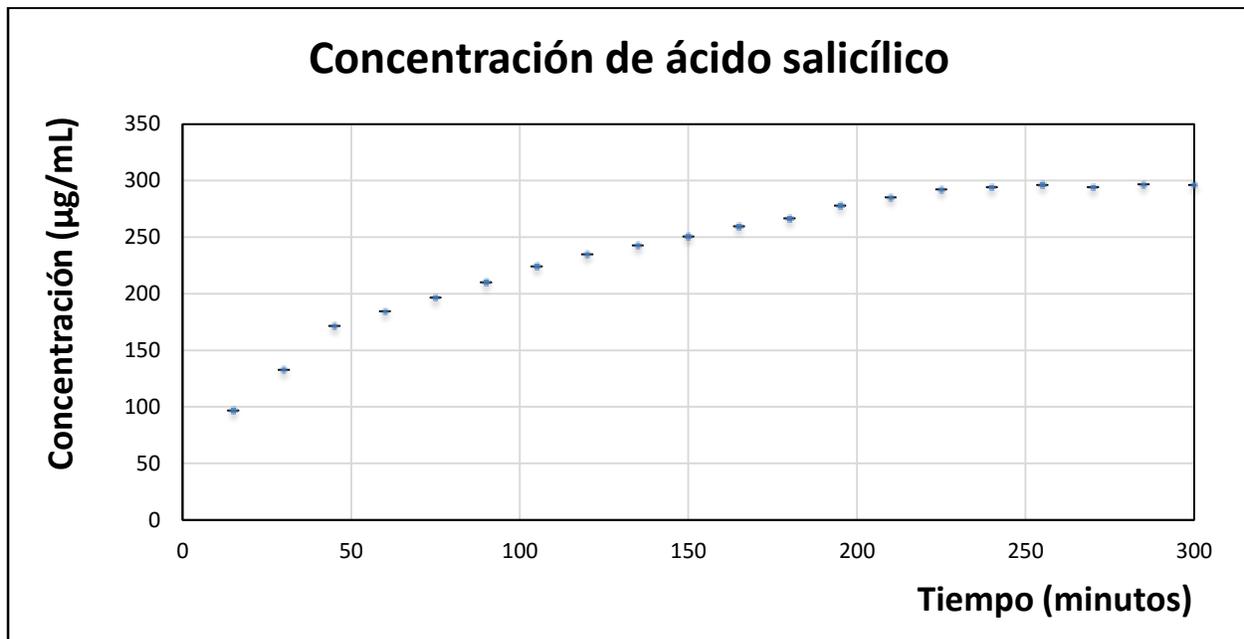


Grafico 2. Curva concentración versus tiempo para ácido salicílico en el ensayo de diálisis al equilibrio.
Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

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:

$$(3) \quad F_U = F_T - F_L$$

Dónde:

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

F_T = masa (mg) de compuesto total.

F_L = masa (mg) de compuesto libre.

$$(4) \quad \% F_U = \left(\frac{F_U}{F_T} \right) \times 100$$

Los datos (**Tabla 17**), corresponden al cálculo del porcentaje de unión a albúmina obtenidos para ácido salicílico.

Tabla 17. Resumen de datos para el cálculo del porcentaje de unión a albúmina de ácido salicílico.

Ácido salicílico	
Fármaco total (mg)	12.05
Fracción libre (mg)	6.24
Fracción unida (mg)	5.73
% unión a albúmina	48.15±2.13

Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

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 .(66)

Para la determinación del porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 y de DFUCh-P4 mediante el ensayo de diálisis al equilibrio, primero es necesario realizar una curva de calibración, se prepararon concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL de los derivados, los resultados obtenidos se muestran en los **Gráficos 3 y 4**.

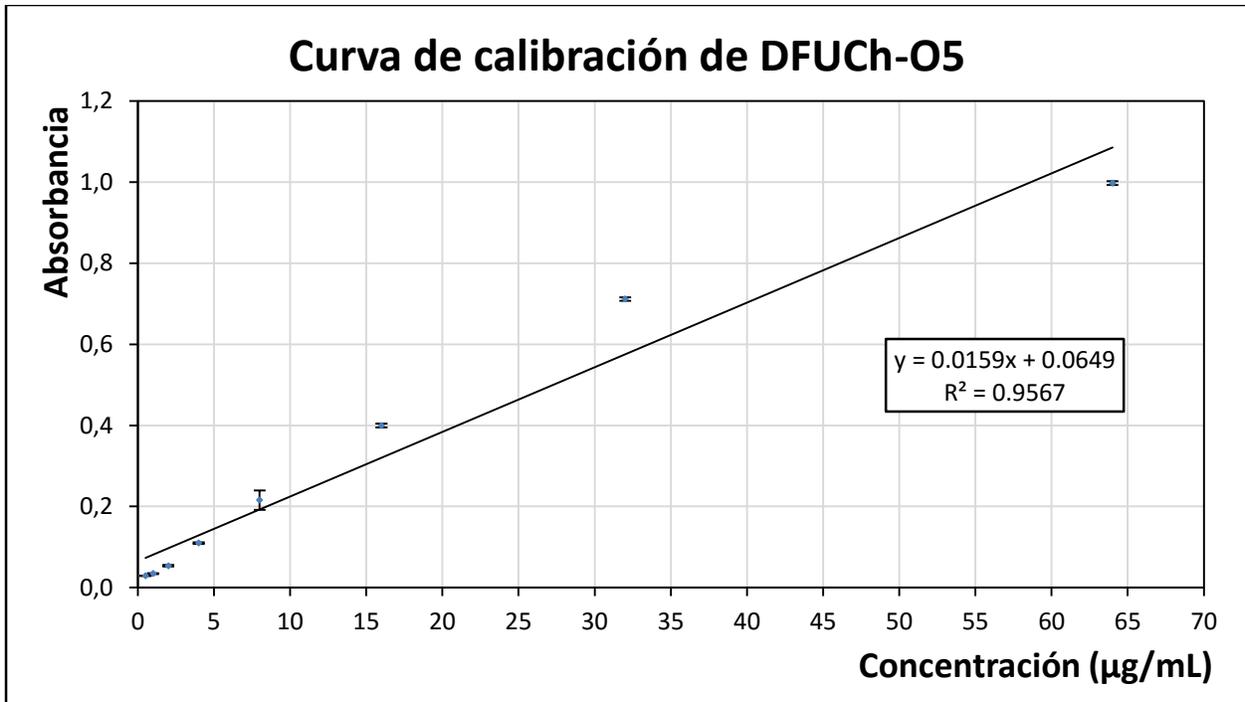


Grafico 3. Curva de calibración para DFUCh-O5.

Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

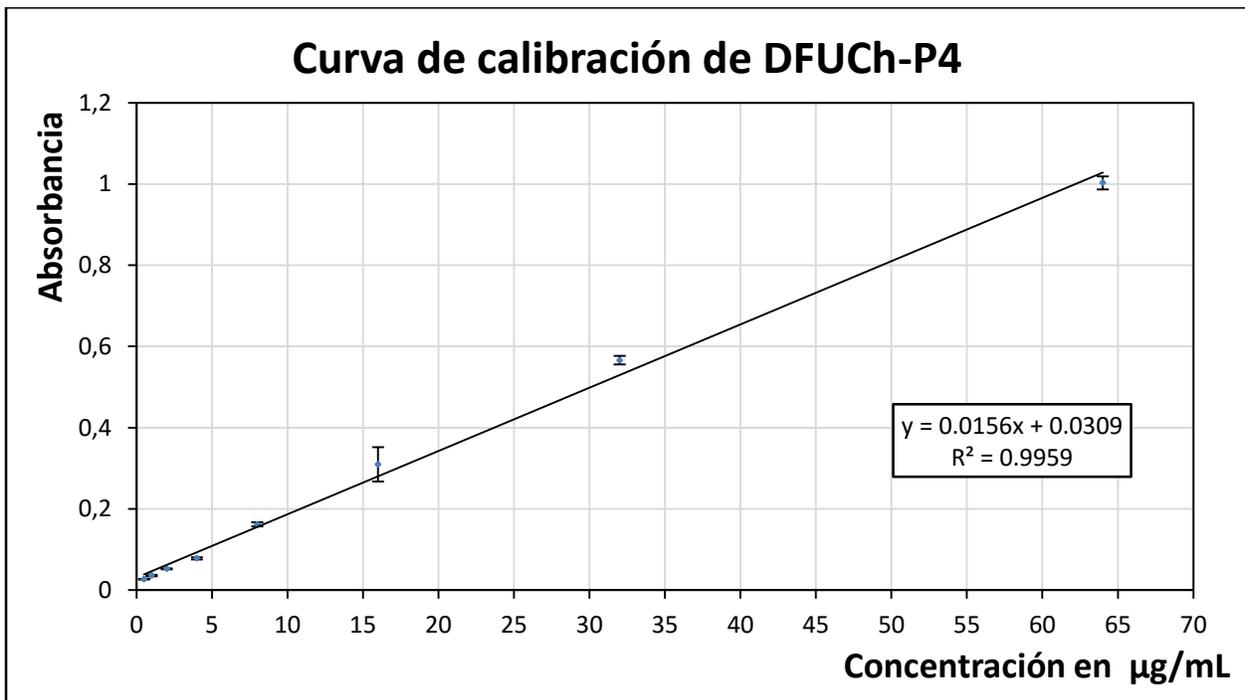


Grafico 4. Curva de calibración para DFUCh-P4.

Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

Se procede a realizar el ensayo de diálisis al equilibrio y los resultados son los siguientes (Grafico 5 y 6).

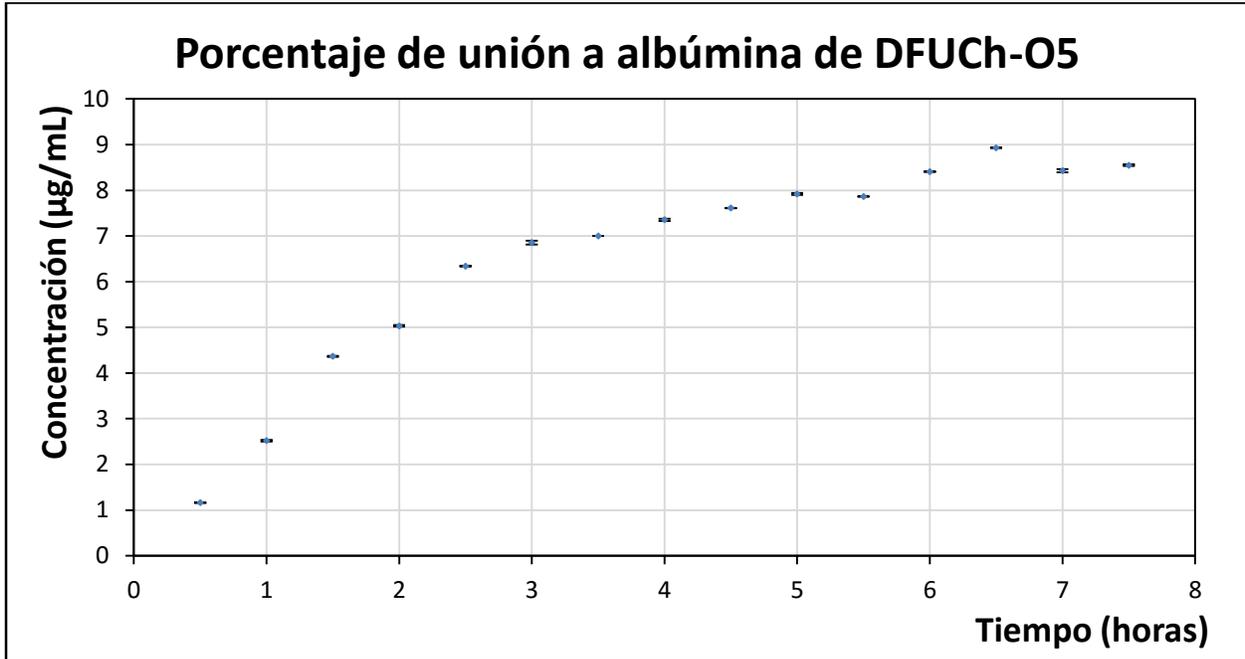


Grafico 5. Curva concentración versus tiempo para DFUCh-O5 en el ensayo de diálisis al equilibrio. Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

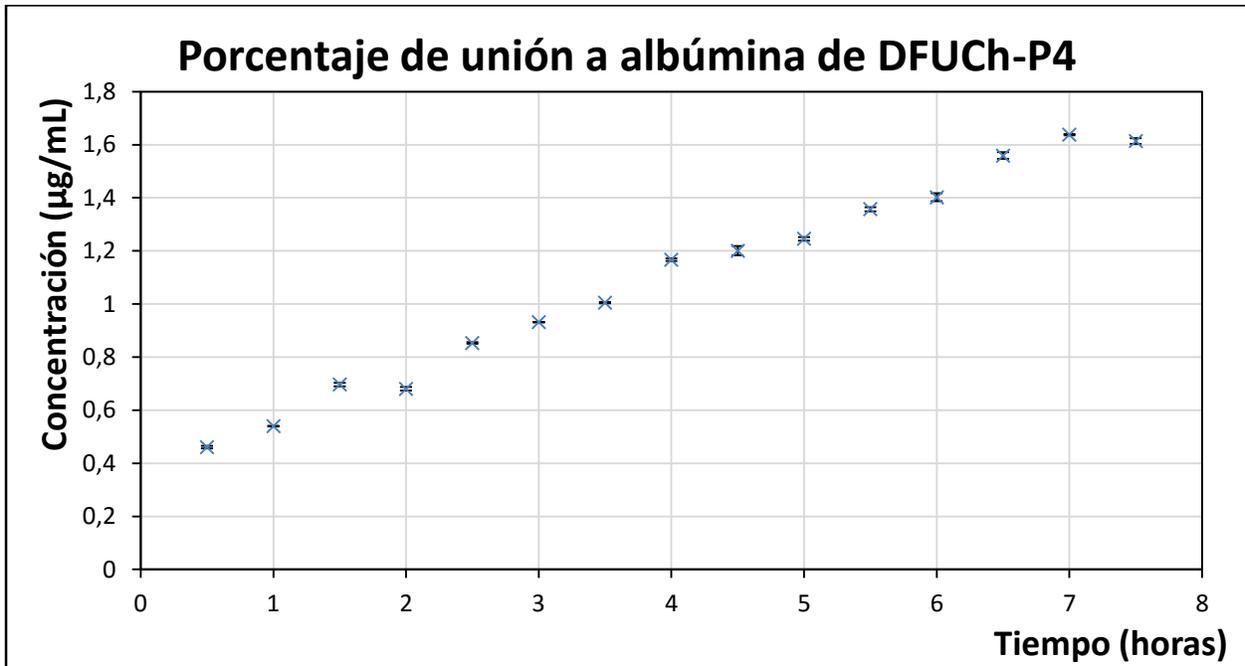


Grafico 6. Curva concentración versus tiempo para DFUCh-P4 en el ensayo de diálisis al equilibrio. Cada valor fue medido en triplicado (n=3).

Se determinó el porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 y DFUCh-P4, calculando el promedio de los últimos tres valores de concentración, a continuación se muestran los datos obtenidos (**Tabla 18**):

Tabla 18. Resumen de datos para el cálculo del porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

	DFUCh-O5	DFUCh-P4
Fármaco total (mg)	1.20	1.2
Fracción libre (mg)	0.18	0.03
Fracción unida (mg)	1.02	1.16
% unión a albúmina	84.99±5.64	97.18±2.32

El porcentaje de unión a albúmina para DFUCh-O5 y DFUCh-P4 se reprodujo 3 veces (n=3).

En base a los datos obtenidos el porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-O5 corresponde a un 85 %, por otro lado el porcentaje de unión a albúmina de DFUCh-P4 es de 97 %. Estos resultados muestran que DFUCh-O5 presenta un menor porcentaje de unión a albúmina, con respecto a DFUCh-P4, este factor afecta la actividad antibacteriana de los compuestos y es de utilidad para seleccionar la dosis adecuada a administrar en estudios de toxicidad y efectividad *in vivo*.

4.5 Cuantificación de efecto post antibiótico (PAE) de DFUCh-O5 y DFUCh-P4

El efecto post antibiótico o PAE, se entiende como la capacidad de un antibacteriano de suprimir el nuevo crecimiento bacteriano pese a que su concentración sérica cae por debajo de la CIM. La presencia o ausencia de PAE determinará el modelo de acción de los fármacos antibacterianos. Aquellos fármacos que posean PAE serán clasificados como “concentración-dependiente” y aquellos fármacos que carezcan de PAE serán clasificados como “tiempo-dependiente”; esta clasificación responde a la relación entre la concentración plasmática del antibiótico y la CIM del microorganismo frente a un antibiótico y es útil para evaluar la eficacia terapéutica. En los fármacos concentración-dependiente su acción se relaciona con la concentración plasmática que alcancen, en cambio en los fármacos tiempo-dependientes, la actividad del antibacteriano depende del tiempo durante el cual su concentración supera a la CIM (descrito como $T > CIM$) y es independiente de la concentración máxima alcanzada.(62) El efecto post antibiótico se calculará mediante la utilización de la siguiente ecuación:

$$PAE = T - C$$

En donde:

PAE = efecto post antibiótico.

T = Tiempo (h) para que el cultivo de prueba aumente en una unidad logarítmica la UFC por mL.

C = Tiempo (h) para que el cultivo de control aumente en una unidad logarítmica la UFC por mL.

A modo de ejemplo se calculará el PAE de DFUCh-P4 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente a ESV ATCC© 29212:

$$T = 2 \text{ h}; C = 2 \text{ h}$$

$$PAE \text{ de DFUCh - P4 (4 } \mu\text{g/mL)} = 2 - 2 = 0 \text{ horas}$$

El resultado indica que el tiempo de supresión del crecimiento bacteriano tras la exposición DFUCh-P4 a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ESV ATCC© 29212 es cero y por lo tanto, DFUCh-P4 posee un efecto tiempo-dependiente.

En la **Tabla 19** se muestran los resultados de PAE frente a SARM ATCC® 43300:

Tabla 19. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SARM ATCC® 43300.

Tiempo (horas)	SARM ATCC® 43300										C	T	PAE
	Log UFC					Diferencia de Log							
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0				
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	

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

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

A continuación se presentan los datos obtenidos de PAE frente a SARM 178 clínico (**Tabla 20**):

Tabla 20. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SARM 178 clínico.

Tiempo (horas)	SARM 178 clínico										C	T	PAE
	Log UFC					Diferencia de Log							
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0				
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	2.11	2.41	2.62	3.49	3.82	0.3	0.51	1.38	1.71	-	3	0	

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

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

A continuación se muestran los valores de PAE obtenidos frente a ESV ATCC® 29212 (**Tabla 21**):

Tabla 21. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a ESV ATCC® 29212.

Tiempo (horas)	ESV ATCC® 29212										C	T	PAE
	Log UFC					Diferencia de Log							
	0	2	3	3.5	4	2-0	3-0	3.5-0	4-0				
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	

ESV: *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina.

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

Por último los resultados de PAE frente a ERV 828 clínico (**Tabla 22**)

Tabla 22. Efecto post antibiótico de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a ERV 828 clínico.

Tiempo (horas)	ERV 828 clínico										C	T	PAE
	Log UFC					Diferencia de Log							
	0	1	2	3	4	1-0	2-0	3-0	4-0				
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	

ERV: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

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

En base a los resultados (Tablas 29, 30, 31 y 32) expuestos se presenta a continuación los gráficos que dan cuenta del crecimiento bacteriano después del uso de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a diferentes cepas y aislamientos bacterianos.

Se estudió SASM ATCC© 29213, y sus resultados se presentan a continuación:

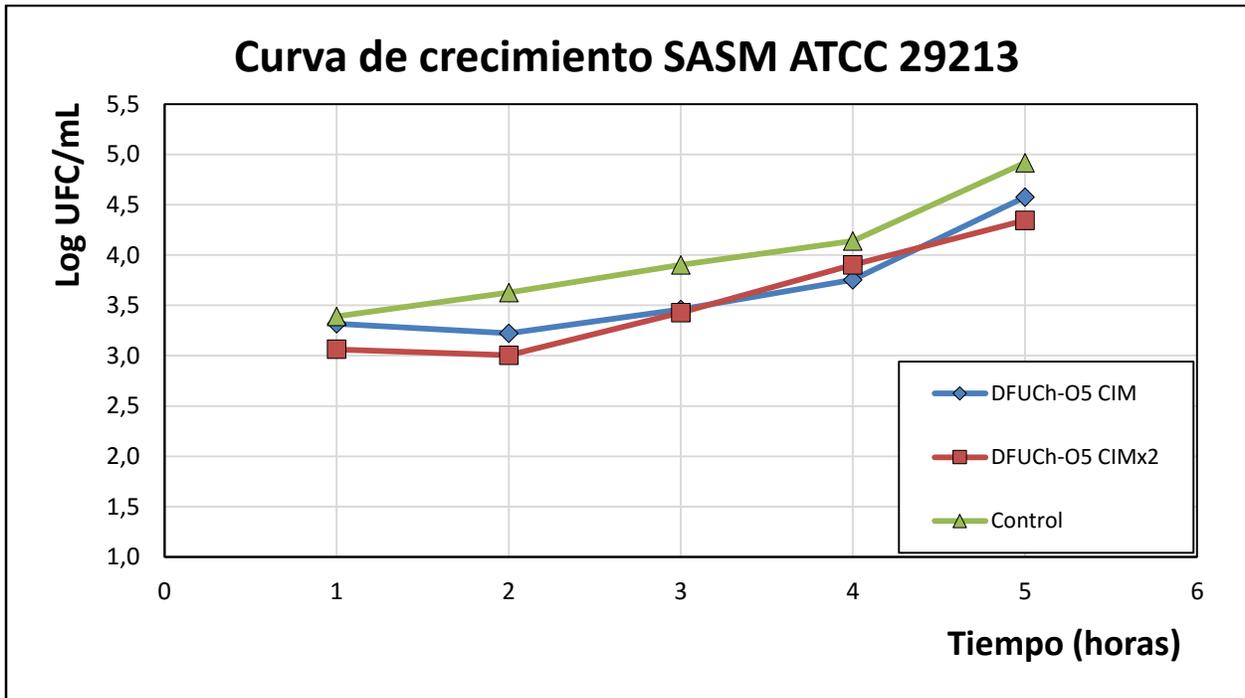


Gráfico 7. Crecimiento bacteriano expresado en logaritmo de UFC por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a *S. aureus* ATCC© 29213.

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

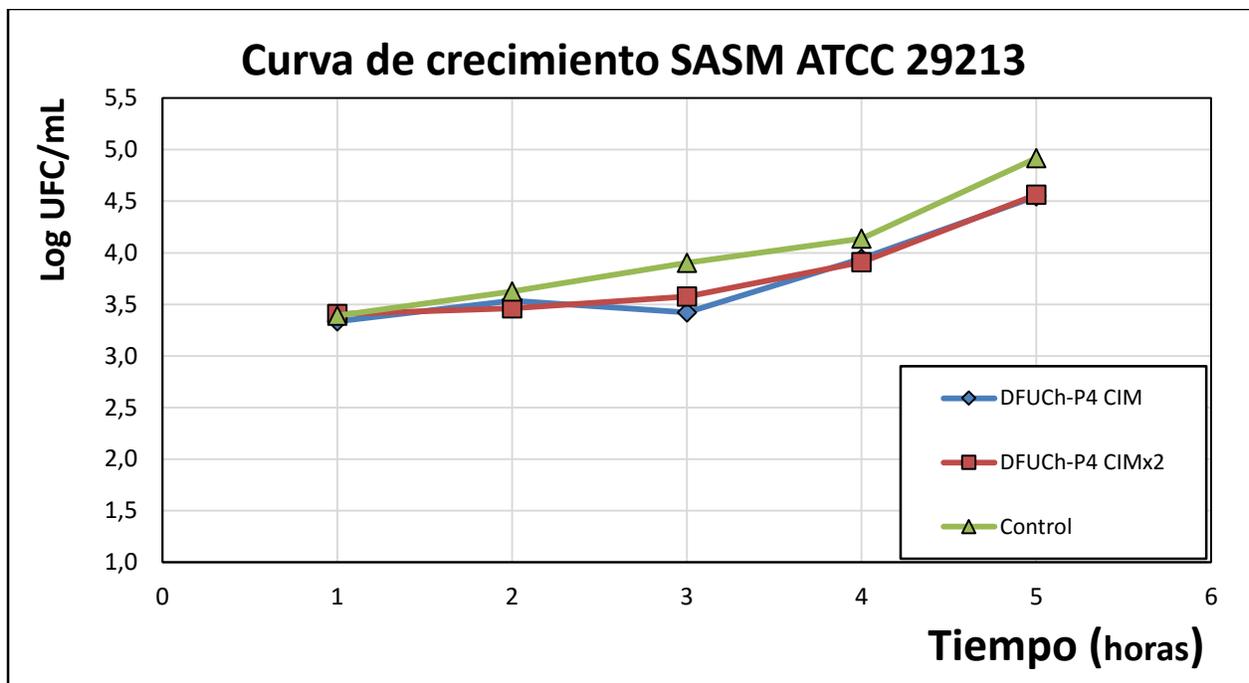


Gráfico 8. Crecimiento bacteriano expresado en logaritmo de UFC por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a *S. aureus* ATCC© 29213.

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

De los **Gráficos 7 y 8** se puede observar que DFUCh-O5 presentó una mejor actividad frente a *S. aureus* ATCC© 29213, comparado con DFUCh-P4 en las primeras 2 horas, sin embargo, los valores de PAE determinados para DFUCh-O5 y DFUCh-P4 son de cero horas, esto los clasifica como tiempo-dependientes.

Para SARM 178 clínico los resultados obtenidos son los siguientes:

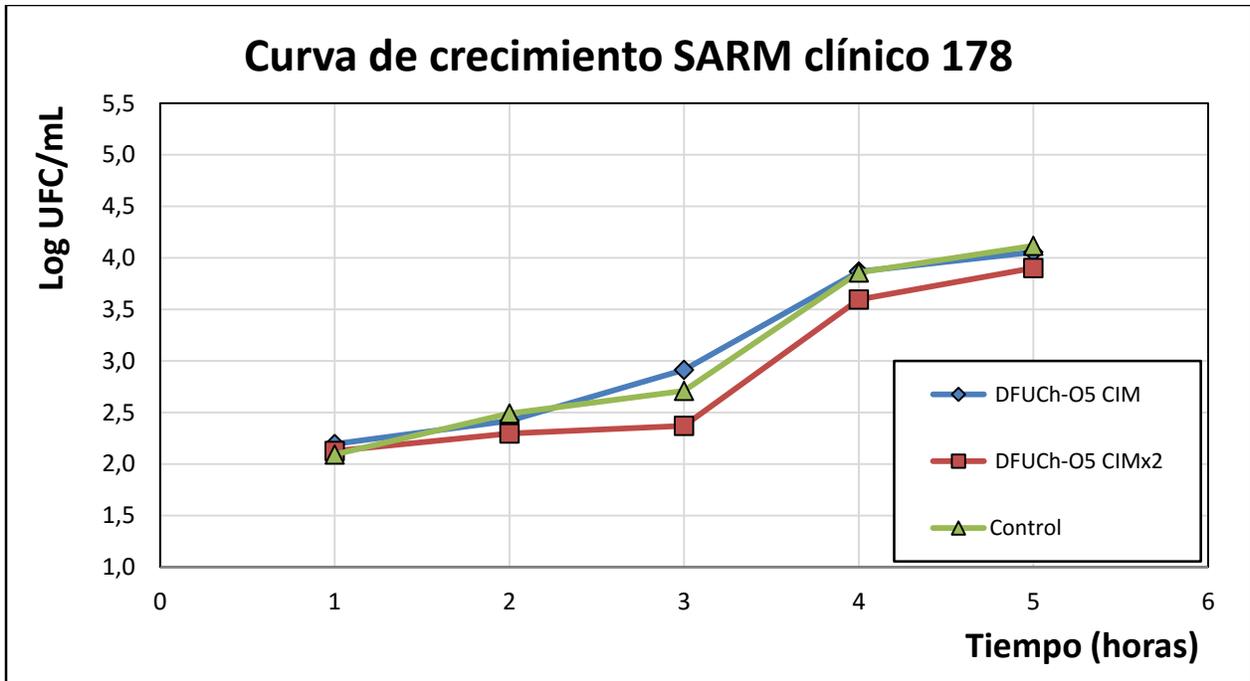


Gráfico 9. Crecimiento bacteriano expresado en UFC por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a SARM 178 clínico.

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

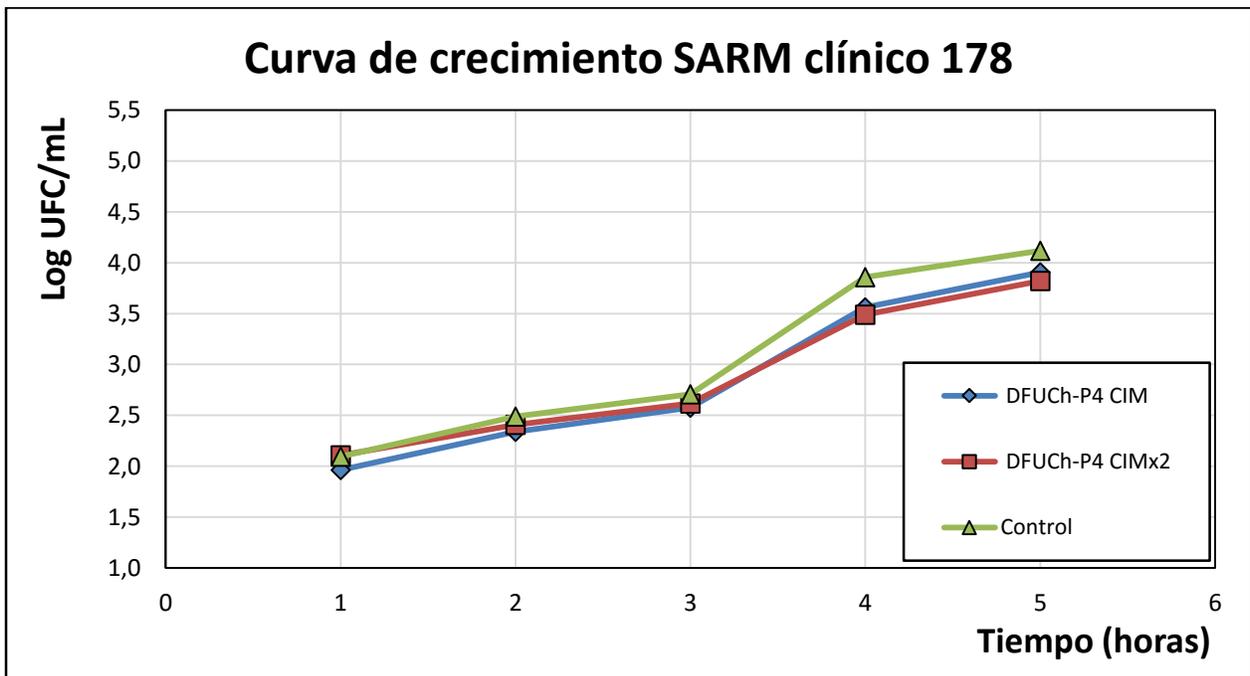


Gráfico 10. Crecimiento bacteriano expresado en UFC colonias por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a SARM 178 clínico.

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

En base a los **Gráficos 9 y 10**, al comparar DFUCh-O5 con DFUCh-P4, al cabo de 3 horas, DFUCh-O5 presentó una mayor actividad a concentraciones de CIMx2, pero con el paso del tiempo se reestablece el crecimiento, dando valores cercanos entre ellos. Esto concuerda con el valor de PAE obtenido que fue de cero horas, lo que los clasifica como tiempo-dependiente.

Para el caso de ESV ATCC® 29212 los resultados son los siguientes:

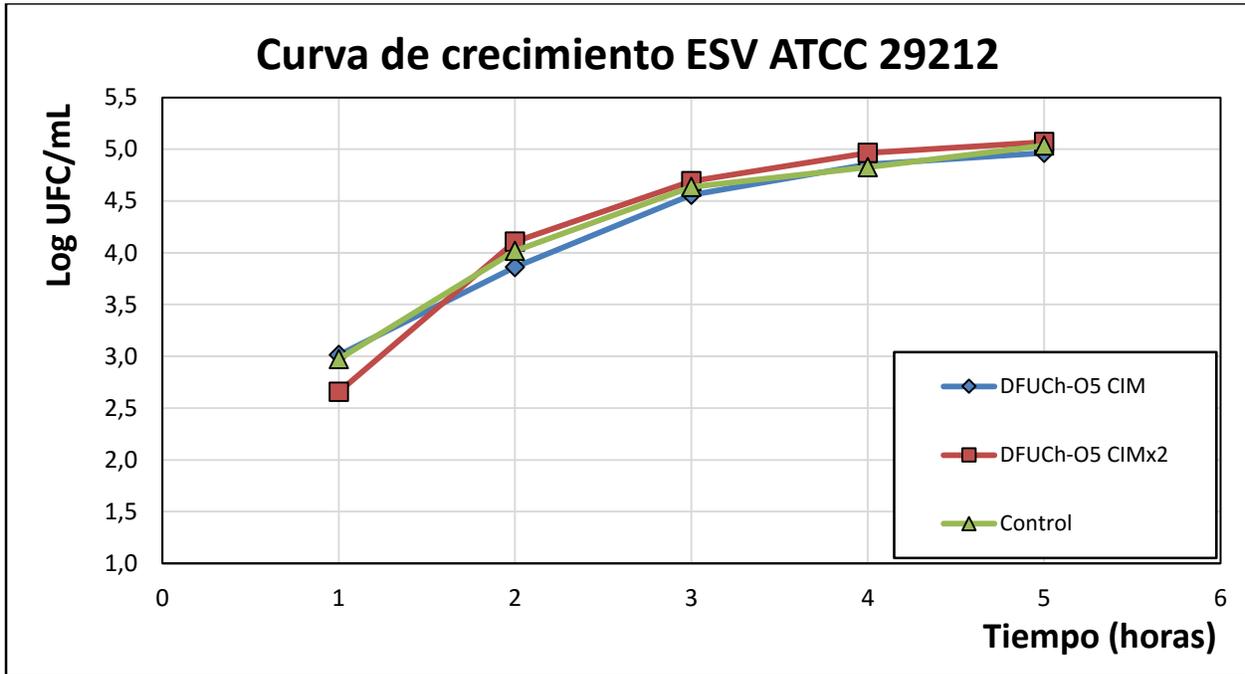


Gráfico 11. Crecimiento bacteriano expresado en UFC por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a ESV ATCC® 29212.

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

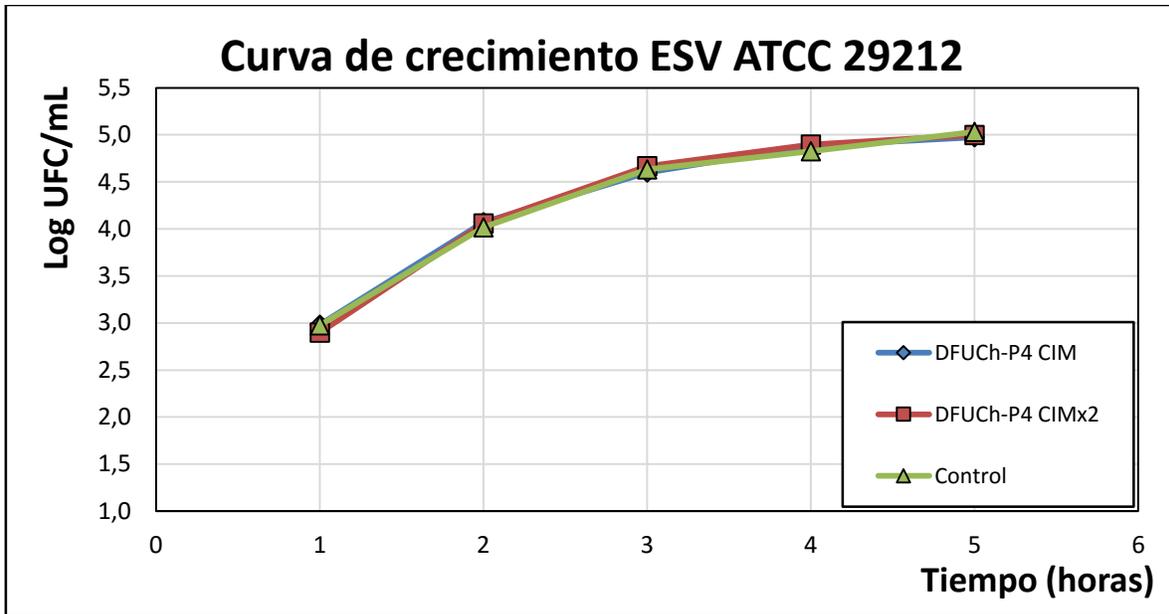


Gráfico 12. Crecimiento bacteriano expresado en UFC por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a ESV ATCC® 29212.

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

En base a los **Gráficos 11 y 12** se observa un comportamiento similar en ambos casos, el PAE para esta bacteria dio un valor de 0 horas, lo cual indica que posee efecto tiempo-dependiente.

Finalmente se evaluó ERV 828 clínico los resultados se presentan a continuación:

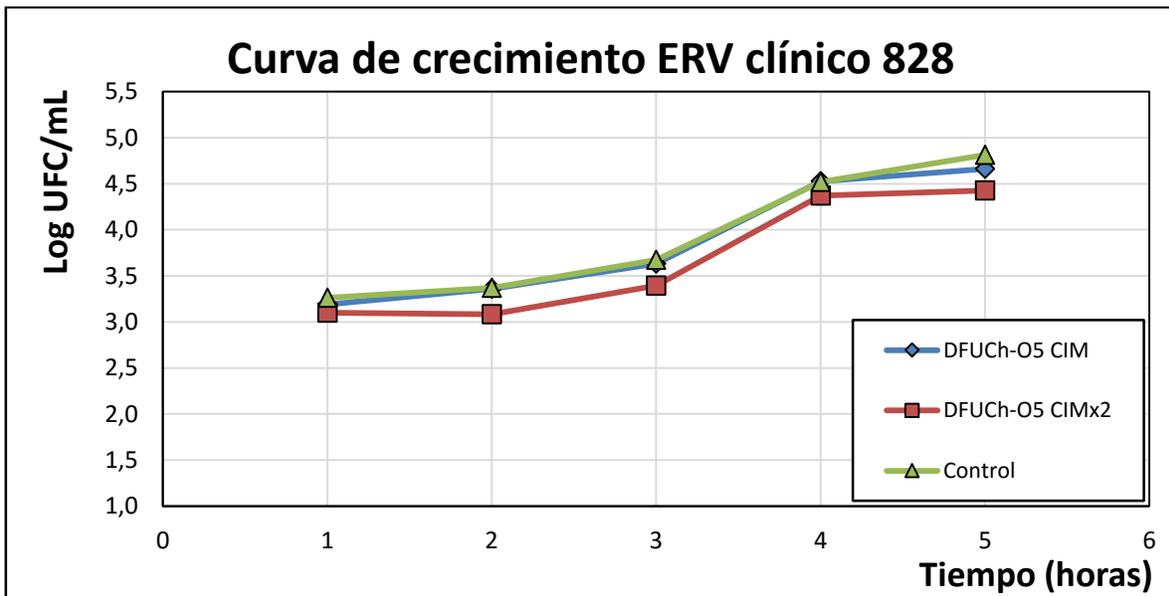


Gráfico 13. Crecimiento bacteriano expresado en UFC por mL, después del uso de DFUCh-O5 frente a ERV 828 clínico.

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

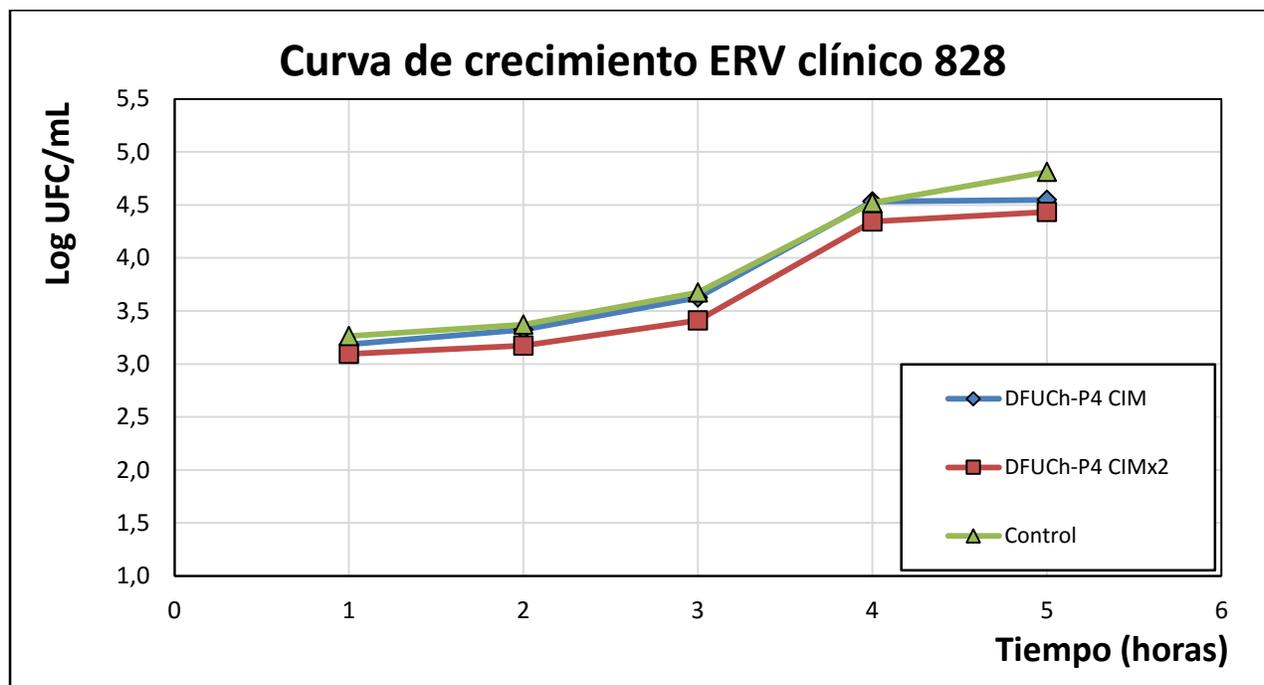


Gráfico 14. Crecimiento bacteriano expresado en UFC por mL, después del uso de DFUCh-P4 frente a ERV 828 clínico.

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

En este caso tanto DFUCh-O5 como DFUCh-P4, presentan un comportamiento similar (**Gráfico 13 y 14**), no se observan diferencias significativas y al igual que el caso anterior presentaron un PAE de cero horas, lo que indica que poseen un efecto tiempo-dependiente.

Los resultados muestran que la utilización de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 sobre las diferentes bacterias ensayadas no presentaron PAE, lo que se confirma con las curvas de crecimiento mostradas en los gráficos, en donde se aprecia que el crecimiento bacteriano de las cepas y aislamientos ensayados a diferentes concentraciones es similar al crecimiento de las bacterias usadas como control, por lo tanto, el uso de los derivados no causó supresión del crecimiento bacteriano, además los PAE calculados que dieron tiempos inferiores a 30 minutos no se consideraron como significativos, informándose como PAE = 0 h.

De acuerdo a estos resultados, los compuestos presentan un modo de acción antibacteriano tiempo-dependiente, lo que indica 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 beta lactámicos que no presentan PAE en los bacilos Gram negativos.(62)

4.6 Determinación del porcentaje de permeabilidad de DFUCh-O5 y DFUCh-P4

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 estimar si los fármacos pueden ser absorbidos por transporte pasivo. Este sistema se desarrolla en placas de 96 pocillos (compartimiento donador), 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 compartimiento aceptor.(67)

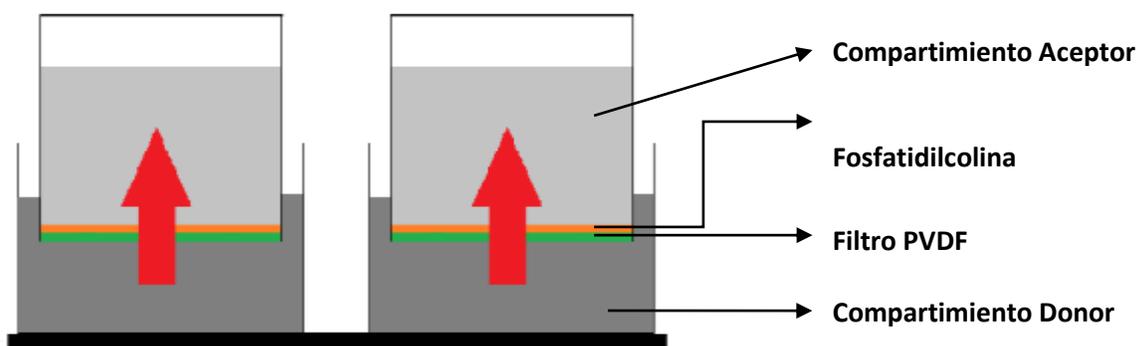


Figura 8. Esquema del sistema de PAMPA.

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

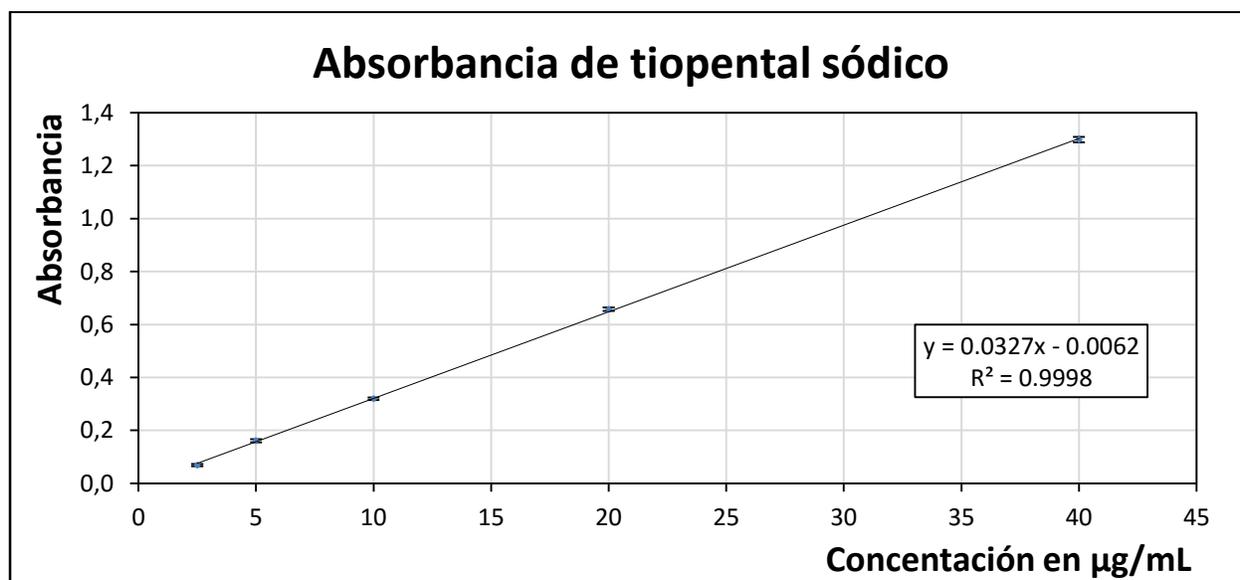


Gráfico 15. Curva de calibración para tiopental sódico se reprodujo 4 veces (n=4).

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 ($\mu\text{g/mL}$) del compartimiento aceptor a tiempo t.

[D] = Concentración ($\mu\text{g/mL}$) del compartimiento donador a tiempo cero.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 23. Absorbancias, concentraciones y porcentaje de permeabilidad para tiopental sódico.

Compuesto	Abs. t_0	Abs. t_t	Conc. a t_0	Conc. a t_t	Porcentaje de permeabilidad
tiopental	0.67±0.02	0.09±0.004	20.30±1.59	3.37±0.21	19.59±0.29

Porcentaje de permeabilidad para tiopental sódico se reprodujo 4 veces (n=4).

En base a los resultados (**Tabla 23**) 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.(68)

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

Tabla 24. Valores de absorbancias obtenidos en la realización de PAMPA para DFUCh-O5 y DFUCh-P4.

Tiempo (horas)	Absorbancia de DFUCh-O5		Absorbancia de DFUCh-P4	
	Donor	Aceptor	Donor	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

Ensayo PAMPA se reprodujo 4 veces (n=4).

Los resultados obtenidos (**Tabla 24**) indican que la absorbancia de los compuestos es variable. Al comparar el valor de la absorbancia del compartimiento donador no coincide con la absorbancia determinada a tiempo 0, además la sumatoria de las absorbancias de los

compartimientos aceptor y donador, no coinciden con la absorbancia del compartimiento donador a tiempo 0, indicando esto 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 25** se observan valores de absorbancia obtenidos:

Tabla 25. Absorbancias obtenidos en estudio cinético de degradación para DFUCh-O5.

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

*Estudio cinético de degradación se reprodujo 4 veces (n=4).

Los resultados obtenidos (**Tabla 25**) 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 una degradación 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.

4.7 Actividad sinérgica en la coadministración de DFUCh-O5 o DFUCh-P4 con linezolid y vancomicina sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV

En farmacología, la asociación de dos o más fármacos que den como resultado un mayor efecto que aquellos que podrían obtenerse si alguno de los fármacos se administrara individualmente, recibe el nombre de efecto sinérgico (47), La influencia de la coadministración de los derivados con antibióticos de uso clínico, se estudió a través del método del tablero de ajedrez, (46) este consiste en una placa de 96 pocillos en los cuales se depositan soluciones de diferentes proporciones de antibacterianos sobre las bacterias a estudiar, lo que sirve para evaluar alternativas terapéuticas en combinación lo que favorecería la terapia, bajando las dosis de fármacos y disminuyendo las potenciales RAMs (69), los antibióticos de uso clínico fueron linezolid y vancomicina , los cuales tienen mecanismos de acción diferentes al mecanismo de acción propuesto para los derivados; linezolid, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, específicamente en la unidad 50s, mientras que vancomicina actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano. A continuación se presentan las ecuaciones usadas para la determinación de los índices de concentraciones fraccionarias inhibitorias (FIC) y sus sumatorias (Σ FIC).

El índice de FIC para dos antibióticos A y B su actividad asociada estará dada por:

$$(1) \quad \text{FIC A} = \frac{\text{CIM(A en presencia de B)}}{\text{CIM(A solo)}}$$

$$(2) \quad \text{FIC B} = \frac{\text{CIM(B en presencia de A)}}{\text{CIM(B solo)}}$$

La sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria o Σ FIC estará dada por:

$$\Sigma \text{FIC} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

A modo de ejemplo se calcularán los FIC y Σ FIC para la asociación de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SASM ATCC© 29213, los resultados se muestran en la **Tabla 26**:

Tabla 26. Efecto de la asociación de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SASM ATCC© 29213.

DFUCh-P4	16								
	8								
	4								
	2								
	1								
	0.5								
	0.125								
	0								
	µg/mL	0	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
DFUCh-O5									

$$\text{FIC DFUCh - P4} = \frac{2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 0.5$$

$$\text{FIC DFUCh - O5} = \frac{0,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 0.5$$

$$\Sigma\text{FIC} = 0.5 + 0.5 = 1$$

La interpretación de datos se realizará de acuerdo a la clasificación de *Lorian et al.*(51) El valor obtenido para la ΣFIC es de 1, esto da cuenta de un efecto de adición cuando se asocian DFUCh-O5 y DFUCh-P4 frente a SASM ATCC© 29213.

La **Tabla 27** muestra los resultados de la determinación de la actividad sinérgica de DFUCh-O5 y linezolid.

Tabla 27. Efecto de la asociación de DFUCh-O5 y linezolid.

Bacteria	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				FICA	FICB	Σ FIC	EFECTO*
	DFUCh-O5	linezolid	DFUCh-O5 en presencia de linezolid	linezolid en presencia de DFUCh-O5				
SASM ATCC® 29213	2	4	1	2	0.5	0.5	1	AD
SARM Clínico 178	8	2	1	1	0.125	0.5	0.625	AD
ESV ATCC® 29212	4	4	2	2	0.5	0.5	1	AD
ERV Clínico 828	4	4	2	2	0.5	0.5	1	AD

FICA Concentración inhibitoria fraccionaria de DFUCh-O5, FICB Concentración inhibitoria fraccionaria de linezolid, Σ FIC Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria.

* ≤ 0.5 : sinergia (S), $> 0.5 - \leq 1.0$: adición (AD), $> 1.0 - \leq 2.0$: indiferencia (I), > 2.0 : antagonismo (AT). (51)

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

En la **Tabla 27** se observa que SASM ATCC® 29213, EFSV ATCC® 29212 y ERV clínico 828 presentan un valor de 1 para la Σ FIC. Este valor indica que la asociación de estos compuestos presenta un efecto de adición, en el caso de SARM clínico 178 la Σ FIC presenta un valor de 0.625 que corresponde a un efecto de adición. Con los datos obtenidos se observa que DFUCh-O5 en asociación a linezolid frente a cepas y aislamientos clínicos estudiados, producen un efecto de adición.

A continuación se presentan los resultados de la determinación de la actividad sinérgica de DFUCh-P4 y linezolid.

Tabla 28. Efecto de la asociación de DFUCh-P4 y linezolid.

Bacteria	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				FICA	FICB	Σ FIC	EFECTO*
	DFUCh-P4	linezolid	DFUCh-P4 en presencia de linezolid	linezolid en presencia de DFUCh-P4				
SASM ATCC® 29213	4	2	0.5	1	0.5	0.5	1	AD
SARM Clínico 178	8	1	2	0.5	0.25	0.5	0.75	AD
ESV ATCC® 29212	8	4	4	2	0.5	0.5	1	AD
ERV Clínico 828	4	2	2	1	0.5	0.5	1	AD

FICA Concentración inhibitoria fraccionaria de DFUCh-P4, FICB Concentración inhibitoria fraccionaria de linezolid, Σ FIC Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria.

* ≤ 0.5 : sinergia (S), $> 0.5 - \leq 1.0$: adición (AD), $> 1.0 - \leq 2.0$: indiferencia (I), > 2.0 : antagonismo (AT). (51)

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

La **Tabla 28** muestra que SASM ATCC® 29213, EFSV ATCC® 29212 y ERV clínico 828 presentan un valor de 1 para la Σ FIC este valor indica que la asociación de estos compuestos presenta un efecto de adición, en el caso de SARM clínico 178 la Σ FIC presenta un valor de 0.75, que corresponde a un efecto de adición. Esta asociación presenta una situación similar al caso anterior, la cual podría atacar diferentes blancos de la bacteria sin causar interferencia ni antagonismo entre DFUCh-P4 y linezolid; es más, se estaría disminuyendo la CIM de DFUCh-P4 y linezolid frente estas bacterias, disminuyendo la dosis, con lo que puede disminuir las RAM, mejorando la efectividad del tratamiento.

Los resultados de la determinación de la actividad sinérgica de DFUCh-O5 y vancomicina, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 29. Efecto de la asociación de DFUCh-O5 y vancomicina.

Bacteria	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				FICA	FICB	ΣFIC	EFECTO*
	DFUCh-O5	vancomicina	DFUCh-O5 en presencia de vancomicina	vancomicina en presencia de DFUCh-O5				
SASM ATCC® 29213	1	2	2	0.5	2	0.25	2.25	AT
SARM Clínico 178	2	2	2	0.250	1	0.125	1.125	I
ESV ATCC® 29212	2	1	2	0.25	1	0.25	1.25	I
ERV Clínico 828	4	2	4	2	1	1	2	I

FICA Concentración inhibitoria fraccionaria de DFUCh-O5, FICB Concentración inhibitoria fraccionaria de vancomicina, ΣFIC Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria.

* ≤ 0.5 : sinergia (S), $> 0.5 - \leq 1.0$: adición (AD), $> 1.0 - \leq 2.0$: indiferencia (I), > 2.0 : antagonismo (AT). (51)

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

En la **Tabla 29** se observa que SASM ATCC® 29213 presenta un valor de 2.25 para la ΣFIC , este valor indica que la asociación de estos compuestos presenta un efecto de antagonismo, esto sugiere que ambos fármacos interactúan negativamente en un mismo blanco farmacológico (70), lo que se contrapone con el mecanismo de acción propuesto para DFUCh-O5 frente al de vancomicina. Por otra parte, el antagonismo podría generarse por una interacción intermolecular entre los compuestos, si bien, se propone un mecanismo de acción para el compuesto diferente del mecanismo de acción de la vancomicina, esto demuestra que en alguna parte del mecanismo de acción de la vancomicina se contraponen estos compuestos, lo que podría explicar el antagonismo que se observa, además esto podría ser una aproximación para poder dilucidar el verdadero mecanismo de acción de DFUCh-O5.

En el caso de SARM clínico 178, EFSV ATCC® 29212 y ERV clínico 828 presentan valores de ΣFIC de 1.125, 1.25 y 2, respectivamente. Estos valores muestran un efecto de indiferencia. La asociación de DFUCh-O5 con vancomicina no da como resultado un mayor efecto, comparado con el efecto ejercido por los compuestos por separado.

La **Tabla 30** muestra los resultados de la determinación de la actividad sinérgica de DFUCh-P4 y vancomicina.

Tabla 30. Efecto de la asociación de DFUCh-P4 y vancomicina.

Bacteria	CIM (µg/mL)				FICA	FICB	Σ FIC	EFECTO*
	DFUCh-P4	vancomicina	DFUCh-P4 en presencia de vancomicina	vancomicina en presencia de DFUCh-P4				
SASM ATCC® 29213	2	0.5	2	0.25	1	0.5	1.5	I
SARM Clínico 178	4	1	4	0.5	1	0.5	1.5	I
ESV ATCC® 29212	4	1	2	0.5	1	0.5	1.5	I
ERV Clínico 828	4	2	4	2	1	1	2	I

FICA Concentración inhibitoria fraccionaria de DFUCh-P4, FICB Concentración inhibitoria fraccionaria de vancomicina, ΣFIC Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria.

*≤ 0.5: sinergia (S), > 0.5 - ≤ 1.0: adición (AD), > 1.0 – ≤ 2.0: indiferencia (I), > 2.0: antagonismo (AT). (51)

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

Con los datos (**Tabla 30**) se observa que la asociación de DFUCh-P4 y vancomicina frente a SASM ATCC® 29213, SARM clínico 178 y EFSV ATCC® 29212 presentan un valor de ΣFIC de 1.5 y para ERV clínico 828 presenta un valor de 2. Estos valores muestran que esta asociación presenta un efecto de indiferencia.

Por último al estudiar el efecto de asociación de los derivados DFUCh-O5 y DFUCh-P4, se esperaría un efecto antagónico debido a que los compuestos actúan en un mismo blanco según el mecanismo de acción propuesto.

A continuación se muestran los resultados de la determinación de sinergia de DFUCh-P4 y DFUCh-O5.

Tabla 31. Efecto de la asociación de DFUCh-P4 y DFUCh-O5.

Especie	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				FICA	FICB	Σ FIC	EFECTO*
	DFUCh-P4	DFUCh-O5	DFUCh-P4 en presencia de DFUCh-O5	DFUCh-O5 en presencia de DFUCh-P4				
SASM ATCC® 29213	4	1	2	0.5	05	0.5	1	AD
SARM Clínico 178	2	2	0.5	2	0.25	1	1.25	I
ESV ATCC® 29212	4	4	4	4	1	1	2	I
ERV Clínico 828	4	4	4	4	1	1	2	I

FICA Concentración inhibitoria fraccionaria de DFUCh-P4, FICB Concentración inhibitoria fraccionaria de DFUCh-O5, Σ FIC Sumatoria de índices de concentración fraccionaria inhibitoria.

* ≤ 0.5 : sinergia (S), $> 0.5 - \leq 1.0$: adición (AD), $> 1.0 - \leq 2.0$: indiferencia (I), > 2.0 : antagonismo (AT). (51)

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

En la **Tabla 31** se observa que SASM ATCC® 29213 presenta un valor de 1 para la Σ FIC, este valor muestra que la asociación de estos compuestos posee un efecto de adición. Por otro lado, en el caso de SARM clínico 178 la Σ 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 Σ 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, se debería observar un antagonismo cuando se usan ambos compuestos, el resultado podría ser una aproximación a dilucidar el verdadero mecanismo de acción, indicando que los compuestos tendrían diferentes mecanismos de acción entre ellos, y a su vez entre vancomicina y linezolid.

V. CONCLUSIÓN

1. Los derivados DFUCh-O5 y DFUCh-P4 presentan actividad antibacteriana sobre aislamientos clínicos SARM exhibiendo una CIM₅₀ de 2ug/mL tanto para DFUCh-O5 y DFUCh-P4, y una CIM₉₀ de 2ug/mL para DFUCh-O5 y 4ug/mL para DFUCh-P4. Los aislamientos clínicos de ERV presentaron una CIM₅₀ de 2 µg/mL para DFUCh-O5 y 4 µg/mL para DFUCh-P4, y una CIM₉₀ de 4 µg/mL para ambos compuestos.
2. Los derivados DFUCh-O5 y DFUCh-P4 presentan una actividad bactericida sobre aislamientos clínicos de SARM y ERV, determinada como CBM₅₀ y CBM₉₀ para DFUCh-O5 fue de 4 µg/mL, por otro lado la actividad bactericida de DFUCh-P4 sobre SARM fue de 2 y 4 µg/mL para CBM₅₀ y CBM₉₀ respectivamente. Para ERV la CBM₅₀ fue de 4 µg/mL y la CBM₉₀ de 8 µg/mL.
3. La presencia de albúmina a una concentración de 40 g/dL reduce la actividad antibacteriana entre 8 y 16 veces para DFUCh-O5 y DFUCh-P4, frente aislamientos clínicos de SARM y ERV.
4. La presencia de 10 % de suero humano reduce la actividad antibacteriana de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 entre 8 y 16 veces frente aislamientos clínicos de SARM y ERV.
5. El porcentaje de unión a albúmina para DFUCh-O5 y DFUCh-P4 fue de 84 % y de 97 %, respectivamente.
6. Los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 no generan un PAE significativo frente aislamientos clínicos de SARM y ERV.
7. Mediante la metodología PAMPA no fue posible determinar la capacidad para atravesar pasivamente una monocapa lipídica para los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4.
8. La coadministración de DFUCh-O5 y DFUCh-P4 con linezolid generan efectos aditivos. Tanto la asociación con vancomicina y la administración conjunta de ambos compuestos, no genera efectos antagónicos frente aislamientos clínicos de SARM y ERV.

VI PROYECCIONES

En base a los resultados de este trabajo se observa que los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4, son candidatos a convertirse en fármacos antibacterianos por lo que resulta fundamental realizar estudios de toxicidad sobre células humanas y animales, además, se debe evaluar la efectividad de los compuestos en modelos animales de infección, actualmente nuestro laboratorio está montando un modelo de infección sistémica sobre larvas de *Galleria mellonella* y estudiando el vehículo en el que se van administrar en el organismo.

Actualmente, el mayor desafío que pone en riesgo la vigencia de los nuevos antibacterianos luego de su introducción al mercado es la generación de resistencia, al respecto, es fundamental para su potencial desarrollo como fármacos estudiar si los compuestos DFUCh-O5 y DFUCh-P4 generarían resistencia a corto plazo, estudiando la capacidad de las bacterias de mutar en presencia de los compuestos, mediante la determinación del índice de mutaciones espontáneas y el ensayo de resistencia de pasajes en serie.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. H. J. Historia de la medicina: fonfo de cultura económica. 1989.
2. B. W. Historia de los antibióticos del hospital italiano de Buenos Aires. 2009:104 - 6.
3. Jawetz E MJ AE. Quimioterapia antimicrobiana. Microbiología médica1992;14:159 - 91.
4. Leonardo Sánchez Saldaña ES JPM, Patricia Lanchipa Yokota, Robert Zegarra del Carpio. Antibióticos sistémicos en dermatología. 2004.
5. JG JAGRJ. Una historia verdaderamente fascinante: 75 años del descubrimiento de los antibióticos. 2004;1.
6. (AETSA) AdedtsdA. dalbavancina para el tratamiento de infecciones bacterianas agudas de piel y partes blandas, eficacia y seguridad. 2015.
7. ME SdP. La sociedad chilena de infectología en la prevención de la resistencia bacteriana a antibacterianos. Revista chilena de infectología2002;19:222 - 5.
8. ML C. Changing patterns of infections disease. Nature2000:762 - 7.
9. C W. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug. 2000:775 - 81.
10. José Julián Lopez Gutiérrez EM. Estudio de utilización de antibióticos en el servicio de consulta externa de un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, Colombia. Química farmacéutica2008;37:224 - 40.
11. Wh O. Antimicrobial resistance, global report on suveillance. 2013.
12. organization Wh, editor. Antimicrobial resistance, global report on suveillance.
13. america Idso, editor. Bad Bugs, No Drugs, as antibiotic discovery stagnates2004.
14. Gambra M, Flores J, Ramírez K, Palma S, Zitko P, Valenzuela MT, et al. Incidencia y mortalidad de bacteriemia en un hospital clínico docente en Santiago de Chile. Revista médica de Chile2012;140:859-66.
15. Gambra M FJ, 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 Chile2012;140:859 - 66.
16. Boucher HW TG, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. bad drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. Clinical infections diseases2009;48:1 -12.
17. Lam IÁ. The evolution of an old pathogen called *Staphylococcus aureus*. 2012.
18. Sung-Hsi Huang Y-CC Y-CC, 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 hetetogeneous VISA among methicilin resistance *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibotory concentrations in Taiwan: A multicenter survillance study, 2012 - 2013. Journal of Microbiology, Inmunology and infections2015.
19. Sandra Ricón LD, 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. Biomedica2015;34:191 - 208.
20. Antonio Millan CB, 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 clínica2010;28:336 - 41.
21. Almirante CFyB. Infecciones relacionadas con el uso de los catéteres vasculares Enfermedades infecciosas y microbiología clínica2014:115 - 24.
22. (ISP) MdSP. 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.

23. Marcela Cifuentes FS, Helia Bello, Isabel Briceño, Mario Calvo y Jaime Labarca. Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Revista chilena de infectología*2012;31:123 - 30.
24. Vega F AP, 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;32:588 - 90.
25. Labarca J. Heteroresistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), susceptible or resistant? . *Revista chilena de infectología*2015:497 - 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. Gonzalez G. Treatment of the infections by *Enterococcus*. *Revista clínica española*2003:203 - 482.
29. JA M. Biofilms of *Enterococci*. *Journal medicine microbiology*2007:1581 - 8.
30. Rasmussen. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagnostic microbiology and infectious diseases* 2015.
31. idso A. Bad bugs, no drugs, as antibiotic discovery stagnates. 2004.
32. García M. Ceftatolina y ceftobriol, nuevas cefalosporinas. *Revista cubana de farmacia*2011;45:318 - 20.
33. Araos R GP, Chanqueo L, Labarca J. daptomicina: características farmacológicas y aportes en el tratamiento de infecciones por cóceas Gram positivas. *Revista chilena de infectología*2012;29:127 - 31.
34. HS S. Antibacterianos. *Revista chilena de infectología*2002;19:14 - 21.
35. FAD. Comunicado de la FDA sobre la seguridad de los medicamentos, la FDA advierte sobre la confusión en la dosis y errores en la medicación con el antibiótico avycaz (ceftazidima/ avibactam). 2015.
36. B RS. ceftazidime-avibactam: A novel cephalosporine/B-lactamase inhibitor combination for the treatment of resistant gram negative organisms. *clinical therapeutics*2016.
37. Campanini J. Síntesis, caracterización y exploración de la actividad antibacteriana de una serie de compuestos arilmercaptopirimidoinquinolinonas. 2013.
38. Schneider T. An oldie but a goodie cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *international Journal of medical microbiology*2010;19:300 - 161.
39. Losee L L, Aron J, Peoples, Amy L, Spoering, Ina Engels, BrianP, Conlon, Anna Mueller, *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 2015.
40. Rodrigo E MH, Robert K, Flamm, David J, Farrell y Ronald N. telavancin *in vitro* activity against a USA collection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, including resistant subsets. *Antimicrob agents chemother*2015.
41. cals I. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty fourth informational supplement. 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087. 2014.
42. Craig. GS: Antibiotics in laboratory medicine: Postantibiotic effect. 1996;4th ed.
43. institute Cals. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty fourth informational supplement. 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, pennsylvania 19087 USA2014.
44. S P. bactericidal activity and post antibiotics effect of clarithromycin and 14-hydroclarithromycin, alone and in combination, against *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial chemotherapy*1998;41:646 - 3.
45. Glenn A PM, and Peter C. Post antibiotics effect and post antibiotics sub MIC effect of quinupristin-dalfopristin against gram positive and gram negative organisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998;42:31.

46. José A GRR, Elías Sánchez, María Luisa Gómez, Luis Martínez, Carmen Rodríguez y Jordi Vila. Métodos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica 2001.
47. Linda Lane Lilley RLYRGdC. Farmacología en enfermería 1999.
48. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
49. Leon Shargel AB. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 2005.
50. Craig WA GS. Antibiotics in laboratory medicine: Postantibiotic effect. . 4th ed ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996.
51. Victor Lorian *ea*. Antibiotics in laboratory medicine. Philadelphia 889 2005.
52. CAF. Basic about antimicrobial 2005.
53. Reyes S DT, Prado J. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* productoras de shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. Revista médica de Chile 2004;132.
54. Matthew Park aLM. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. 2015.
55. Vives EA. Farmacología general de las drogas antibacterianas. 2003.
56. FODEM. Antibióticos. 2006.
57. Baño JR. Multiresistant bacteria, nosocomially or community acquired. 2004;22.
58. Lapenta G. Bacterias multirresistentes. IBC instituto de bioquímica clínica.
59. Silvia I AG. Control de infecciones epidemiológicas de *Enterococcus*. 2005.
60. Paola Bocanegra Ibariasa *ea*. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico: first detection of VanB phenotype VanA genotype. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, Elsevier 2015.
61. K P. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. 2009;15.
62. Porcel de Fernandez UR, Gaudio de Allori. bactericida de hipoclorito de sodio sobre *Staphylococcus cohnii* productor de biofilm en una fábrica. Acta bioquímica clínica latinoamericana 2013;47:693 - 700.
63. R. Taroco RV. Métodos de estudio de la susceptibilidad antibiótica. Temas de bacteriología y virología médica.
64. H. Alonso PB, *et al*. Medicina. 1996.
65. Oliveira CAFd. La experimentación en la enseñanza química. 2011.
66. M R. the protein binding of acetylsalicylic acid and salicylic acid. American association of clinical chemistry 1969.
67. Lipinski C DB. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Drugs discovery 2001:3 - 26.
68. Julio Benites EGJL, Mauricio Rojas, Leonel Rojo, María 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.
69. Rivas L M. Sinergismo fago antimicrobiano en *Pseudomonas aeruginosa*: a possible approach to combating *Pseudomonas aeruginosa*. Revista chilena de infectología 2014.
70. W L. Antagonismo microbiano en la terapia de las enfermedades infecciosas. Revista chilena de infectología 2013;30.

VII. ANEXOS

ANEXO A:

Centros de salud: Servicio de Salud Antofagasta, Servicio de Salud Coquimbo, Servicio de Salud Metropolitano Oriente, Servicio de Salud Metropolitano Occidente, hospital Dipreca, hospital clínico universidad de chile, hospital Barros Luco Trudeau, clínica Las Condes, Servicio de Salud del Maule, Servicio de Salud Talcahuano, Servicio de Salud Concepción, Servicio de Salud Ñuble, hospital regional de Temuco, Servicio de Salud Araucanía Sur.

ANEXO B:


DEPTO. ASUNTOS CIENTÍFICOS
Dra. JANEPSY DIAZ TITO

MEMORANDUM N°156/2014

Santiago, 05 de Septiembre del 2014

A : DIRECCION

**DE : DRA. JANEPSY DIAZ TITO
JEFA DEPARTAMENTO ASUNTOS CIENTÍFICOS**

MAT. : Solicita firma documento de Declaración de Responsabilidad y Confidencialidad para la entrega de cepas al tesista Javier Campanini Galaz

Mediante el presente se solicita firma documento de Declaración de Responsabilidad y Confidencialidad para la entrega de cepas a Javier Campanini Galaz, tesista de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Javier Campanini realizará su tesis para la obtención del grado de Doctor en Farmacología, titulada: "Actividad Antibacteriana y Evaluación Farmacodinamia de Derivados Arilmercaptoquinónicos Sobre *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. Multiresistentes", cuyo objetivo es evaluar el grupo de cepas solicitadas para establecer la CIM50 y CIM90 de un nuevo compuesto con propiedades antibacterianas. Para lograr su objetivo se solicitan 50 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes y 50 cepas de *Enterococcus* spp. (*faecium* y *faecalis*) vancomicina- resistente.

Se adjunta Documento de Declaración de Responsabilidad y Compromiso de Confidencialidad.

Sin otro particular, saluda atentamente,


DRA. JANEPSY DIAZ TITO
JEFA
JEFA
DEPARTAMENTO ASUNTOS CIENTÍFICOS

Memó N° 156 - 2014
c.c.
- Dirección
- Depto. Asuntos Científicos
- Subdepto. Estudios y FTESA
- Asesoría Jurídica
- ante Depto. Biomédica
- Puerto Alvarado Depto. Biomédica
- Archivo