

2020

Evaluación del efecto de reserpina, curcumina y sus mezclas con dos antibióticos comerciales sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

Brayan Gamez Castillo
Universidad de La Salle, Bogotá

Diego Joaquin Rugeles Martinez
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Gamez Castillo, B., & Rugeles Martinez, D. J. (2020). Evaluación del efecto de reserpina, curcumina y sus mezclas con dos antibióticos comerciales sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/70>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RESERPINA, CURCUMINA Y SUS MEZCLAS CON
DOS ANTIBIÓTICOS COMERCIALES SOBRE QUORUM SENSING DE *Pseudomonas
aeruginosa*.**

BRAYAN GAMEZ CASTILLO

DIEGO JOAQUIN RUGELES MARTINEZ

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2020



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RESERPINA, CURCUMINA Y SUS MEZCLAS CON
DOS ANTIBIÓTICOS COMERCIALES SOBRE QUORUM SENSING DE *Pseudomonas
aeruginosa*.**

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE BIOLOGO

TUTOR

DSc Patricia Hernández Rodríguez

CO TUTOR

DSc María Vanessa Gómez Ramírez

BOGOTÁ, D.C.

2020

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado

Bogotá D.C., febrero 2020

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RESERPINA, CURCUMINA Y SUS MEZCLAS
CON DOS ANTIBIÓTICOS COMERCIALES SOBRE QUORUM SENSING DE
Pseudomonas aeruginosa.**

DIEGO RUGELES¹, BRAYAN GAMEZ¹, VANESSA GÓMEZ¹, PATRICIA
HERNANDEZ-RODRÍGUEZ¹

¹*Programa de Biología. Departamento de Ciencias Básicas*

Universidad de la Salle. Cra. 2 #No 10-70, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria, aerobia, Gram negativa, móvil, que es patógena para humanos y para algunos animales. Está catalogada por la OMS como prioridad crítica por su alta resistencia a antibióticos y por su variedad de factores de virulencia que facilitan la infección de huéspedes principalmente inmunosuprimidos. Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* están controlados por su Quorum Sensing (QS), el cual es un sistema de señalización intracelular que controla la expresión de genes responsables de la densidad poblacional usando moléculas autoinductoras. El QS se regula mediante subsistemas específicos como lasL/lasR, rhIR/rhIL, PQS e IQS los cuales tienen asociados a cada uno de ellos diferentes mecanismos que les permite expresar los factores de virulencia que tengan asociados, entre otros, se encuentra la resistencia antimicrobiana que se deriva de la formación de biopelícula. Lo anterior ha llevado a buscar tratamientos alternativos eficaces frente a esta bacteria, por tal razón, se propone el uso de plantas o sus derivados; así como, las mezclas de estos con antibióticos debido a su potencial inhibitorio frente a los genes reguladores del QS. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue establecer el efecto de curcumina, reserpina y sus mezclas con dos antibióticos comerciales sobre el QS de *P. aeruginosa*. Como marco metodológico se utilizó la cepa ATCC (BAA-047) la cual es resistente a antibióticos, se determinó la MIC de los cuatro compuestos analizados y para evidenciar la expresión del gen *mvfR* se sometió la bacteria a $\frac{1}{4}$ de la MIC hasta que el control positivo alcanzó una absorbancia entre 0.6-0.8 a 600nm. Posteriormente se realizó la extracción, purificación y cuantificación del RNA de las bacterias sometidas a los compuestos individuales y las mezclas seleccionadas. Se realizó la RT-PCR de los RNAs amplificando el gen *mvfR* y se evaluaron de forma semicuantitativa los productos amplificados para cada tratamiento por medio de densitometría, como house-keeping se usó el gen *rpoD*. Posteriormente se evaluó el efecto en el crecimiento de las mejores mezclas realizando la curva de crecimiento por 24 horas y se evaluaron los factores de virulencia ramnolípidos y piocianinas sometidos a las mezclas escogidas. Como resultados se obtuvo que las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas fueron de 256ng/ μ L y 5ng/ μ L para azitromicina y gentamicina respectivamente. Para los compuestos naturales no fue posible obtener una MIC por lo que se utilizó una concentración estándar de 200ng/ μ L para la extracción de RNA. La expresión del gen *mvfR* varió significativamente siendo menor al utilizar gentamicina, curcumina y reserpina, en 24%, 26% y 25% respectivamente con respecto a las bacterias sin tratamiento, lo cual indica que estos compuestos tienen mejor inhibición del QS que la azitromicina la cual obtuvo una expresión del 42%. En cuanto a las mezclas se determinó que gentamicina-curcumina y gentamicina-reserpina tuvieron un efecto sinérgico en la inhibición del gen *mvfR* mostrando porcentajes de expresión de 15% y 13% respectivamente. Así mismo los porcentajes de producción de piocianinas y ramnolípidos presentaron los valores más bajos al usar la mezcla de reserpina-gentamicina con valores de 24.5% y 68% respectivamente. Con estos resultados se puede concluir que existe una sinergia entre compuestos naturales y antibióticos, específicamente entre curcumina-gentamicina y reserpina-gentamicina, lo que da lugar a desarrollar diferentes tipos de tratamientos alternativos para complementar, reemplazar o potenciar métodos convencionales que se usan actualmente contra *P. aeruginosa*.

PALABRAS CLAVE

Compuestos naturales, Expresión génica, Factores de virulencia, *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum sensing.

INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria, aerobia, Gram negativa, móvil, que es patógena para humanos y para algunos animales. Esta tiene la capacidad de inhibir ciertas funciones celulares al liberar lipopolisacáridos relacionados con la infección, lo que genera enfermedades tales como neumonía, shock séptico, infecciones en el tracto urinario, infecciones en el tracto gastrointestinal entre otras (1).

P.aeruginosa es considerado un patógeno resistente debido a la producción de factores de virulencia como sustancias poliméricas extracelulares (EPS), lipopolisacáridos, piocianinas, ramnolípidos, proteasas, lipasas, elastasas, ADN extracelular y Pili tipo IV (2). Estas condiciones han llevado a que la organización mundial de la salud (OMS) catalogue a *P. aeruginosa* como prioridad crítica para la búsqueda de tratamientos alternativos para prevenir y mitigar la infección.

Su patogenicidad está directamente relacionada con la densidad poblacional y esta permite que la bacteria pueda expresar los genes que necesita para propagar la infección; adicional a ello, está relacionada con la expresión de fenotipos de resistencia a antibióticos, formación de biopelículas y respuestas inmunológicas del hospedador. A esta expresión de genes basada en la densidad poblacional se le denomina quorum sensing (3).

Las bacterias que crecen en biopelícula tienen características diferentes a las plantónicas o libres pues son más resistentes a tratamientos con antibióticos debido a que es más difícil para el antibiótico penetrar la barrera física creada por el biofilm y llegar hasta la célula bacteriana (4). Adicionalmente, el biofilm crea un microambiente alterado que ayuda al

patógeno a evadir el sistema inmune del huésped y este ocurre en tres pasos: adhesión a la superficie y multiplicación bacteriana, formación de micro colonias y diferenciación en estructuras maduras y resistencia a antibióticos (5).

Estas diferencias entre las células plantónicas y las células asociadas en biofilms se da por el mecanismo de quorum sensing (QS) (6), que a su vez, es el mecanismo que regula los factores de virulencia (7).

El QS es un sistema sensorial de comunicación y señalización bacteriana que permite la activación, el control y la expresión de diferentes genes diana en respuesta a la densidad poblacional los cuales, a su vez, permiten activar factores de virulencia y de patogenicidad asociados a la bacteria. El QS de *P.aeruginosa* está regulado por cuatro sistemas ya caracterizados, (lasL/lasR rhIL/rhIR, PQS e IQS), los cuales manejan vías independientes de expresión génica (8).

Mediante el sistema lasL/lasR, se induce la expresión de genes asociados con múltiples factores de virulencia tales como formación de biopelículas, motilidad, y generación de exotoxinas que participan en la patogénesis de la bacteria, también este sistema está asociado con la bioluminiscencia de *P.aeruginosa* (9).

El sistema rhIL/rhIR es responsable de la expresión de ramnolípidos y de proteínas que ingresan en el citoplasma de las células del hospedero, finalmente el sistema PQS regula la formación de ramnolípidos y moléculas responsables de la formación del biofilm (10).

El sistema PQS es necesario para la virulencia completa de *P. aeruginosa*, el correcto funcionamiento de los factores de virulencia que son regulados por quorum sensing (QS) y

la síntesis de 4-hidroxi-2-alkilquinolinas (HAQ), incluida la señal de las quinolonas en el sistema (PQS) de *P. aeruginosa*. La contribución del sistema de PQS a la virulencia de *P.aeruginosa* se realiza a través del control transcripcional sobre genes que no están bajo la regulación de rhlL/rhlR además este sistema también regula positivamente un subconjunto de genes que dependen tanto de lasL/lasR como de rhlL/rhlR con el fin de potenciar la acción virulenta de *P.aeruginosa* (11).

El sistema IQS es uno de los últimos conocidos de QS; se ha reportado, que regula la formación de biopelículas y que se manifiesta en el hospedero infectado cuando los tejidos de este tienen deficiencia en fosfatos lo cual permite a la bacteria apoderarse del sistema central de las células que conforman el tejido afectado, adicionalmente se ha demostrado que el sistema IQS también está asociado con la expresión de los factores de virulencia ramnolípidos y piocianinas (12).

En la actualidad, ha surgido un interés en enfoques terapéuticos alternativos en donde los productos naturales, principalmente los fitoquímicos o sus derivados, han sido los más estudiados para poder entender y por ende abordar sus propiedades antimicrobianas (13). Estos fitoquímicos son menos tóxicos, tienen una alta diversidad de grupos químicos y especificidad bioquímica y, por lo tanto, poseen una ventaja sobre los antibióticos convencionales que en la actualidad progresivamente van perdiendo efectividad frente a los microorganismos (14).

Los alcaloides de origen vegetal son grupos estructuralmente diversos y sirven como fuentes principales de muchos medicamentos antibacterianos. Entre varios alcaloides naturales conocidos, se ha documentado que algunos tienen potencial antibacteriano frente a ciertos

patógenos (15). La reserpina, por ejemplo, es un indol-alcaloide que se encuentra principalmente en la planta con flores *Rauwolfia serpentina* y se ha reportado como un antidepresivo, antihipertensivo, antitumoral y antipalúdico (16). Además, algunos informes han documentado a la reserpina como inhibidor de la bomba de flujo y antibacteriano (Gibbons, 2004 & Negi et al., 2014).

Otro compuesto natural es la curcumina o también conocida como diferuloilmetano [1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] derivada del rizoma de la *Cúrcuma longa* (18), que ha mostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas y, por lo tanto, tiene un potencial frente a diabetes, alergias, artritis, Alzheimer y otras enfermedades crónicas. Estos efectos son mediados por la regulación de varios factores de transcripción, factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, proteínas cinasas y otras enzimas (19).

En cuanto a la actividad antibacteriana de la curcumina, la combinación de este compuesto con la terapia antimicrobiana puede ser útil para el tratamiento frente a la resistencia de *P. aeruginosa*. Se han realizado investigaciones previas sobre las actividades biológicas de la curcumina y reserpina evaluando estos productos naturales junto con diferentes antimicrobianos en los subsistemas de QS de *P.aeruginosa* lasL/lasR y rhlL/rhlR encontrando efectos inhibitorios sobre estos subsistemas y sobre los factores de virulencia que regulan (20). Sin embargo, los estudios del efecto inhibitorio que tienen estos compuestos naturales de manera individual y mezclados con antibióticos sobre el sistema PQS son limitados siendo necesario profundizar en este tipo de investigaciones y encontrar sinergias entre compuestos naturales y antimicrobianos que presenten potencial inhibitorio sobre los sistemas de QS y especialmente sobre el subsistema PQS debido a que es el regulador directo

del subsistema rhIL/rhIR el cual a su vez modula la producción de ramnolípidos y de manera conjunta con PQS, las piocianinas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es establecer la expresión del gen *mvfR* asociado con QS en *P. aeruginosa* frente al tratamiento con reserpina, curcumina, gentamicina, azitromicina y evaluar los factores de virulencia piocianinas y ramnolípidos.

MATERIALES Y METODOS

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa de *P. aeruginosa* utilizada para los ensayos de inhibición del QS fue la ATCC (BAA-047), mejor conocida como PAO1. La reactivación y conservación de la cepa fue hecha en el medio/agar Luria Bertani a 37°C y 200RPM para el medio líquido. La preservación de la cepa también se realizó en medio LB, junto con glicerol al 20%(V/V) a una temperatura de -70°C, los controles positivos de crecimiento se realizaron en medio LB junto con 0,5% V/V de Tween 80(21).

Reactivos

Las soluciones stock de gentamicina, azitromicina, reserpina (Sigma Aldrich) y curcumina (Merck), fueron elaboradas de acuerdo a los protocolos del CLSI (Cockerill, Wikler, Hardy et al., 2013). Las concentraciones Stock para la gentamicina y azitromicina fueron de 25mg/mL, mientras que para la curcumina y reserpina fueron de 12.5mg/mL. Estas dos últimas fueron preparadas en DMSO puro (Sigma Aldrich).

Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC)

Las MICs para los cuatro compuestos fueron determinadas utilizando el método de micro dilución especificado en los lineamientos del CLSI (22). Se realizaron diluciones seriadas por triplicado para azitromicina (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 y 2 ng/μL), gentamicina (64, 32, 16, 8, 5, 4, 2.5, 2, 1.25 y 0.25 ng/μL), curcumina y reserpina (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3 ng/μL); cada ensayo con un control de crecimiento positivo y negativo, junto con un control de DMSO. Los compuestos fueron diluidos en medio LB + Tween 80 0,5%(V/V) (21), y con DMSO al 4% para la curcumina y reserpina. Se utilizó un inóculo de 5×10^5 UFC/mL de PAO1; se dejó en incubación a 37°C por 24h y se midió la absorbancia de cada carril con el espectrofotómetro Multiscan SKY (Thermo Scientific™).

Mezclas entre compuestos

Las mezclas se determinaron de acuerdo con los resultados de la expresión del gen *mvfR* para cada uno de los tratamientos individuales. El criterio de selección para realizar las mezclas fue la mayor inhibición de cada compuesto sobre la expresión del gen mencionado y se realizaron 3 mezclas diferentes entre parejas de los compuestos escogidos.

Extracciones de RNA y síntesis de cDNA

Para la extracción de RNA, la bacteria fue sometida a concentraciones de $\frac{1}{4}$ de la MIC obtenida de cada uno de los compuestos y de las mezclas junto con un control positivo de crecimiento. La extracción del RNA inicio cuando la absorbancia del control positivo estaba dentro de los rangos de 0,6 – 0,8 unidades de absorbancia, valores en los cuales la bacteria se encuentra en fase de crecimiento. La extracción y purificación de los RNAs se realizó utilizando el kit RNeasy mini kit (Qiagen). Posteriormente se eliminó el ADN utilizando DNase (Promega ®) según las instrucciones del fabricante. La determinación de la concentración y

pureza del RNA se efectuó en el equipo NanoDrop, a 260nm y 260/280 nm respectivamente, además se verificó la ausencia de DNA usando el RNA como plantilla en una reacción de PCR.

La síntesis del cDNA se realizó utilizando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega ®). Esta fue realizada con 1 µg de RNA purificado, 1X de buffer RT (100mM Tris-HCl (pH 9.0), 500mM KCl, 1% Triton® X-100), 1mM de DNTPs, 200u de enzima RT, 1µM de primers aleatorios según las condiciones del fabricante, con un volumen final de reacción de 25µL. La reacción fue incubada a 37°C por 1h, 95°C por 5 min y a 4°C por 10 min.

PCR y semi-cuantificación

Con el cDNA sintetizado se realizó una PCR convencional con los primers que se reportan en la literatura los cuales corresponden al gen *rpoD* con secuencias Forward y Reverse, GGGCGAAGAAGGAAATGGTC y CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA respectivamente que presentan un tamaño de amplificación de 178 bp (23) y por otra parte, para el gen *mvfR* con secuencias Forward y Reverse AACCTGGAAATCGACCTGTG y TGAAATCGTCGAGCAGTACG respectivamente que presentan un tamaño de amplificación de 238 bp (24)

El cDNA sintetizado(2µL) fue mezclado con 1X de master mix (Promega), 1µM de primers y agua libre de DNasas para un volumen final de 25µL. Las condiciones de amplificación que se utilizaron en el termociclador fueron: 94°C por cinco minutos en la etapa de

desnaturalización, posteriormente en la etapa de hibridación se realizaron 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por un minuto con una extensión final a 72°C por un minuto.

Para evidenciar la expresión del gen *myfR* de forma semicuantitativa se realizó un análisis por densitometría para lo cual se realizó un gel de agarosa al 2%(P/V), mezclado con 0.5mg/mL de bromuro de etidio en buffer TBE (Tris-borate-EDTA), donde se sembraron los productos amplificados para cada tratamiento, se realizó la electroforesis a 125mV por 30 minutos y el gel fue analizado en el fotodocumentador iBright™, donde se realizaron los análisis de densidad de cada banda obteniendo así los valores de expresión del gen para cada tratamiento por triplicado.

Determinación de piocianinas y ramnolípidos

La medición de ramnolípidos se determinó siguiendo el método del orcinol descrito por Banerjee et al. (2017), para esto se tomaron 500µL de bacteria suspendida en medio líquido luego de 24 horas de crecimiento (de cada una de las mezclas con mejores resultados), junto con 1,5mL de dietil éter se centrifugó a 10000 rpm. Posteriormente las fracciones agrupadas de éter se evaporaron a 37°C, y los remanentes se disolvieron en 100µL de agua y 900µL de una solución con orcinol al 0,18%(P/V) y ácido sulfúrico al 53%(P/V); las muestras se llevaron a 80°C por 30 minutos en baño serológico; posteriormente, se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente y se midió la absorbancia de la muestra a 421nm.

La cuantificación de piocianinas se realizó según lo descrito por Essar et al. (1990) en este caso, se trataron 5mL de bacteria suspendida en medio líquido luego de 24h de crecimiento (de cada una de las mezclas con mejores resultados), con 3mL de cloroformo, y 1mL a 0,2M

de HCl, se centrifugo a 10000 RPM y 300 μ L de sobrenadante de color rosado se extrajo para leer su absorbancia a 520nm.

Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) (Tuckey) con el programa RStudio para determinar si existen diferencias significativas en la expresión del gen *mvfR* frente al tratamiento con los cuatro compuestos estudiados. Igualmente, se determinaron las diferencias existentes en cuanto a la producción de ramnolípidos y piocianinas cuando se sometió la bacteria a las mezclas escogidas.

RESULTADOS

Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria para los antibióticos evaluados (azitromicina y gentamicina) fue de 256ng/ μ L y 5ng/ μ L respectivamente. La Figura 1 (A y B), muestra que, a partir de estas concentraciones los valores de absorbancia son menores a 0.05 para ambos antibióticos. Para la curcumina y reserpina no fue posible llegar a una concentración mínima inhibitoria dado que, a todas las concentraciones analizadas, los valores de absorbancia no fueron iguales o inferiores a 0.05 como se evidencia en la Figura 1 (C y D). No se evaluaron concentraciones más altas de estos dos productos naturales, debido a su baja solubilidad en medios acuosos, por tal razón se utilizó una concentración estándar (200ng/ μ L), en donde se evidenció solubilidad total para continuar con los procesos de extracción de RNA y posterior evaluación de la expresión del gen *mvfR*.

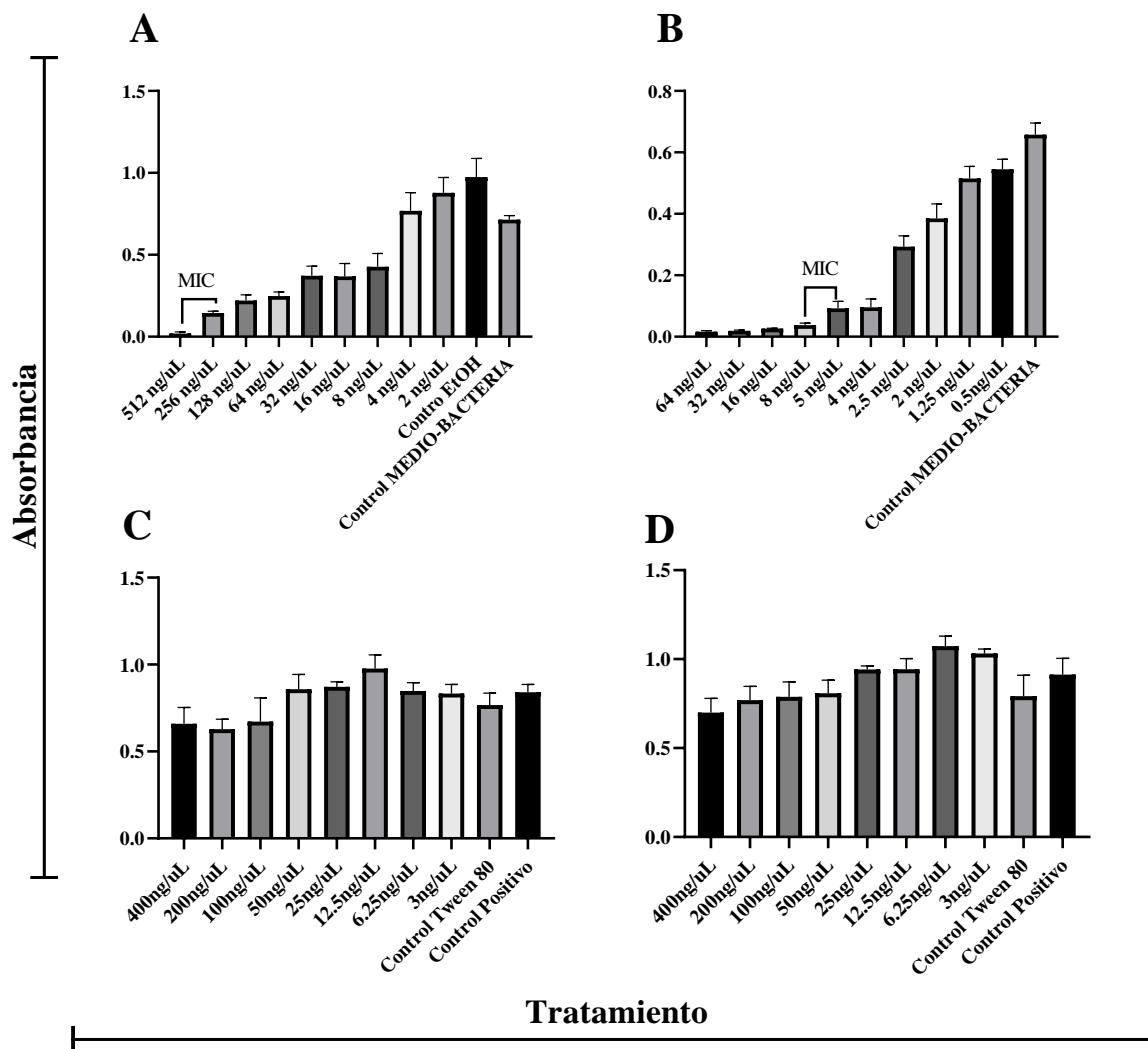


Figura 1 Concentraciones mínimas inhibitorias calculadas para *P. aeruginosa* BAA-047. La MIC fue determinada como la concentración a la cual la bacteria creció a una concentración de 0.05A cuando fue sometida a cada uno de los tratamientos A. Azitromicina, B Gentamicina, C. Curcumina, D. Reserpina. Cada uno de los controles y tratamientos fueron evaluados en condiciones controladas. Se realizaron replicas por triplicado para cada uno de los ensayos. Los datos se representaron por medio de grafica de barras con desviación estándar. El valor de la MIC se representa en la gráfica en los dos valores donde se encuentra la concentración de 0.05A. Siendo el valor de la derecha el escogido como MIC.

Expresión del gen *mvfR* frente a los compuestos individuales

La expresión obtenida del gen *mvfR* varió significativamente en todos los tratamientos como se evidencia en la Figura 2 y 3, donde todos tuvieron una expresión inferior al 45% con

respecto al control siendo de 42%, 24%, 26%, y 25% para azitromicina, gentamicina, curcumina y reserpina respectivamente. Al comparar los tratamientos analizados se evidenció que gentamicina, curcumina y reserpina difirieren significativamente en la expresión obtenida para la azitromicina que fue del 42%. La expresión del gen *house-keeping* no presentó diferencias con respecto al control y a cada uno de los tratamientos realizados, indicando que los tratamientos afectaron específicamente la expresión del gen *mvfR*.

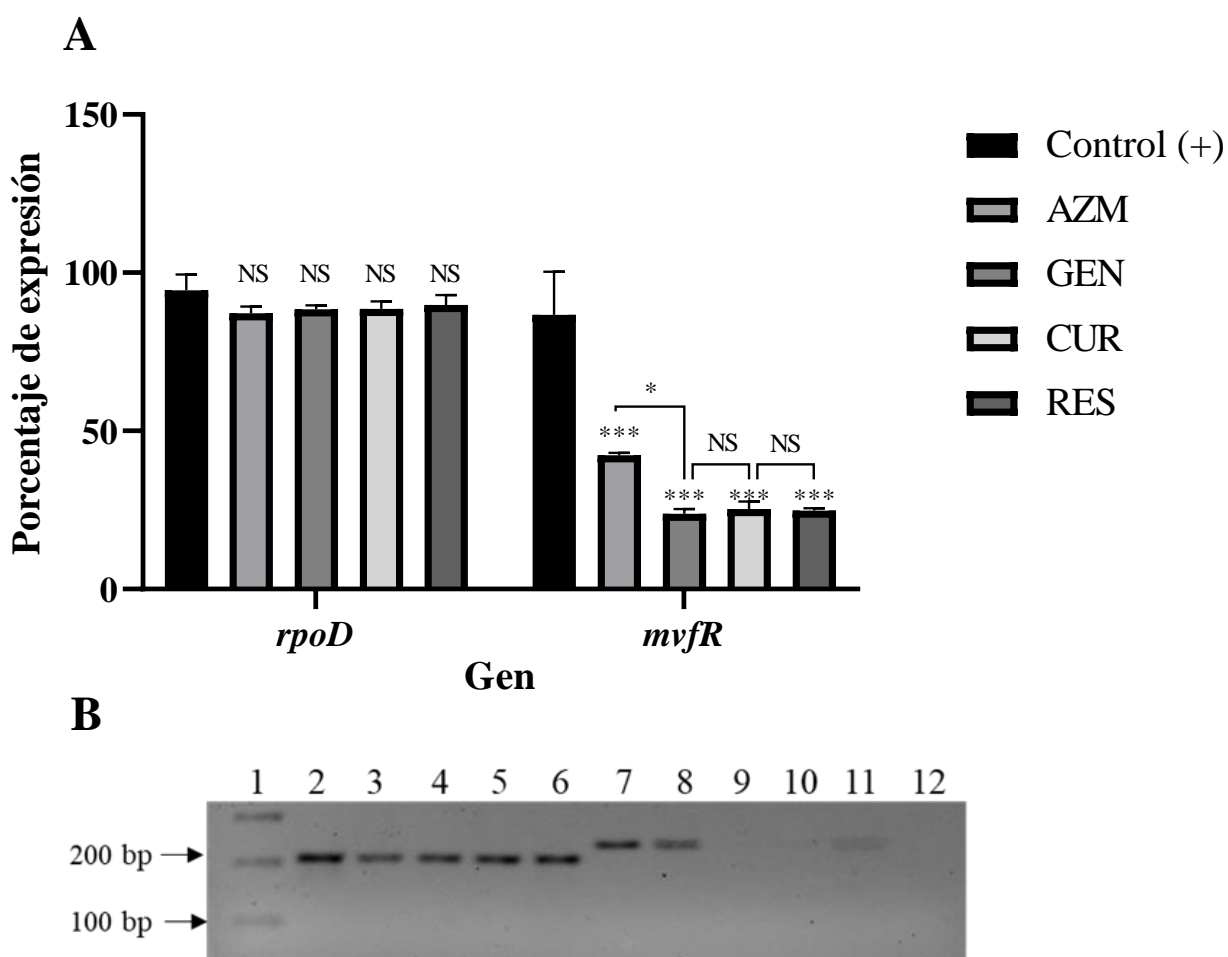


Figura 2 A. Expresión genética de los genes *rpoD* y *mvfR* de *P.aeruginosa* BAA-047 frente a azitromicina (AZM), gentamicina (GEN), curcumina (CUR) y reserpina (RES). El porcentaje de expresión de cada uno de los genes fue determinado mediante la relación entre la expresión del control positivo de crecimiento y la expresión de cada tratamiento evaluado. Cada dato de expresión relativa utilizada fue obtenido por triplicado mediante el análisis semicuantitativo en un fotodocumentador. Los datos se representaron por medio de graficas de barras con desviación estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante el análisis estadístico ANOVA simple y test de tuckey. Siendo, NS= $P>0.05$, $*$ = $P\leq 0.05$, $***$ = $P\leq 0.001$ B. Electroforesis de los productos de PCR de *rpoD* y *mvfR* usando cDNA como plantilla. En los carriles se observan los

tratamientos con azitromicina, gentamicina, curcumina y reserpina: 1: M 100bp, 2: Gen rpoD control positivo. 3: Gen rpoD 1/4 MIC azitromicina. 4: Gen rpoD ¼ MIC gentamicina. 5: Gen rpoD 200µg/mL curcumina. 6: Gen rpoD 200µg/mL reserpina. 7: Gen mvfR control positivo. 8: Gen mvfR ¼ MIC azitromicina. 9: Gen mvfR ¼ MIC gentamicina. 10: Gen mvfR 200µg/mL Curcumina. 11: Gen mvfR 200µg/mL Reserpina. 12: Blanco de reacción.

Efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* con las mezclas

El efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* en cada una de las mezclas realizadas se muestra en la Figura 4, donde se evidencia que la mezcla que menor efecto presentó en el crecimiento es la de curcumina-reserpina, dado que la tendencia de la curva de crecimiento es muy similar a la del control. Las mezclas de curcumina-gentamicina y reserpina-gentamicina, tuvieron una tendencia similar, reportando valores de absorbancia mucho más bajos que los del control positivo, mostrando así un efecto inhibitorio. Sin embargo, en la Figura 1 se muestra que la curcumina y reserpina de forma individual no mostraron inhibición a alta concentración por lo que la inhibición presentada en la curva de crecimiento se debe principalmente a la acción de la gentamicina.

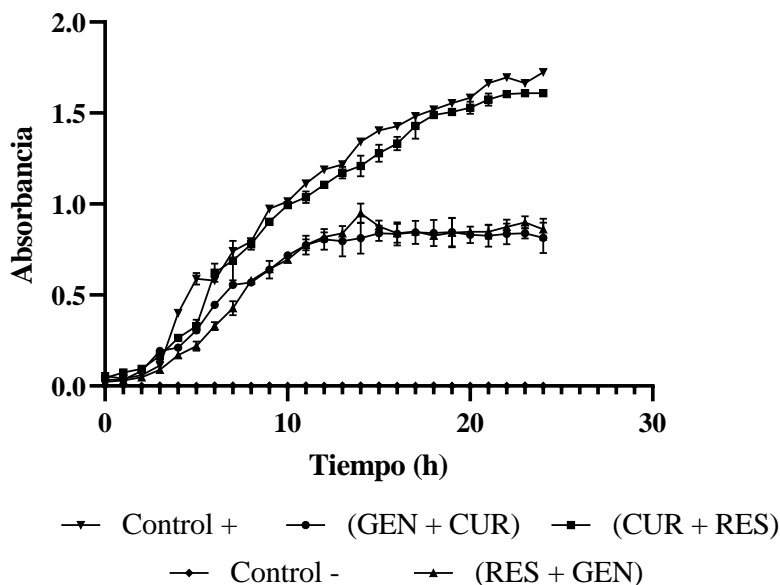


Figura 3 Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* BAA-047, frente a las mezclas de gentamicina-curcumina (GEN + CUR), curcumina-reserpina (CUR + RES) y reserpina-gentamicina (RES+GEN). La grafica modela el comportamiento en términos de absorbancia que tuvo la bacteria bajo los efectos de los tratamientos evaluados comparando el tiempo de crecimiento como variable continua independiente y la concentración como variable continua dependiente.

Expresión del gen *mvfR* frente a las mezclas

En la Figura 4 A se evidencian los porcentajes de expresión del gen de referencia (*rpoD*) y del gen *mvfR* frente a cada una de las mezclas entre los compuestos naturales y el antibiótico gentamicina; se observa que para el gen de referencia *rpoD* no hubo un cambio estadísticamente significativo en la expresión con ninguna de las mezclas. Para el gen *mvfR* la mezcla que mejor disminución de la expresión presentó fue la reserpina con la gentamicina seguida por la curcumina con la gentamicina y, por último, la mezcla que no presentó una inhibición significativa con respecto a las otras dos fue la de la curcumina con la reserpina.

En la Figura 4B se muestran los productos de PCR *rpoD* y *mvfR* donde se evidenció de forma semicuantitativa la expresión del gen de referencia *rpoD* y el gen *mvfR* frente a cada uno de los tratamientos que se definieron como mezclas entre curcumina, reserpina y gentamicina, de manera que, puede observarse que en el gen *rpoD* la expresión no cambia con ninguno de los tratamientos mientras que para el gen *mvfR*, se evidencia que en los carriles 8 y 9 no se observan bandas, es decir la expresión de este gen es muy baja con la mezcla entre curcumina y gentamicina y con la mezcla entre reserpina y gentamicina pero en el carril 7 se observa una banda que corresponde a la mezcla entre curcumina y reserpina la cual disminuye la expresión del gen *mvfR*.

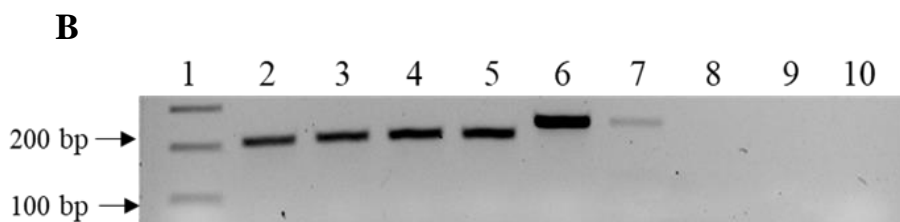
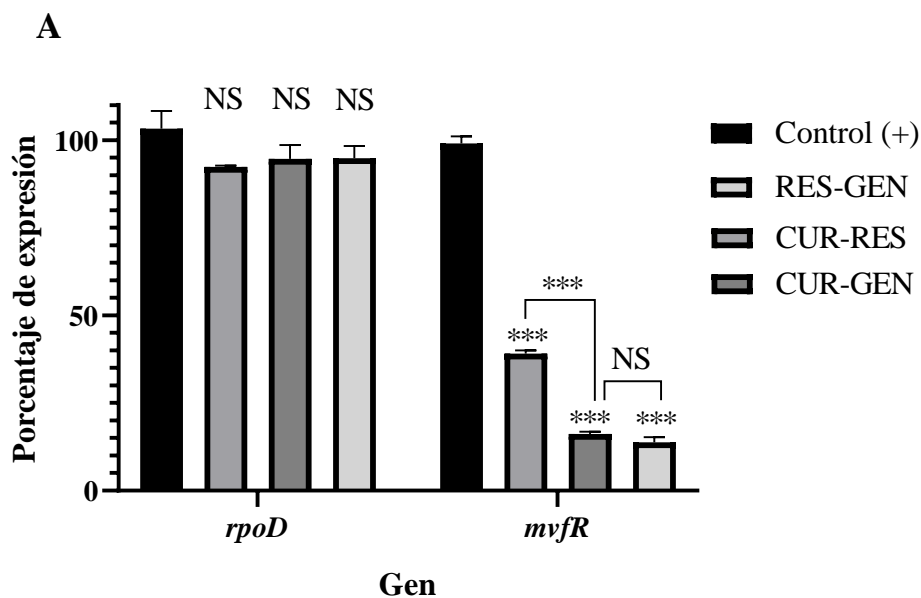


Figura 4 A. Expresión genética de los genes *rpoD* y *mvfR* de *P.aeruginosa* BAA-047 frente a las mezclas de reserpina y gentamicina (RES-GEN), curcumina y reserpina (CUR-RES) y, curcumina y gentamicina (CUR-GEN). El porcentaje de expresión de cada uno de los genes fue determinado mediante la relación entre la expresión del control positivo de crecimiento y la expresión de cada tratamiento evaluado. Cada dato de expresión relativa utilizada fue obtenido por triplicado mediante el análisis semicuantitativo en un fotodocumentador. Los datos se representaron por medio de graficas de barras con desviación estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante el análisis estadístico ANOVA simple y test de tuckey. Siendo, NS= $P>0.05$ *= $P\leq 0.05$, ***= $P\leq 0.001$ B. Electroforesis de los productos de PCR de *rpoD* y *mvfR* usando cDNA como plantilla. En los Carriles se observan los tratamientos con las mezclas gentamicina-curcumina (GC), gentamicina-reserpina (GR) y curcumina-reserpina (RC): 1: M 100bp, 2: Gen *rpoD* control positivo. 3: Gen *RpoD* (CR). 4: Gen *rpoD* (GC). 5: Gen *rpoD* (CR). 6: Gen *mvfR* control positivo. 7: Gen *mvfR* (CR). 8: Gen *mvfR* (GC). 9: Gen *mvfR* (GR). 10: blanco de reacción.

Producción de piocianinas y ramnolípidos frente a las mezclas

La producción de piocianinas fue significativamente diferente en cada uno de los tratamientos con las mezclas a las que fue sometida la bacteria tal y como se muestra en la Figura 5 la mezcla de gentamicina-reserpina fue la que menor porcentaje de producción tuvo (24,5%) con respecto al control, y significativamente más bajo comparada con las otras dos

mezclas evaluadas, siendo esta la que mejor inhibió este factor de virulencia. En cuanto a los ramnolípidos, se evidenció que el tratamiento con curcumina y reserpina no presentó diferencias significativas con respecto al control, indicando que esta mezcla no inhibió este factor de virulencia en la bacteria, por otro lado, con la mezcla de curcumina-gentamicina se presentó un porcentaje de producción significativamente diferente con respecto al control (92%); finalmente la mezcla que tuvo una diferencia significativa en el porcentaje de producción de ramnolípidos fue la de reserpina-gentamicina (68%).

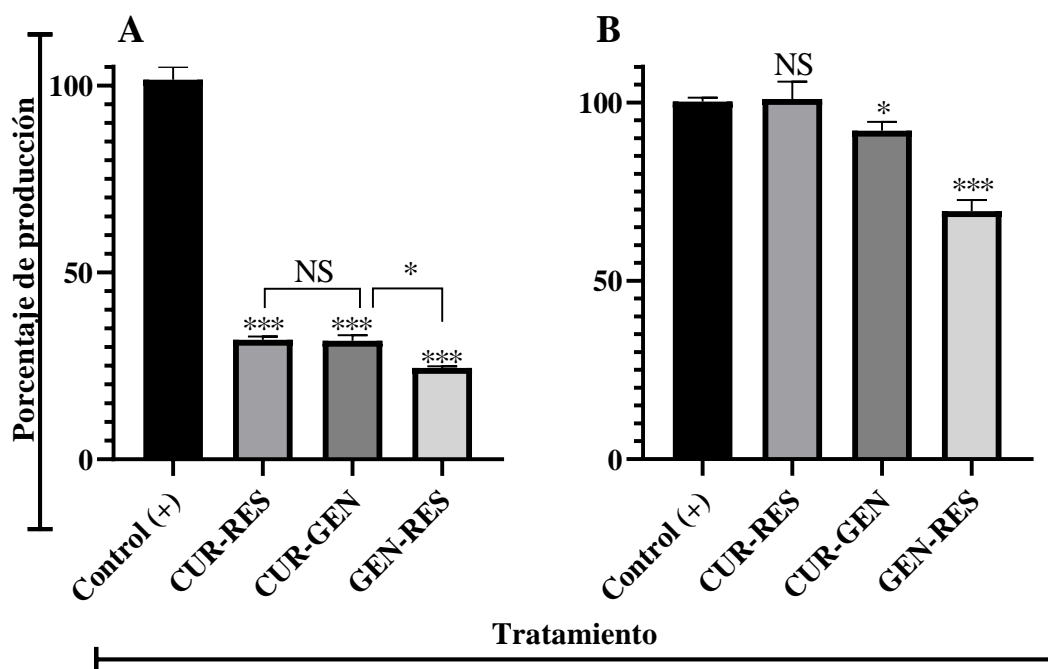


Figura 5 Producción de piocianinas y ramnolípidos en *P. aeruginosa* BAA-047 frente a las mezclas utilizadas; A. Piocianinas, B. ramnolípidos. El porcentaje de producción de cada uno de los factores de virulencia fue determinado mediante la relación entre la producción del control positivo de crecimiento y la producción de cada tratamiento evaluado. Cada dato de producción fue obtenido por triplicado mediante análisis espectrofotométricos. Los datos se representaron por medio de graficas de barras con desviación estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas mediante el análisis estadístico ANOVA simple y test de tuckey. Siendo, NS= $P > 0.05$, *= $P \leq 0.05$, ***= $P \leq 0.001$. NS (Diferencia no significativa), *(Diferencia significativa), ***(Diferencia muy significativa)

DISCUSIÓN

Las concentraciones mínimas inhibitorias que fueron obtenidas para gentamicina y azitromicina concuerdan con los valores y tendencias reportadas por Bahari et al. (2017) quienes evaluaron las MICs para estos dos antibióticos siendo de 5 ng/ μ L y 256 ng/ μ L respectivamente.

Los valores de la MIC para curcumina y reserpina en el presente estudio difieren con los encontrados por Bahari et al. (2017), Kali et al. (2016) y Parai et al. (2018) los cuales reportaron concentraciones mínimas inhibitorias para *P.aeruginosa* y bacterias gram negativas en general en los rangos de 110ng/ μ L a 150ng/ μ L para curcumina y de 800 ng/ μ L para reserpina, mientras que en este estudio no fue posible llegar a una concentración mínima inhibitoria en ninguno de los dos compuestos; lo anterior se debe principalmente a que en los reportes previos se utilizan altas concentraciones de solventes orgánicos como DMSO para la dilución completa, evitando así la precipitación de los compuestos (Bahari et al. 2017; Kali et al. 2016 y Parai et al. 2018), mientras que en el presente estudio se utilizaron concentraciones de DMSO bajas (4% o menos), dado que, según lo reportado por Ansel et al. (1969), usar concentraciones mayores al 4% inhiben en más del 66% el crecimiento bacteriano lo cual no permite reconocer si la acción antimicrobiana se da por el compuesto natural o por el DMSO. Adicionalmente, al usar bajas concentraciones de DMSO los compuestos insolubles en medios acuosos pueden presentar precipitación, por tal razón en este estudio se adicionó Tween 80 (0.5%), el cual actúa como surfactante y evita la precipitación de estos compuestos a bajas concentraciones de solventes orgánicos.

En este estudio los cambios reportados en la expresión genética del gen *myfR* son similares a los publicados por Bahari et al. (2017) para los tratamientos con azitromicina, gentamicina

y curcumina que tuvieron una variación significativa en la expresión en los genes *lasR/lasL* y *rhlL/rhlR* asociados al Quorum Sensing frente al control. Igualmente, Parai et al. (2018) encontraron un cambio muy significativo en la expresión del gen *mvfR* al utilizar la reserpina como tratamiento del Quorum Sensing en *P. aeruginosa*. Estos resultados en los cambios de la expresión del gen *mvfR* también están asociados con la inhibición de los factores de virulencia (Piocianinas y ramnolípidos) los cuales también fueron determinados por Parai et al. (2018)

Con las mezclas realizadas entre la curcumina-gentamicina y la reserpina-gentamicina, se logró determinar un efecto sinérgico en cuanto a la inhibición del gen *mvfR*, el cual resultó en un porcentaje de expresión menor comparado con los resultados de los compuestos individuales. Estos resultados son similares a los publicados por Bahari et al. (2017) donde encontraron sinergias para la inhibición de la expresión del sistema *lasI/lasR* y *rhlI/rhlL* utilizado curcumina y gentamicina. La mezcla entre curcumina-reserpina presentó porcentajes de expresión mayores que sus compuestos individuales mostrando así un efecto antagónico sobre la expresión del gen *mvfR*, esto concuerda con lo reportado por Caesar & Cech. (2019), quienes señalan que las mezclas entre diferentes compuestos naturales pueden resultar en efectos antagónicos sobre microorganismos.

En cuanto a los factores de virulencia analizados, se evidencio que los porcentajes de producción de piocianinas y ramnolípidos de las mezclas entre gentamicina-reserpina y Gentamicina-curcumina fueron más bajos en comparación con el control de crecimiento y con la mezcla entre curcumina-reserpina, de manera que esta mezcla no es la ideal para inhibir el Quorum Sensing ni tampoco los factores de virulencia ramnolípidos y piocianinas de *P. aeruginosa* ya que el efecto de la mezcla es antagonico.

Según el estudio realizado por Lee & Zhang (2014) se evidencia que el sistema *mvfR* está relacionado con los factores de virulencia de piocianinas, cianidinas, lectinas y también es regulador del sistema de *rhlR/rhlL* el cual regula la producción de ramnolípidos y la formación de biopelículas, por lo que la inhibición del sistema PQS probablemente influye evitando la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia asociados a la infección que genera *P. aeruginosa*.

Los cambios en la expresión del gen *mvfR* que se evidenciaron cuando se sometió a los tratamientos con reserpina, se justifican desde el campo de la bioinformática, más específicamente desde el Docking molecular estrategia utilizada por Parai et al. (2018) que les permitió reportar que molecularmente, el ligando nativo de la reserpina compite por el sitio activo de la proteína codificada por el gen *mvfR* y cuando la reserpina se acopla al sitio activo, esta inhibe la expresión de los factores de virulencia correspondientes a la motilidad, la formación de biopelícula, ramnolípidos, piocianinas, entre otros, lo cual evidencia que el efecto inhibitorio del gen *mvfR* se debe a la interacción molecular entre la reserpina y el sitio activo de la proteína asociada al gen y no por otros factores externos a los tratamientos.

Por último, en diversos estudios enfocados en el Quorum Sensing se ha demostrado que este es un sistema jerárquico, tal y como lo menciona Lee & Zhang (2014) donde muestra que el sistema *lasR/lasL*, es el modulador de todos los subsistemas Quorum Sensing en *P.aeruginosa*, por lo que si se ve afectada la expresión de los reguladores transcripcionales *lasR/lasL*, también se verán afectados otros sistemas como el PQS, y por ende todos los factores de virulencia asociados a *P.aeruginosa*, tal y como se evidenció en este estudio donde los cambios en la expresión fueron muy significativos con respecto a los controles utilizados.

CONCLUSIONES

Reserpina, curcumina y gentamicina presentaron estadísticamente un efecto inhibitor similar sobre el gen regulador del Quorum Sensing (*mvfR*) mientras que la azitromicina estadísticamente presentó un efecto inhibitorio menor que los demás compuestos lo cual indica que este antibiótico tiene un potencial inhibitorio menor que los compuestos naturales evaluados en este estudio y el antibiótico gentamicina.

Mezclas entre los compuestos naturales y el antibiótico gentamicina potencian la inhibición sobre el gen *mvfR* y sus factores de virulencia evidenciando un efecto sinérgico como el que presento la mezcla entre la reserpina-gentamicina y la curcumina-gentamicina; por el contrario, las mezclas entre los compuestos naturales, curcumina y reserpina presentaron un efecto antagónico que inhibe de menor forma el gen *mvfR* y sus factores de virulencia en comparación con los mismos compuestos de forma individual.

Con los resultados obtenidos en este estudio junto con posteriores investigaciones y desarrollos, sería posible contar con tratamientos y terapias que incluyan mezclas entre reserpina y curcumina con la gentamicina para potenciar o complementar métodos convencionales que se usan actualmente frente a infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa*.

BIBLIOGRAFIA

1. Bédard E, Prévost M, Déziel E. Pseudomonas aeruginosa in premise plumbing of large buildings. Microbiologyopen. 2016;5(6):937–56.
2. Wagner VE, Li LL, Isabella VM, Iglewski BH. Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in Pseudomonas aeruginosa. Anal Bioanal Chem.

2007;387(2):469–79.

3. Feng L, Xiang Q, Ai Q, Wang Z, Zhang Y, Lu Q. Effects of Quorum Sensing Systems on Regulatory T Cells in Catheter-Related *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection Rat Models. *Mediators Inflamm*. 2016;2016.
4. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1995;49(1):711–45. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
5. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322–32.
6. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* [Internet]. 2001;413(6858):860–4. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11677611&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/35101627>
7. Borges A, Sousa P, Gaspar A, Vilar S, Borges F, Simões M. Furvina inhibits the 3-oxo-C12-HSL-based quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* and QS-dependent phenotypes. *Biofouling*. 2017;33(2):156–68.
8. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2014;6(1):26–41.
9. Thorn RMS, Nelson SM, Greenman J. Use of a bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* strain within an in vitro microbiological system, as a model of wound infection, to assess the antimicrobial efficacy of wound dressings by monitoring light

- production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3217–24.
10. Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunol Lett* [Internet]. 2017;190(December 2016):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>
 11. Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, et al. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: Multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting IasRI, rhIRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol.* 2005;55(4):998–1014.
 12. Li S, Chen S, Fan J, Cao Z, Ouyang W, Tong N, et al. Anti-biofilm effect of novel thiazole acid analogs against *Pseudomonas aeruginosa* through IQS pathways. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018;145(2018):64–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.076>
 13. Abreu AC, McBain AJ, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep.* 2012;29(9):1007–21.
 14. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(3):206–20.
 15. Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep.* 2004;21(2):263–77.
 16. Reeta K, Brijesh R, Anita R, Sonal B. *Rauvolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: Phytochemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects. *Int J Pharm Sci Rev Res.*

2013;23(2):348–55.

17. Negi J, Bisht V, Bhandari A, Bisht D, Singh P, Singh N. Quantification of reserpine content and antibacterial activity of *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz. *African J Microbiol Res.* 2014;8(2):162–6.
18. Naz RK. Curcumin a novel non-steroidal contraceptive with antimicrobial properties. *Front Biosci.* 2016;8(1):113–28.
19. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One.* 2015;10(3):1–15.
20. Bahari S, Zeighami H, Mirshahabi H, Roudashti S, Haghi F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;10:21–8.
21. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol.* 2001;45(3):201–8.
22. Cockerill F, Wikler M, Hardy D, Et.al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (M100-S23-2013) [Internet]. Vol. 49, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. 1–35 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055835>
23. Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification

studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol.* 2003;52(5):403–8.

24. Parai D, Banerjee M, Dey P, Chakraborty A, Islam E, Mukherjee SK. Effect of reserpine on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing mediated virulence factors and biofilm formation. *J Bioadhesion Biofilm Res J* [Internet]. 2018;ISSN homep:892–7014. Available from:
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>
[://www.tandfonline.com/loi/gbif20/doi.org/10.1080/08927014.2018.1437910](http://www.tandfonline.com/loi/gbif20/doi.org/10.1080/08927014.2018.1437910)
[tps://doi.org/10.1080/08927014.2018.1437910](https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1437910)
25. Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2019;36(6):869–88. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1039/C9NP00011A>

ANEXOS

ANEXO 1.

Tablas de absorbancia para MIC

Tabla 1 Absorbancia para la determinación de la MIC - Azitromicina

Concentración	512 ng/uL	256 ng/uL	128 ng/uL	64 ng/uL	32 ng/uL	16 ng/uL	8 ng/uL	4 ng/uL	2 ng/uL	1ng/uL	Control +	Blanco
A	0.0158	0.1537	0.2156	0.2477	0.4164	0.4339	0.4141	0.8690	0.8752	0.9021	0.7028	-0.001433
B	0.0127	0.1307	0.2579	0.2736	0.3934	0.3899	0.5135	0.7875	0.7854	0.9167	0.6968	0.0006667
C	0.03007	0.1473	0.1890	0.2246	0.3049	0.2794	0.3537	0.6481	0.9727	1.105	0.7434	-0.004233

Tabla 2 Absorbancia para la determinación de la MIC - Gentamicina

Concentración	G 64 ng/uL	G 32 ng/uL	G 16 ng/uL	G 8 ng/uL	G 5 ng/uL	G 4 ng/uL	G 2.5 ng/uL	G 2 ng/uL	G 1.25 ng/uL	G 1 ng/uL	Control +	Blanco
A	0.01377	0.01857	0.02437	0.03447	0.08587	0.1261	0.3329	0.4375	0.4860	0.5742	0.6983	-0.003233
B	0.01447	0.02207	0.02697	0.03407	0.1176	0.08627	0.2649	0.3459	0.4987	0.5097	0.6523	-0.003033
C	0.02017	0.01617	0.02727	0.04507	0.07337	0.07437	0.2816	0.3722	0.5597	0.5510	0.6217	-0.005433

Tabla 3 Absorbancias para la determinación de la MIC - Curcumina

Concentración	400ng/uL	200ng/uL	1000ng/uL	50ng/uL	25ng/uL	12.5ng/uL	6.25ng/uL	3ng/uL	Control Tween 80	Control Positivo	Blanco
A	0.5526	0.5704	0.5295	0.8954	0.8896	0.9335	0.8848	0.7810	0.8458	0.7948	0.001167
B	0.7295	0.6850	0.6893	0.9175	0.8871	1.068	0.8650	0.8870	0.7240	0.8824	0.008367
C	0.6964	0.6297	0.7986	0.7616	0.8400	0.9300	0.7940	0.8310	0.7325	0.8462	-0.0007333

Tabla 4 Absorbancia para la determinación de la MIC - Reserpina

Concentración	400ng/uL	200ng/uL	1000ng/uL	50ng/uL	25ng/uL	12.5ng/uL	6.25ng/uL	3ng/uL	Control Tween 80	Control Positivo	Blanco
A	0.6890	0.6878	0.8774	0.8889	0.9635	0.8747	1.135	1.052	0.8758	0.9857	0.001267
B	0.7845	0.8414	0.7745	0.7889	0.9247	0.9654	1.059	1.004	0.6578	0.9425	0.003248
C	0.6258	0.7789	0.7121	0.7458	0.9357	0.9888	1.027	1.039	0.8428	0.8123	0.0635000

ANEXO 2.

Fotografías completas geles de electroforesis

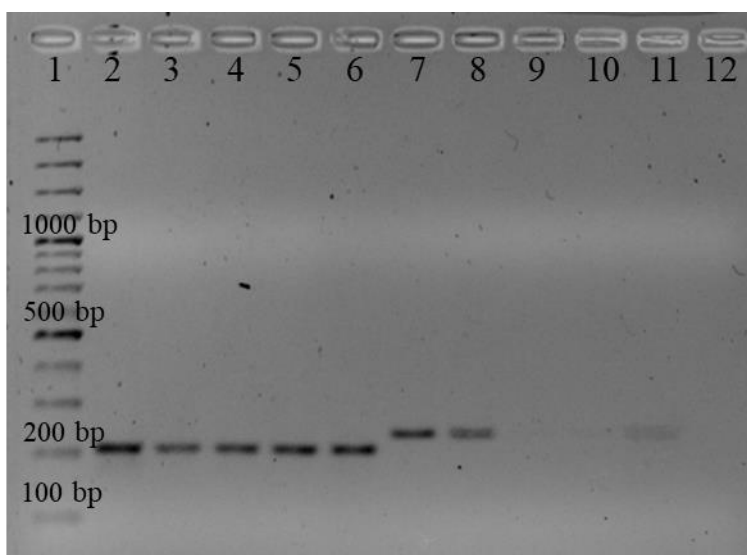


Figura 6 Electroforesis de los productos de PCR de *rpoD* y *mvfR* usando cDNA como plantilla. En los carriles se observan los tratamientos con azitromicina, gentamicina, curcumina y reserpina: 1: M 100bp, 2: Gen *rpoD* control positivo. 3: Gen *rpoD* 1/4 MIC azitromicina. 4: Gen *rpoD* ¼ MIC gentamicina. 5: Gen *rpoD* 200µg/mL curcumina. 6: Gen *rpoD* 200µg/mL reserpina. 7: Gen *mvfR* control positivo. 8: Gen *mvfR* ¼ MIC azitromicina. 9: Gen *mvfR* ¼ MIC gentamicina. 10: Gen *mvfR* 200µg/mL Curcumina. 11: Gen *mvfR* 200µg/mL Reserpina. 12: Blanco de reacción

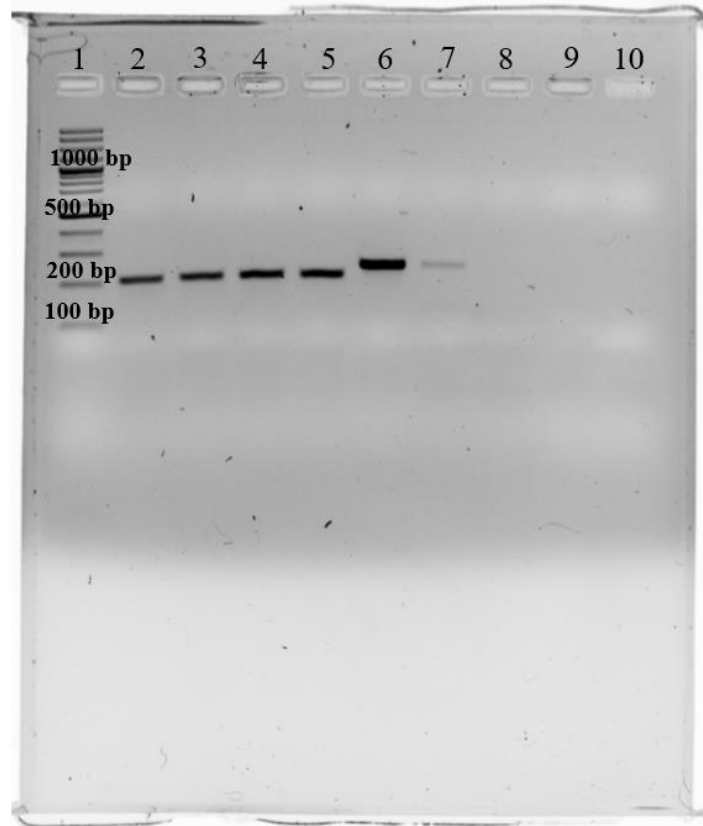


Figura 7 Electroforesis de los productos de PCR de *rpoD* y *mvfR* usando cDNA como plantilla. En los Carriles se observan los tratamientos con las mezclas gentamicina-curcumina (GC), gentamicina-reserpina (GR) y curcumina-reserpina (RC): 1: M 100bp, 2: Gen *rpoD* control positivo. 3: Gen *RpoD* (CR). 4: Gen *rpoD* (GC). 5: Gen *rpoD* (CR). 6: Gen *mvfR* control positivo. 7: Gen *mvfR* (CR). 8: Gen *mvfR* (GC). 9: Gen *mvfR* (GR). 10: blanco de reacción.

ANEXO 3

Reportes foto documentador

Revisar documentación adjunta en pdf.

ANEXO 4

Valores de absorbancia curvas de crecimiento

Tabla 5 Valores de absorbancia de la curva de crecimiento de *P. aeruginosa*

Tiempo (h)	(GEN + CUR)		(CUR + RES)		(RES + GEN)		Control +		Control -	
0	0.038	0.03	0.042	0.046	0.015	0.029	0.062	0.046	0.001	0.002
1	0.038	0.03	0.07	0.079	0.025	0.035	0.042	0.04	0.001	0.003
2	0.08	0.085	0.098	0.09	0.057	0.039	0.071	0.047	0.002	0.001
3	0.196	0.19	0.146	0.187	0.098	0.079	0.107	0.118	0.002	0.003
4	0.222	0.201	0.258	0.269	0.157	0.18	0.397	0.405	0.001	0.003
5	0.299	0.314	0.355	0.305	0.237	0.202	0.611	0.567	0.001	0.002
6	0.446	0.444	0.659	0.587	0.346	0.314	0.567	0.593	0.002	0.003
7	0.564	0.547	0.765	0.612	0.456	0.4	0.75	0.731	0.001	0.003
8	0.581	0.558	0.801	0.758	0.571	0.587	0.792	0.797	0.002	0.001
9	0.604	0.673	0.914	0.89	0.637	0.649	0.979	0.97	0.002	0.003
10	0.726	0.709	1.005	0.985	0.702	0.688	1.009	1.018	0.001	0.002
11	0.81	0.737	1.06	1.015	0.753	0.797	1.108	1.116	0.002	0.003
12	0.846	0.766	1.114	1.097	0.801	0.837	1.189	1.189	0.001	0.002
13	0.855	0.737	1.195	1.149	0.825	0.852	1.209	1.227	0.002	0.003
14	0.873	0.753	1.249	1.168	0.912	0.987	1.343	1.343	0.002	0.003
15	0.868	0.81	1.313	1.246	0.855	0.901	1.408	1.4	0.001	0.003
16	0.88	0.791	1.358	1.306	0.801	0.876	1.432	1.423	0.002	0.001
17	0.89	0.8	1.479	1.379	0.845	0.854	1.473	1.491	0.001	0.002
18	0.893	0.79	1.502	1.478	0.837	0.816	1.527	1.512	0.003	0.001
19	0.902	0.79	1.514	1.498	0.899	0.785	1.543	1.564	0.002	0.001
20	0.863	0.799	1.552	1.505	0.841	0.855	1.587	1.581	0.001	0.001
21	0.868	0.784	1.599	1.551	0.82	0.875	1.655	1.672	0.002	0.003
22	0.877	0.796	1.613	1.594	0.902	0.846	1.694	1.699	0.001	0.002
23	0.859	0.819	1.603	1.615	0.875	0.922	1.655	1.674	0.002	0.004

24	0.875	0.755	1.615	1.605	0.82	0.902	1.718	1.73	0.001	0.002
----	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	------	-------	-------

ANEXO 5

Valores de absorbancia por triplicado para los factores de virulencia Ramnolípidos y

Piocianinas

Tabla 6 Valores de absorbancia por triplicado para ramnolípidos

	Ramnolípidos				
	(GEN + CUR)	(CUR + RES)	(RES + GEN)	Control +	Control -
Replica 1	1.9827	2.4831	1.6670	2.3417	0.002
Replica 2	1.9284	2.3152	1.6323	2.3419	0.003
Replica 3	2.0889	2.4045	1.7932	2.3835	0.002

Tabla 7 Valores de absorbancia por triplicado para piocianinas

	Piocianinas				
	(GEN + CUR)	(CUR + RES)	(RES + GEN)	Control +	Control -
Replica 1	0.0915	0.0953	0.0757	0.3040	0.003
Replica 2	0.0965	0.0994	0.0739	0.3016	0.004
Replica 3	0.1050	0.1008	0.0762	0.3181	0.002