



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C**

**COMBINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS PARA
INHIBIR LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Escherichia
coli* UROPATÓGENA EN SUPERFICIES DE SILICONA**

Por:

Ariadna Thalía Bernal Mercado

TESIS APROBADA POR LA


COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la M.C. Ariadna Thalía Bernal Mercado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



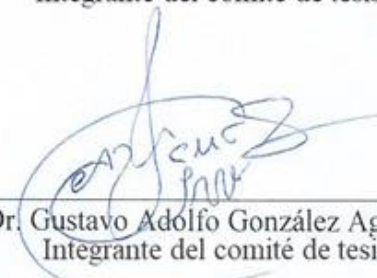
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Director de tesis



Dra. María Auxiliadora Islas Oşuna
Integrante del comité de tesis



Dra. Verónica Mata Haro
Integrante del comité de tesis



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Integrante del comité de tesis



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Combinación de Compuestos Fenólicos para Inhibir la Formación de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena en Superficies de Silicona” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Ariadna Thalía Bernal Mercado, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme formar parte de esta institución y por todos los servicios e instalaciones prestadas.

Al proyecto CB-2013-01-222591 “Caracterización y evolución de carbohidratos y metabolitos señal en biopelículas de bacterias patógenas expuestas a antimicrobianos de origen vegetal” financiado por el fondo de ciencia básica del CONACYT.

A la Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) y a todos sus investigadores, técnicos y alumnos que de alguna u otra manera me ayudaron con sus comentarios en seminarios y facilitándome equipos y materiales para realizar este proyecto de investigación.

Al Departamento de Docencia y Posgrado por todos sus servicios y apoyos otorgados. Así como a todos los docentes que ayudaron en mi formación de Doctor en Ciencias.

Un agradecimiento especial al Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala quien además de ser un excelente investigador científico, tiene una gran calidad humana. Le agradezco enormemente otorgarme su confianza y apoyo incondicional tanto académico como personal para la realización de este proyecto de investigación. Así mismo, por darme la oportunidad de pertenecer a este grupo, exigirme a mí misma para cumplir mis metas y enseñarme a ser un investigador en todos los ámbitos. Gracias infinitas por tanto y espero algún día llegar a ser un poco como usted.

A mi comité de tesis conformado por Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, Dra. Verónica Mata Haro, Dr. Alonso Alexis López Zavala y Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar. Les agradezco todos sus comentarios, sugerencias y atenciones brindadas para mejorar este proyecto de investigación.

A las Doctoras Filomena Nazzaro y Florinda Fratiani por aceptarme en su laboratorio para realizar una estancia de investigación en Avelino, Italia.

A la M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza gracias por toda su ayuda y por siempre estar cuando más la necesitamos con sus consejos y ánimos; definitivamente no lo hubiera logrado sin su apoyo.

Al M.C. Reynaldo Cruz Valenzuela por todo su apoyo y sus consejos brindados durante este tiempo.

A los integrantes del Laboratorio de Tecnologías Emergentes: Melissa, Melvin, Julián, Pancho, Luis, Kechu, Valeria, Aimara, Toño, Paty, y Karen, un enorme agradecimiento por toda su ayuda académica, por estar presente en los mejores y peores momentos y por hacer más agradables mis días durante estos 4 años. Gracias por su amistad.

A la Q.B. Mónica Villegas y Q.B María del Carmen Granados (Pame) por todo su apoyo técnico brindado y préstamo de equipos y reactivos.

A Mely, Lis, Ana y Stephanie por todo su apoyo y amistad durante estos años.

DEDICATORIA

A Dios por colmarme de bendiciones

A mis padres, Ariadna y Fernando, por todo su amor y apoyo incondicional; por enseñarme que la pasión y trabajo es la clave del éxito

A David por tanto amor, por acompañarme en las buenas y malas de este proceso y por enseñarme a no rendirme tan fácil

A Fer y Karen por estar siempre conmigo

A Julián por motivarme, apoyarme y recordarme que tengo muchas habilidades

CONTENIDO

| | |
|---|--------------------------------------|
| APROBACIÓN | ¡Error! Marcador no definido. |
| DECLARACIÓN INSTITUCIONAL | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| DEDICATORIA | 6 |
| CONTENIDO | 7 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE CUADROS | 12 |
| RESUMEN | 13 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 15 |
| 2. ANTECEDENTES | 19 |
| 2.1 Infecciones Urinarias Asociadas a Catéteres son un Problema de Salud Pública | 19 |
| 2.2 <i>Escherichia coli</i> Uropatógena es el Principal Causante de Infecciones Urinarias Asociadas a Catéteres..... | 21 |
| 2.3 La Formación de Biopelícula de <i>Escherichia coli</i> Uropatógena como Barrera a los Tratamientos Antibióticos..... | 25 |
| 2.4 Tratamientos Emergentes contra las Infecciones Urinarias | 31 |
| 2.5 Los Compuestos Fenólicos como Agentes Efectivos para el Control de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena..... | 35 |
| 2.6 La Combinación de Compuestos Fenólicos Aumenta su Efectividad Antibacteriana | 38 |
| 3. HIPÓTESIS | 42 |
| 4. OBJETIVOS | 43 |
| 4.1 Objetivo General | 43 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 43 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 44 |
| 5.1 Efecto Antibacteriano de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina. | 44 |
| 5.1.1 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Compuestos Fenólicos sobre Células Planctónicas de <i>E. coli</i> Uropatógena..... | 44 |
| 5.1.2 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de la Combinación de Compuestos Fenólicos sobre Células Planctónicas de <i>E. coli</i> Uropatógena | 45 |
| 5.2. Efecto de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina sobre la Erradicación de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena de los Catéteres de Silicona | 46 |
| 5.2.1 Determinación de la Concentración Mínima de los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación para Erradicar Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena de los Catéteres de Silicona | 46 |

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| 5.2.2 Cambios en la Permeabilidad de la Membrana de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuesta a los Compuestos Fenólicos Individuales y Combinados..... | 46 |
| 5.2.3 Evaluación de la Interacción de Compuestos Fenólicos y su Combinación con un Modelo de Membrana | 47 |
| 5.2.4 Análisis Estadístico | 49 |
| 5.3. Efecto de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina sobre la Motilidad y Adhesión de <i>Escherichia coli</i> Uropatógena..... | 49 |
| 5.3.1 Evaluación de la Motilidad de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuesta a los Compuestos Fenólicos de Manera Individual y en Combinación | 49 |
| 5.3.2 Determinación de la Carga Superficial de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuesta a Compuestos Fenólicos de Manera Individual y en Combinación..... | 50 |
| 5.3.3 Determinación de la Energía Superficial de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuesta a Compuestos Fenólicos de Manera individual y en Combinación..... | 51 |
| 5.3.4 Evaluación sobre la Fimbria Curli de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuesta a los Compuestos Fenólicos de Manera Individual y en Combinación..... | 52 |
| 5.3.5 Análisis Estadístico | 52 |
| 5.4. Efecto de la Combinación de Catequina, Ácido Protocateico y Ácido Vanílico sobre la Formación de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena en Catéteres de Silicona..... | 53 |
| 5.4.1 Determinación de las Concentraciones Mínimas de Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación para Inhibir la Formación de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena..... | 53 |
| 5.4.2 Evaluación del Efecto de los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación sobre la Formación de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena en Catéteres de Silicona | 54 |
| 5.4.3 Análisis por Microscopía Electrónica Invertida de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuestas a los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación | 55 |
| 5.4.4 Cuantificación de Sustancias Poliméricas Extracelulares Secretadas por <i>E. coli</i> uropatógena expuestas a los Compuestos Fenólicos Individual y en Combinación Durante su Adhesión a Catéteres de Silicona | 55 |
| 5.4.5 Cuantificación de Moléculas Señal Autoinductoras 2 de <i>E. coli</i> Uropatógena Expuesta a Compuestos Fenólicos Individual y en Combinación | 56 |
| 5.4.6 Análisis Estadístico | 57 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 58 |
| 6.1. Efecto Antibacteriano de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina. | 58 |

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 6.2. Efecto de los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación para Erradicar Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena..... | 62 |
| 6.3. Efecto de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina sobre la Motilidad y Adhesión de <i>E. coli</i> Uropatógena. | 71 |
| 6.4. Efecto de la Combinación de Catequina, Ácido Protocateico y Ácido Vanílico sobre la Formación de Biopelículas de <i>E. coli</i> Uropatógena en Catéteres de Silicona. | 77 |
| CONCLUSIONES | 92 |
| RECOMENDACIONES | 93 |
| REFERENCIAS | 94 |

LISTA DE FIGURAS

| Figuras | Páginas |
|---|---------|
| 1. Estructura molecular del polímero de silicona..... | 21 |
| 2. Representación del proceso de adhesión e invasión de <i>Escherichia coli</i> uropatógena en presencia de catéteres | 24 |
| 3. Esquema de la formación de biopelículas bacterianas en superficies abióticas | 28 |
| 4. Estructuras de a) ácido vanílico b) ácido protocateico c) catequina | 26 |
| 5. Viabilidad de <i>E. coli</i> uropatógena en biopelículas pre-formadas expuestas durante 1 h a ácido protocateico, ácido vanílico, catequina y nitrofurantóina. Diferentes literales indican diferencias entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. * Valor por debajo de los límites de detección (1.3 Log UFC/cm^2)..... | 34 |
| 6. Efecto del ácido protocateico (PA), ácido vanílico (VA) y catequina (Cat) y su combinación (1.62 mM (AP) + 0.74 mM (AV) + 0.05 mM (Cat)) sobre la permeabilidad de la membrana de <i>E. coli</i> uropatógena. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Diferentes letras significan diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) | 63 |
| 7. Isotermas de presión superficial por área molecular registrado para las monocapas con subfases conteniendo agua pura con y sin compuestos fenólicos de manera individual y en combinación. PA = ácido protocateico, VA = ácido vanílico, Cat = catequina ... | 65 |
| 8. Módulo de compresibilidad (Cs^{-1}) contra presión superficial registrado para las monocapas con subfases conteniendo agua pura con y sin compuestos fenólicos de manera individual y en combinación. PA = ácido protocateico, VA = ácido vanílico, Cat = catequina..... | 66 |
| 9. Isotermas de absorción para las monocapas con subfases conteniendo agua pura con y sin compuestos fenólicos de manera individual y en combinación. PA = ácido protocateico, VA = ácido vanílico, Cat = catequina | 68 |
| 10. Motilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i> de <i>E. coli</i> uropatógena expuesta a compuestos fenólicos de manera individual y su combinación a 37°C durante 24 h. Valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$)..... | 72 |
| 11. Adhesión de <i>E. coli</i> uropatógena en catéteres de silicona por 24 h a 37°C. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. El inóculo inicial agregado al sistema fue de 3 Log UFC/mL | 78 |

12. Efecto de A) Ácido protocateico, B) Ácido vanílico, C) Catequina y D) Nitrofurantoína en la densidad celular de biopelículas de *E. coli* uropatógena adheridas a catéteres de silicona (Log UFC/cm²) y células planctónicas (Log CFU/mL) por 24 h a 37°C. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Diferentes letras indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). *Valores menores del nivel de detección (1.3 Log UFC/cm²)80
13. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de compuestos fenólicos de manera individual y en combinación ((1.62 mM (AP) + 0.74 mM (AV) + 0.05 mM (Cat)) sobre la densidad celular de *E. coli* uropatógena durante la formación de biopelículas en superficies de silicona incubadas a 37°C durante 24 h82
14. Imágenes de microscopía óptica de biopelículas de *E. coli* uropatógena sin tratar (A) y expuestas a la combinación (1.62 mM (AP) + 0.74 mM (AV) + 0.05 mM (Cat)) (B), ácido protocateico (6.5 mM) (C), ácido vanílico (6 mM) (D) y catequina (7 mM) (E) en superficies de poliestireno incubadas a 37°C durante 2 y 24 h. Las biopelículas se tiñeron con cristal violeta y se observó una morfología con un aumento de 63x en un microscopio Axio-Vert (Carl Zeiss).....83
15. Contenido de sustancias poliméricas extracelulares en biopelículas de *E. coli* uropatógena expuestas al ácido protocateico (PA), ácido vanílico (VA), catequina (Cat) y su combinación (1.62 mM (PA), 0.74 mM (VA) y 0.05 mM (Cat)) a 37°C durante 24 h. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Diferentes letras minúsculas significan una diferencia significativa en el contenido de carbohidratos y diferentes letras mayúsculas significan una diferencia significativa en el contenido de proteínas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).....84
16. Inducción de bioluminiscencia de *V. harveyi* 170 por *E. coli* uropatógena expuesta y no a los compuestos fenólicos individuales y en combinación por 24 h a 37 °C. AP= ácido protocateico, AV= ácido vanílico, Cat= catequina.....86
17. Inhibición de formación de biopelículas de *Escherichia coli* uropatógena en superficies de silicona por la combinación de catequina, ácido vanílico y ácido protocateico.....91

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | Páginas |
|--|----------------|
| 1. Principales factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> uropatógena..... | 23 |
| 2. Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida de agentes antibacterianos contra células planctónicas de <i>E. coli</i> uropatógena incubada por 24 h a 37°C | 58 |
| 3. Efecto de la combinación de compuestos fenólicos contra células planctónicas de <i>E. coli</i> uropatógena incubada por 24 h a 37°C..... | 59 |
| 4. Combinación de compuestos fenólicos que erradican biopelículas de <i>E. coli</i> uropatógena pre-formadas en superficies de silicona por 24 h a 37°C..... | 63 |
| 5. Efecto de los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación sobre la carga superficial y energía superficial de <i>E. coli</i> uropatógena..... | 74 |
| 6. Efecto de compuestos fenólicos en la producción de fimbria curli de <i>E. coli</i> uropatógena..... | 75 |
| 7. Efecto de la combinación de compuestos de fenólicos en células planctónicas y biopelículas de <i>E. coli</i> uropatógena en superficies de silicona (24 h a 37°C) | 81 |

RESUMEN

Las infecciones urinarias asociadas a catéteres son de las infecciones nosocomiales más comunes causadas principalmente por *Escherichia coli* uropatógena debido a su capacidad para formar biopelículas en catéteres. La formación de biopelículas hace que la infección sea recurrente y resistente frente a antibióticos. Por lo que se ha sugerido inhibir la formación de biopelículas desde las etapas iniciales. Algunos compuestos fenólicos son efectivos contra biopelículas; sin embargo, su modo de acción no es específico y pueden afectar diferentes puntos de la biopelícula. En este sentido, la combinación de compuestos fenólicos puede presentar un efecto sinérgico. El objetivo fue evaluar la combinación de catequina, ácido protocateico y ácido vanílico sobre el crecimiento planctónico, erradicación de biopelículas, adhesión y formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en superficies de silicona. El ácido protocateico (12.98 mM), ácido vanílico (11.89 mM) y catequina (13.78 mM) inhibieron células planctónicas; mientras que la combinación de 1.62, 0.74 y 0.05 mM, respectivamente, mostró efecto sinérgico. Los compuestos fenólicos individuales y en combinación lograron permear y hacer más fluida la membrana celular. Por su parte, el ácido protocateico (25.95 mM), y el ácido vanílico (23.78 mM) fueron efectivos para erradicar biopelículas de *E. coli* uropatógena en silicona; mientras que la combinación de 3.2, 2.97 y 1.72 mM, respectivamente mostró efecto sinérgico. La motilidad bacteriana se redujo hasta un 35% y la carga superficial, la hidrofobicidad y la fimbria curli fueron afectadas por los compuestos fenólicos, siendo la combinación la más efectiva. Los compuestos fenólicos individuales y en combinación redujeron del 20 al 40% el contenido de sustancias poliméricas extracelulares. Los compuestos fenólicos redujeron la comunicación celular de *E. coli* uropatógena del 10 al 25%, siendo la combinación la más efectiva. El ácido protocateico (11.03 mM) y el ácido vanílico (7.13 mM) inhibieron la formación de biopelículas sin afectar la viabilidad celular; mientras que la combinación de 1.62, 0.74 y 0.05 mM, respectivamente, mostró un efecto sinérgico. Mediante microscopia se observó la reducción de la estructura de la biopelícula a través del tiempo. Este estudio demostró el potencial de combinar compuestos fenólicos para reducir las dosis efectivas individuales y aumentar su efecto anti-biopelícula a través de la inhibición de motilidad, adhesión, comunicación celular y contenido de sustancias poliméricas extracelulares de *E. coli* uropatógena.

Palabras clave: sinergismo, compuestos fenólicos, biopelículas bacterianas.

ABSTRACT

Catheter associated urinary tract infections are the most common nosocomial infections caused mainly by uropathogenic *Escherichia coli* due to their ability to form biofilms in catheters. Biofilm formation makes the infection recurrent and resistant to antibiotics. Therefore, it has been suggested to inhibit the formation of biofilm from the initial stages. Some phenolic compounds are effective against biofilms; however, its mode of action is not specific and may affect different points of the biofilm. In this sense, the combination of phenolic compounds could have a synergistic effect. The objective of this study was to evaluate the combination of catechin, protocatechuic acid and vanillic acid on the planktonic growth of uropathogenic *E. coli*, biofilm eradication, adhesion, and biofilm formation on silicone surfaces. Protocatechuic acid (12.98 mM), vanillic acid (11.89 mM), and catechin (13.78 mM) were effective in inhibiting planktonic uropathogenic *E. coli*; while the combination of 1.62, 0.74 and 0.05 mM, respectively, showed a synergistic effect. The individual phenolic compounds and in combination permeate and make the cell membrane more fluid. On the other hand, protocatechuic acid (25.95 mM) and vanillic acid (23.78 mM) were effective in eradicating uropathogenic *E. coli* biofilms in silicone; while, the combination of 3.2, 2.97 and 1.72 mM, respectively showed synergistic effect. Bacterial motility was reduced from 20 to 35% by the individual phenolic compounds, while the greatest reduction was obtained with the combination. The surface charge, hydrophobicity and fimbriae curli were affected by the phenolic compounds, being the most effective the combination. The individual and combined phenolic compounds reduced the content of extracellular polymeric substances from 20 to 40%. The phenolic compounds reduced the cellular communication of uropathogenic *E. coli* from 10 to 25%, being the combination the most effective. Protocatechuic acid (11.03 mM), and vanillic acid (7.13 mM) inhibited the biofilm formation without affecting cell viability; while, the combination of 1.62, 0.74 and 0.05 mM, respectively, showed a synergistic effect. Using electronic microscopy, it was observed that phenolic compounds affected the biofilm structure in a time-dependent manner. This study demonstrated the potential to combine phenolic compounds to reduce individual effective doses and increase the anti-biofilm effect through the inhibition of motility, adhesion, cell communication and extracellular polymer content of uropathogenic *E. coli*.

Keywords: synergism, phenolic compounds, bacterial biofilms

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de las vías urinarias (IUs) se definen como la presencia de microorganismos patógenos en cualquier parte del sistema urinario, y representa una de las infecciones más comunes a nivel mundial. En México durante el 2017 se estimó un total de 2 896 602 casos, representando la tercera causa de morbilidad (Salud, 2010). Esta infección es frecuentemente adquirida en ambientes hospitalarios y el 80% de éstas son asociadas con el uso de un catéter urinario (Nicolle, 2014). La mayoría de los catéteres están elaborados de látex y recubiertos con silicona, el cual es un material propenso a la adhesión bacteriana, aumentando así el riesgo de adquirir una IU. El agente etiológico más común de esta infección es *Escherichia coli* uropatógena. Se considera que la capacidad de este microorganismo para adherirse a las superficies de dispositivos médicos y formar biopelículas es la principal causa de las infecciones urinarias asociadas a catéteres (IUAC) (Nicolle, 2014).

Las biopelículas son una comunidad compleja de bacterias adheridas a una superficie que exhiben un metabolismo alterado en relación con su contraparte planctónica. Estos agregados bacterianos están rodeados por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) constituidas de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Phillips et al., 2010). La formación de biopelículas comienza con la adhesión de células planctónicas a la superficie, esto es favorecido por la motilidad flagelar que les permite superar las fuerzas electrostáticas ambientales y alcanzar el sitio (Flores-Mireles et al., 2015). Las células bacterianas comienzan su adhesión estableciendo interacciones no específicas como electrostáticas e hidrófobas entre las mismas bacterias y la superficie. Posteriormente, esta adhesión se refuerza con la presencia de organelos adhesivos de la bacteria como fimbrias y pilis y con la secreción de SPE (Beloin et al., 2008). Además, el sistema de comunicación intercelular promueve la formación y crecimiento de la biopelícula. Naturalmente, *E. coli* uropatógena codifica una serie de factores de virulencia, como flagelos, fimbrias, adhesinas, entre otros, que les permiten formar biopelículas y sobrevivir en las vías urinarias. En este contexto, la afección de la adhesión celular y los factores de virulencia que promueven la formación de biopelículas podrían ser una alternativa para reducir la incidencia de IUAC.

Las biopelículas contribuyen a la resistencia y persistencia de la infección, ya que protegen a las bacterias del flujo mecánico de la orina, de la respuesta del sistema inmune del huésped y de los

efectos de los antibióticos (Flores-Mireles et al., 2015). La matriz de SPE proporciona la protección contra los antibióticos debido a que limitan su difusión dentro de la biopelícula, lo que hace que la mayoría de las infecciones relacionadas con el catéter sean difíciles de erradicar (Ito et al., 2009). Aunado a esto, la resistencia bacteriana ha ido en aumento en las últimas décadas. En un estudio se informó que *E. coli* aislada de orina de pacientes con IUAC es resistente a los antibióticos de uso más frecuente (Calderón-Jaimes et al., 2013). Generalmente, el mecanismo de acción de los antibióticos es inhibir el crecimiento o causar la muerte de bacterias planctónicas; sin embargo, son menos activos para evitar la adhesión celular e inactivar biopelículas preformadas. Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevas estrategias y agentes efectivos contra biopelículas con menor riesgo de causar resistencia.

Dentro de las estrategias más estudiadas como tratamiento para las IUs se encuentra el uso de extractos de plantas. Desde la antigüedad se han utilizado plantas medicinales para la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas. En particular para las IUs, el consumo de arándano y sus derivados han sido ampliamente recomendados debido a su componente fenólico principal, las proantocianidinas, y su efecto para inhibir la adhesión de fimbrias a células uroepiteliales (Howell, 2007; Vasileiou et al., 2013). Sin embargo después del consumo de arándano, los compuestos fenólicos complejos se metabolizan a fenoles simples como ácidos fenólicos y flavonoides (Monagas et al., 2010). Varios estudios clínicos informaron la presencia de estos compuestos en la orina después de la ingestión de arándano y dentro de los más abundantes se encontraron el ácido protocateico, el ácido vanílico y la catequina (Iswaldi et al., 2013; McKay et al., 2015). Esto resultados nos llevan a pensar que esos compuestos específicos también podrían ejercer un efecto antibacteriano y reducir las IUs.

El potencial antibacteriano de la catequina y los ácidos protocateico y vanílico en células planctónicas de *E. coli* ha sido eficaz (Alves et al., 2013; Jayaraman et al., 2010; Nakayama et al., 2013); sin embargo, no se ha investigado su capacidad para inhibir la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena. Algunos ácidos fenólicos han demostrado actividad para reducir la formación de biopelículas bacterianas; por ejemplo, los ácidos *p*-cumárico (0.25%) y ferúlico (0.05%) redujeron en rango de 2 a 6 log UFC/catéter la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en catéteres urinarios. Además, estos compuestos redujeron la biopelícula formada en el lumen del catéter pero no la inactivaron completamente (Kot et al., 2015). Similarmente, el ácido gálico y ferúlico inhibieron la formación de biopelículas de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Staphylococcus aureus y *Listeria monocytogenes* sobre superficies de poliestireno en un rango de 15-100% (Borges et al., 2012).

Los compuestos fenólicos tienen una potente actividad antibacteriana contra la formación de biopelículas. Las estrategias efectivas contra la biopelícula no se pueden limitar a una sola metodología que pueda interrumpir una vía, sino que deben dirigirse simultáneamente a las diversas rutas adoptadas por los microorganismos para sobrevivir dentro de su ecosistema. La evidencia con respecto a su modo de acción anti-biopelícula ha sugerido la reducción de la adhesión mediante la inhibición de la motilidad y los cambios en la superficie bacteriana, la reducción en el contenido de SPE y la interferencia con la comunicación celular que afectan el crecimiento y estructura de las biopelículas (Hidalgo et al. 2011; Lee et al. 2011). Sin embargo, el mecanismo exacto no ha sido totalmente aclarado. Los compuestos fenólicos tienen mecanismos de acción inespecíficos, lo que significa que podrían dirigirse a diferentes puntos de control durante el desarrollo de la biopelícula. Esto parece ser una ventaja, ya que la combinación de compuestos fenólicos con diferentes estructuras podría ejercer un efecto sinérgico para el control de biopelículas atacando diferentes sitios de acción al mismo tiempo.

Basado en el valor terapéutico de las interacciones sinérgicas de mezclas herbolarias, la combinación de agentes antimicrobianos ha adquirido gran interés para el control de bacterias patógenas (Cottarel & Wierzbowski, 2007). Rodríguez-Pérez et al. (2016) reportaron el efecto de 25 fracciones de un extracto de arándano sobre la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena. Los resultados demostraron que el extracto completo presentó mayor actividad que las fracciones debido a la suma de acciones de todos los componentes. Además, se observó que la fracción que contenía miricetina y quercetina en combinación fue la más efectiva para disminuir la formación de biopelícula de la bacteria en comparación con el control y con las fracciones individuales de estos compuestos. Este estudio demuestra que la combinación de compuestos fenólicos es una buena estrategia para aumentar la efectividad de los compuestos en comparación con su uso individual.

Con base a todo lo anterior, la combinación de diferentes compuestos fenólicos podría tener un mayor efecto en la inhibición de formación de biopelículas en comparación con los compuestos individuales. Esto debido a la acción de cada compuesto en los diferentes puntos de control durante las etapas de la formación de biopelículas. Por lo tanto, la pregunta de investigación de este estudio es ¿Cuál efecto tiene la presencia individual y combinada de ácido protocateico, ácido vanílico y

catequina sobre la formación y erradicación de biopelículas de *E. coli* uropatógena de superficies de catéteres urinarios de silicona? Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de la catequina, ácido vanílico y ácido protocateico y su combinación sobre el crecimiento planctónico, erradicación de biopelículas, adhesión y formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en superficies de silicona.

2. ANTECEDENTES

2.1 Infecciones Urinarias Asociadas a Catéteres son un Problema de Salud Pública

Las infecciones urinarias son de las infecciones más comunes a nivel mundial y se definen como aquellos procesos inflamatorios relacionados con la invasión y multiplicación de microorganismos que ocurren en cualquier nivel de vías urinarias, desde la uretra hasta las vías urinarias superiores (Flores-Mireles et al., 2015). Este tipo de infecciones suelen ser muy frecuentes en ambientes hospitalarios representando del 25 al 45% de las infecciones nosocomiales. Además, se ha sugerido que del 70-80% de las infecciones urinarias hospitalarias están fuertemente asociadas con el uso del catéter vesical (Lo et al., 2014). La infección de vías urinarias asociada a catéter (IUAC) es una causa común de infecciones prevenibles que aumentan la morbilidad y mortalidad, además de servir como reservorio para organismos resistentes (Mandakhalikar et al., 2016).

En México, el reporte del anuario de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (2015) notifica que la IUAC es la tercera infección asociada a la atención de salud con el 15.75% y con 6,842 casos reportados. La tasa de adquisición de una nueva IUAC es cercana al 3-7% por día cuando se usan catéteres permanentes por corto plazo y del 100% después de 30 días. Además, se estima que el riesgo de bacteriemia es 60 veces superior en pacientes con sonda permanente que el de los pacientes no sondeados (Salud, 2010). La aparición de una IUAC prolonga los días de estancia hospitalaria entre 6 a 10 días, incrementa la probabilidad de morir e implica un aumento en los gastos hospitalarios lo que impacta en la economía del sistema de salud y de las familias. Se ha estimado que un episodio de bacteriuria (presencia de bacterias en orina) tiene un costo adicional entre 500-1000 dólares (Salud, 2010).

La IUAC ocurre durante el periodo de cateterización o en las 72 h tras la retirada de la sonda. Algunos de los factores de riesgo más frecuentemente asociados a las IUAC son la duración con la sonda y las complicaciones durante la colocación, el manejo del catéter y la susceptibilidad del huésped según su edad, género, enfermedades concomitantes, y ciertas condiciones como embarazo y alteración anatómico-funcional de las vías urinarias (Control & Prevention, 2015). El diagnóstico microbiológico suele requerir un crecimiento superior o igual a 10^5 UFC/mL de una

sola especie de microorganismo de dos muestras de orina recogidas asépticamente del catéter (Hooton et al., 2010). La mayoría de los episodios de bacteriuria a corto plazo asociada a sondas suelen ser asintomáticos (Control & Prevention, 2015). Los pacientes con infección sintomática pueden ocasionalmente presentar conteos cuantitativos más bajos (10^3 UFC/mL), lo que probablemente refleja la colonización por biopelícula en el catéter (Lo et al., 2014). Las medidas en la reducción de las IUAC son principalmente: consumo de líquidos, reducción del uso de sonda, uso apropiado de la misma, técnicas seguras para su inserción y mantenimiento, manejo de la obstrucción, manejo en la recolección de muestras y elección correcta del material del catéter (Hooton et al., 2010).

Los catéteres urinarios son dispositivos médicos, típicamente con la forma de un tubo, que se insertan en el cuerpo para eliminar líquidos provenientes del sistema urinario. Éstos son elaborados de diferentes materiales que determinan sus características: elasticidad, coeficiente de fricción, biodurabilidad, biocompatibilidad, tendencia a la incrustación y tendencia a la adherencia bacteriana (Singha et al., 2017). Los catéteres están hechos con biomateriales poliméricos que pueden ser naturales como el látex o sintéticos como el cloruro de polivinilo, teflón, silicona u otros plásticos (Lawrence & Turner, 2005).

La silicona es uno de los biomateriales más probados y ampliamente utilizados durante el cateterismo urinario en sondaje de corta y larga duración. Este tipo de material presenta características positivas como alta biocompatibilidad, biodurabilidad y resistencia a la incrustación, atribuidas a la estabilidad química y térmica, baja tensión superficial e hidrofobicidad (Colas & Curtis, 2004). La silicona, conocida como polidimetilsiloxano, está constituido por un polímero sintético que se compone de enlaces de silicio a oxígeno que se repiten y presenta grupos metilo unidos a los átomos de silicio (Figura 1). Como los catéteres de silicona pura son más caros, la mayoría están fabricados con látex que se recubre con silicona para mejorar su tolerancia y facilitar su inserción (Curtis & Klykken, 2008). Por otro lado, los catéteres urinarios deben presentar poca tendencia a la adherencia bacteriana. Sin embargo, este tipo de material comparado con otros materiales médicos como cloruro de polivinilo y acero inoxidable, presenta mayor adhesión bacteriana (Gomes et al., 2015). Se ha sugerido que las superficies hidrofóbicas como las de la silicona favorecen la adhesión bacteriana, mientras que las superficies hidrofílicas son colonizadas en menor medida por bacterias (Gomes et al., 2015). Por lo que el material del catéter presenta un rol importante para el desarrollo de las IUs.

Las Instituciones de Salud han indicado que, a pesar de los avances en el conocimiento sobre el diagnóstico, fisiopatología y tratamiento, las IUAC siguen siendo un problema de salud pública. Generalmente, estas infecciones se presentan debido al sobreuso de la sonda y a la falta de capacitación para la instalación y manejo del dispositivo. Por lo tanto, existe una verdadera e importante necesidad de diseñar estrategias que eviten el desarrollo de la infección.

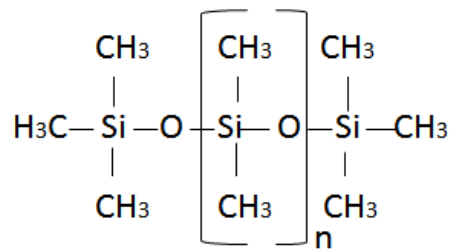


Figura 1. Estructura molecular del polímero de silicona.

2.2 *Escherichia coli* Uropatógena es el Principal Causante de Infecciones Urinarias Asociadas a Catéteres

A pesar de las barreras de las vías urinarias contra la infección microbiana, algunos organismos específicos son capaces de colonizar y persistir en este nicho (Dhakal et al., 2008). Los uropatógenos emplean estrategias específicas para infectar las vías urinarias, incluyendo la colonización de una sonda. La inserción en la vejiga de un cuerpo extraño como el catéter aumenta la susceptibilidad de un paciente a adquirir infecciones urinarias, ya que estos dispositivos sirven como el sitio de iniciación de la infección. El catéter favorece la colonización bacteriana ya que daña la mucosa uroepitelial protectora y conduce a la exposición de nuevos sitios de unión para adhesinas bacterianas e interrumpe las defensas mecánicas normales del huésped. Esto da como resultado una sobredistensión de la vejiga y micción incompleta que deja la orina residual para el crecimiento microbiano (Jacobsen et al., 2008).

La mayoría de los uropatógenos son contaminantes fecales, microbiota nativa de la piel o microbiota transitoria que proviene del personal o ambiente hospitalario (Nicolle, 2014). La entrada

bacteriana en la vejiga puede ocurrir en el momento de la inserción del catéter, a través del lumen del catéter o a lo largo de él. Debido a la inserción de un dispositivo extraño, los microorganismos capaces de causar IUAC requieren menos factores de virulencia para colonizar y establecer la infección que aquellos que causan infecciones urinarias (Jacobsen et al., 2008). Las infecciones urinarias en pacientes con sonda vesical, tienen un espectro etiológico muy amplio y generalmente son monobacterianas. La etiología bacteriana más frecuente en la IUAC incluye enterobacterias como *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*; bacilos Gram-negativos no fermentadores de lactosa como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y microorganismos Gram-positivos como enterococos. Estudios clínicos demuestran que la bacteria encontrada más frecuentemente en pacientes con IUAC es *E. coli* (Foxman, 2010; Martínez & Mensa, 2005; Nicolle, 2014).

En México se reportó que el 52.9% de pacientes de segundo nivel de atención presentaron IUAC causada por *E. coli*, seguida de *Enterococcus faecalis* (17.65%) y *Klebsiella pneumoniae* (11.77%). Así mismo, en el tercer nivel de atención la principal bacteria responsable de la infección fue *E. coli* con un 27.78% (De Lira Torres et al., 2012). Por otro lado, Molina et al. (2007) reportaron que *E. coli* (5%) fue la bacteria más frecuente en pacientes portadores de catéteres urinarios en un hospital de tercer nivel de atención médica, seguida de *Enterobacter* (3.8%) y *Pseudomonas* (2.5%).

E. coli es un microorganismo anaerobio facultativo Gram-negativo y miembro de la familia Enterobacteriaceae. Las cepas de *E. coli* uropatógena suelen diferir de otras cepas de *E. coli* que integran la microbiota fecal y no se encuentran como agentes de infecciones urinarias (no uropatógenas). Adicionalmente, las cepas de *E. coli* uropatógena demuestran una mayor capacidad de adherencia a células del epitelio urinario, resistencia al poder bactericida del suero, producción de hemolisina y mayor producción de antígeno capsular (antígeno K) (Davis & Flood, 2011). La patogenicidad de la bacteria dependerá de la presencia de uno o más factores de virulencia, como son la presencia de adhesinas que permiten su adhesión, la liberación de toxinas (hemolisinas), invasinas o islas de patogenicidad, entre otras (Cuadro 1) (Nohales & Nohales, 2010).

El primer paso en la patogénesis de la IUAC por *E. coli* uropatógena es la motilidad de la bacteria que permite que llegue a la superficie (Reisner et al., 2014). Una vez que las bacterias se encuentran en el tejido uroepitelial, éstas se internalizan en la célula del huésped y proliferan en el citosol formando comunidades intracelulares que sirven como protección contra la respuesta inmune del huésped, permiten persistir en las vías urinarias e interfieren con su erradicación (Mulvey, 2002;

Soto et al., 2007) (Figura 2). Estas comunidades no son de larga duración y con el tiempo se dispersan o se eliminan junto con las células infectadas del huésped (Blango et al., 2014), lo que puede potenciar la difusión de la bacteria dentro de las vías urinarias. *E. coli* uropatógena produce y secreta toxinas como las hemolisinas en el medio ambiente local causando un daño en el tejido; además presenta sistemas complejos de adquisición de hierro que contribuyen con su virulencia y patogénesis. Sin embargo, como el inicio de la infección se debe al desarrollo de biopelículas en el catéter, este evento se ha visto como un posible punto de control para la infección.

Cuadro 1. Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena (Nicolle, 2014).

| Factor de virulencia | Gen | Función |
|---|----------------------------|--|
| 1. Superficie | | |
| Flagelo | <i>fliC</i> | Motilidad, facilita la ruta de ascenso |
| Proteínas de membrana | <i>ireA, iha, ompA/C/T</i> | Función de receptores y transporte |
| 2. Adhesina | | |
| Fimbria tipo 1 | <i>fim</i> | Media adhesión sensible a manosa en epitelio del tracto urinario, adhesión a superficies abióticas, permite la invasión, formación de biopelícula, presente en más del 90% de bacterias involucradas en IUAC |
| Fimbria P | <i>pap</i> | Media adhesión resistente a manosa, presente en 40-60% de <i>E. coli</i> uropatógena aislada en casos de pielonefritis. |
| Fimbria S | <i>afa</i> | Adhesión al epitelio mucosal de vejiga, riñón y cerebro |
| Fimbria Dr | <i>sra</i> | Involucrada en proceso de adhesión e invasión |
| Adhesina afimbrial | <i>afa</i> | Adhesión a epitelio mucosal |
| Adhesina nofimbrial | <i>nfa</i> | Adhesión |
| Fimbria curli | <i>csg</i> | Promueve la colonización, formación de biopelícula y adhesión a superficies abióticas |
| Adhesina autotransportadora | <i>upa</i> | Autotransportador que promueve la agregación celular y la formación de biopelículas. |
| 3. Evasión de la respuesta del huésped | | |
| Cápsula K | <i>kps</i> | Antifagocítica, anticomplemento y resistencia al suero |

| | | |
|---------------------------------------|----------------------|---|
| Lipopolisacárido | <i>rfa, rfb, rfc</i> | Efectos endotóxicos, inducción de citocinas, resistencia al suero, inmunoadyuvante, inflamación y exfoliación de células hospederas |
| Resistencia al suero | <i>colV, traT</i> | Resistencia a la eliminación de bacterias por el suero |
| α -hemolisina | <i>hly</i> | Citotoxicidad, hemólisis |
| Factor necrotizante citotóxico | <i>cnf</i> | Interferencia con fagocitosis y apoptosis |
| Toxina secretada autotransportadora | <i>sat</i> | Citotoxicidad |
| Toxina vacolizante autotransportadora | <i>vat</i> | Citotoxicidad |

4. Sistema de adquisición de hierro

| | | |
|---------------------------|-------------|--|
| Sideróforo aerobactina | <i>intA</i> | Crecimiento bajo restricción de hierro |
| Sideróforo enterobactina | <i>ent</i> | Crecimiento bajo restricción de hierro |
| Sideróforo salmoquelina | <i>iro</i> | Crecimiento bajo restricción de hierro |
| Sideróforo yersinabactina | <i>fyuA</i> | Crecimiento bajo restricción de hierro |

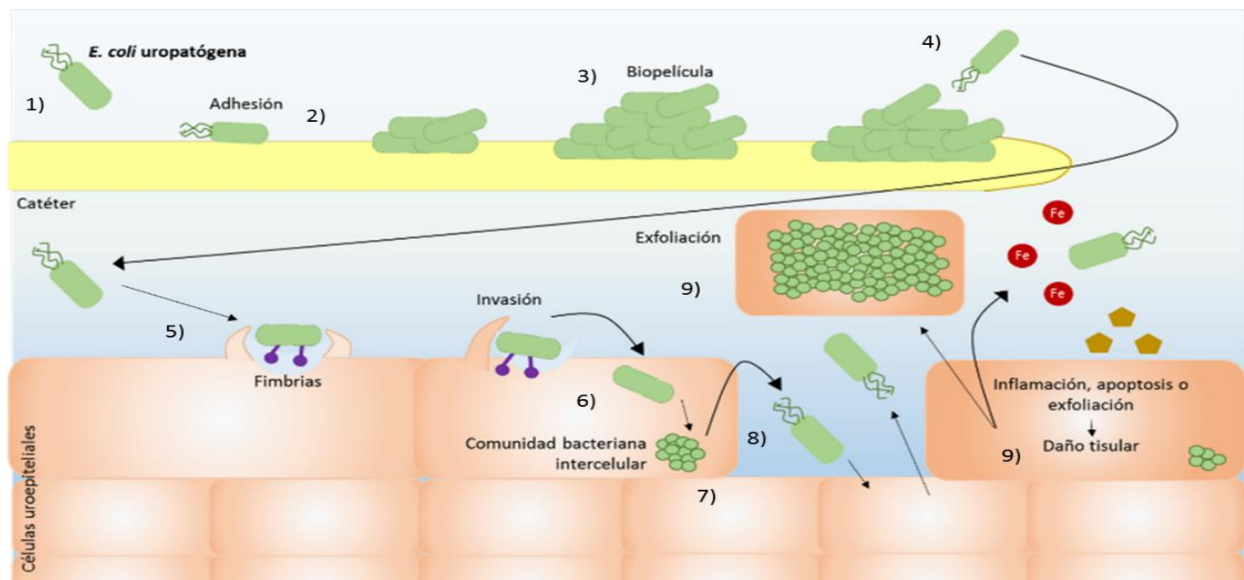


Figura 2. Representación del proceso de adhesión e invasión de *Escherichia coli* uropatógena en presencia de catéteres: 1) Llegada al catéter mediada por flagelos. 2) Adhesión bacteriana a superficie por fimbrias. 3) Formación y maduración de biopelícula. 4) Dispersión de células. 5) Llegada y adhesión a células uroepiteliales. 6) Internalización de la bacteria a la célula y proliferación de la bacteria. 7) Formación de comunidades intracelulares. 8) Salida de bacterias móviles de la célula. 9) Exfoliación de células infectadas y daño al tejido por sideróforos y hemolisinas. Adaptada de Flores-Mireles et al., 2015.

2.3 La Formación de Biopelícula de *Escherichia coli* Uropatógena como Barrera a los Tratamientos Antibióticos

Las infecciones urinarias asociadas a catéteres generalmente son causadas por la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en las superficies del dispositivo (Reisner et al., 2014). Esta biopelícula es una comunidad compleja de bacterias que secretan una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que le proporciona protección y la adhiere firmemente a la superficie abiótica (Phillips et al., 2010). Algunos componentes de la orina, incluyendo la proteína de Tamm-Horsfall, se incorporan en este material y pueden contribuir a la unión de células fimbriadas. La microbiología de la biopelícula en un catéter permanente es dinámica con la continua renovación de los organismos en la biopelícula, mientras que el catéter permanece *in situ* (Nicolle, 2014). Esta comunidad bacteriana puede ser extremadamente difícil de remover y una erradicación completa es difícil y costosa. Además, esta estrategia bacteriana proporciona protección contra cambios ambientales e inmunológicos del huésped y a los antibióticos, lo que favorece la persistencia en el medio, infecciones recurrentes, tratamientos más difíciles y mayor tiempo de estancia en el hospital (Nicolle, 2014).

La formación de biopelícula comienza inmediatamente después de la inserción del catéter, cuando los organismos se adhieren a la película acondicionadora de proteínas del huésped que se forma a lo largo de la superficie del catéter. Tanto las superficies internas como las externas del catéter están involucradas. La transición de células en estado planctónico (bacterias libres) a un estado sésil (células en biopelículas) ocurre en 5 principales etapas: I) adhesión reversible II) adhesión irreversible III) formación de microcolonias IV) maduración de la biopelícula y V) dispersión (Beloin et al., 2008) (Figura 3).

Para la formación de biopelículas se requiere primeramente un acercamiento de la bacteria a las superficies abióticas generalmente mediado por la motilidad. En un ambiente líquido, las bacterias podrían ser sometidas a fuerzas hidrodinámicas, especialmente cuando se acercan a las superficies. Junto con el movimiento pasivo, que es gobernado por fuerzas brownianas o gravitatorias, las bacterias han desarrollado mecanismos de motilidad que les permiten superar las fuerzas electrostáticas e hidrodinámicas repulsivas encontradas (Beloin et al., 2008). En *E. coli* la motilidad depende de un aparato flagelar compuesto de polímeros de flagelina (FliC, *fliC*) que es necesario para desplazarse en medio líquido. Los genes de la síntesis del flagelo bacteriano forman una

cascada ordenada en la que la expresión de un gen a un nivel dado requiere la transcripción de otro gen a un nivel superior; en la parte superior de la jerarquía en enterobacterias está el operón *flhDC* (Soutourina & Bertin, 2003).

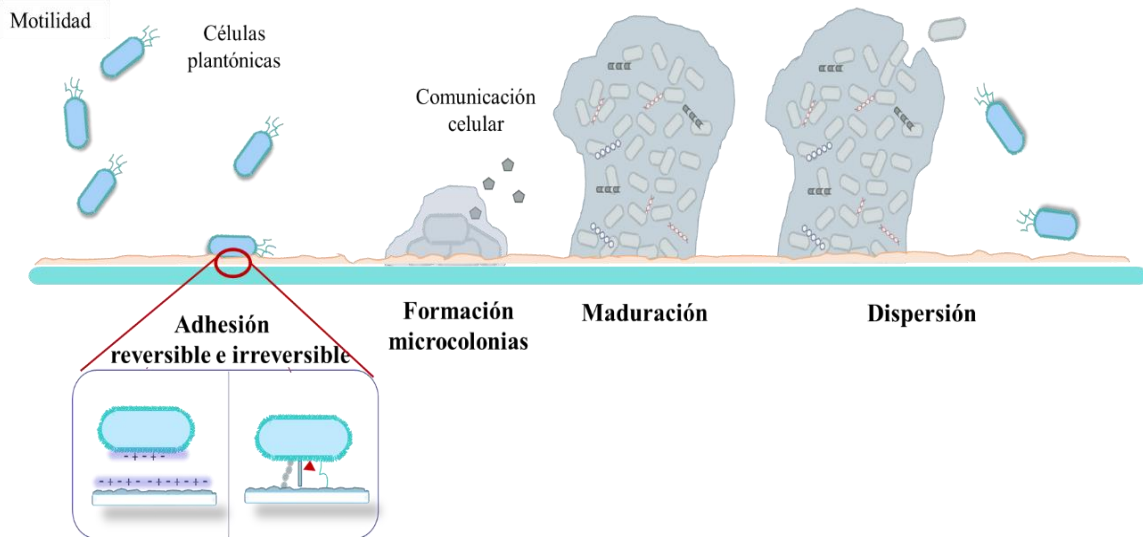


Figura 3. Esquema de la formación de biopelículas bacterianas en superficies abióticas. La bacteria mediante la motilidad por flagelo se aproxima al catéter y por medio de interacciones fisicoquímicas se adhiere reversiblemente. Los organelos extracelulares como pilis y fimbrias permiten la adhesión reversible. Posteriormente la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares y la comunicación intercelular participan en la maduración de la biopelícula. La última etapa es la dispersión de las bacterias embebidas hacia nuevos sitios para formar más biopelículas.

Pratt y Kolter (1998) demostraron que la motilidad bacteriana era necesaria para formar biopelículas de *E. coli*, y propusieron que, además de permitir que las bacterias rompieran las fuerzas repulsivas de la superficie, los flagelos también pueden permitir que las bacterias se diseminen sobre ésta. Además de que el flagelo y la motilidad influyen en la formación de biopelículas favoreciendo la adhesión, también censan la superficie para desencadenar la producción de la matriz polimérica y participan en la arquitectura de la biopelícula (Belas, 2013, 2014; Besharova et al., 2016; Wood et al., 2006).

Por otro lado, la adhesión bacteriana inicial (primera etapa de la formación de biopelícula) a las superficies abióticas depende en gran medida de las interacciones físico-químicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el sustrato (Dunne, 2002). Las fuerzas de atracción y repulsión entre

las bacterias y la superficie conducen a la unión reversible de las bacterias a la superficie. Este apego reversible está fuertemente influenciado por condiciones ambientales tales como el pH y la fuerza iónica del medio o la temperatura y por la naturaleza de la superficie, siendo las superficies rugosas e hidrofóbicas más susceptibles a la adhesión bacteriana (Beloin et al., 2008). Además, las características superficiales de la bacteria como el grado de hidrofobicidad, carga y energía superficial, también son importantes para favorecer el proceso de adhesión.

La segunda etapa de la formación de la biopelícula es la adhesión irreversible a la superficie. A medida que las bacterias se multiplican, se adhieren más firmemente y se diferencian, cambiando los patrones fenotípicos y expresión génica en formas que promueven la supervivencia, incluyendo la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares que permiten la asociación irreversible entre la bacteria y la superficie (Verstraeten et al., 2008). Además, durante esta etapa los organelos adhesivos como la fimbria tipo 1 y la curli, contribuyen a la unión irreversible de las bacterias a las superficies (Beloin et al., 2008).

La fimbria tipo 1 es una adhesina proteica filamentosa comúnmente expresada en bacterias de *E. coli* uropatógena. Estas fimbrias tienen una estructura tubular que es de 5-7 nm de diámetro y entre 0.2 y 2 μm de largo. La fimbria tipo 1 es un factor de virulencia que permite la adhesión de la bacteria de una manera manosa - dependiente a una variedad de receptores en las superficies de las células uroepiteliales (Duncan et al., 2005). Varios grupos han reportado que estas adhesinas son críticas para la formación de biopelícula de *E. coli* en superficies abióticas (Orndorff et al., 2004; Pratt & Kolter, 1998). Se ha informado que los mutantes tanto en *fimA*, el gen que codifica la mayor subunidad de la fimbria tipo 1, como en *fimH*, que codifica la adhesina específica de manosa situada en la punta de la fimbria, reducen la adhesión inicial de *E. coli* a superficies de cloruro de polivinilo, sugiriendo que pueden tener actividad de unión inespecífica en superficies abióticas mediadas por la FimH (Pratt & Kolter, 1998). Diversos estudios indican que la expresión de la fimbria tipo 1 puede afectar la adhesión de *E. coli* a superficies abióticas por la alteración de la composición de la membrana. Se ha demostrado que el contacto de la fimbria tipo 1 a la superficie disminuyen la abundancia de varias proteínas de membrana tales como BtuB, EF-Tu, OmpA, OmpX, Slp y TolC afectando las características fisicoquímicas de la superficie bacteriana y por consiguiente influyendo en la adhesión (Otto & Hermansson, 2004).

Por otro lado, la fimbria curli es un tipo de fibra amiloidea que se agrega para formar estructuras de 6-12 nm de diámetro y de largo entre 0.5 y 1 μm . Estas fimbrias son producidas solas o en

combinación con el exopolisacárido celulosa por la mayoría de las cepas de *E. coli* patógenas (Serra et al., 2016). Las fibras curli consisten de una subunidad mayor CsgA y una subunidad menor denominada CsgB, la cual sirve como nucleador para la polimerización de CsgA en la fibra amiloidea en la superficie de la célula. Los genes involucrados en la producción de curli se agrupan en dos operones divergentemente transcritos: el operón *csgBAC*, que codifica los componentes estructurales de curli y el operón *csgDEFG*, que codifica un regulador transcripcional (CsgD) y la maquinaria de exportación de curli (CsgE-G) (Serra et al., 2016). Este tipo de fimbrias favorecen la adhesión tanto a superficies bióticas como abiótica por medio de interacciones entre bacterias y superficies y entre las mismas bacterias, promoviendo la formación de la biopelícula (Arita-Morioka et al., 2018; Carter et al., 2016).

Posterior a la adhesión por fimbrias y pilis, las siguientes etapas consisten en el crecimiento y maduración de la biopelícula caracterizada por el incremento de la producción de SPE (Phillips et al., 2010). La matriz de SPE es el rasgo característico de la biopelícula que la distingue de las bacterias planctónicas y se estima que hasta el 90% de la biopelícula madura pueden ser SPE compuestas principalmente por agua, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Beloin et al., 2008). La matriz de biopelícula ofrece una capa viscosa constantemente hidratada que protege a las bacterias de la desecación o de las defensas inmunes del huésped. Además, desempeña un papel protector como barrera para la difusión de moléculas tóxicas y antimicrobianas, lo que podría contribuir al desarrollo de resistencia de la biopelícula y causar infecciones persistentes (Anderson et al., 2003). Así mismo, la matriz de SPE juega un papel importante en la estructura y arquitectura tridimensional de la biopelícula (Flemming & Wingender, 2010).

La composición exacta de esta matriz varía de acuerdo con el microorganismo, la biopelícula de *E. coli* contiene tres exopolisacáridos principales: β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA), celulosa y ácido colánico; sin embargo, el lipopolisacárido y la cápsula también son factores importantes para la formación de la biopelícula aunque no se acumulen dentro de la matriz (Sharma et al., 2016). El polímero de PGA ayuda a la formación de biopelículas al mediar la adhesión entre células y a las superficies. El operón *pgaABCD* de *E. coli* codifica proteínas, incluida la glicosiltransferasa PgaC que participa en la síntesis, exportación y localización del polímero PGA (Beloin et al., 2008). Por su parte, la síntesis de celulosa en *E. coli* está regulada por el operón *bcsABZC* que codifica para la proteína BcsA, una proteína de membrana cuya actividad de celulosa sintasa se controla de forma alostérica al unirse el segundo mensajero c-diGMP (Zogaj et al., 2001). La celulosa junto con la

red de fimbrias curli contribuye a la estructura rígida y tridimensional de la biopelícula (Beloin et al., 2008). Similarmente, el ácido colánico es un polímero con carga negativa de glucosa, fucosa y ácido glucurónico que forma una cápsula protectora alrededor de la célula bacteriana en condiciones específicas de crecimiento y condiciones ambientales. La síntesis de ácido colánico involucra 19 genes en el grupo *wca* inducido por el sistema de tres componentes RcsC/RcsD/RcsB y requiere un regulador de transcripción positivo auxiliar RcsA (Sharma et al., 2016).

Así mismo, la formación de biopelícula es favorecida por un sistema que presentan las bacterias de comunicación celular entre ellas. Este proceso consiste en la respuesta de las bacterias a una densidad celular específica, lo cual provoca una alteración en su fenotipo para que su metabolismo y otras actividades le permitan sobrevivir en el entorno. La comunicación intercelular se realiza a través de la producción de moléculas de señalización química conocidas como autoinductoras que activan o reprimen ciertos genes dependiendo de la cantidad de moléculas sintetizadas que van en función de una concentración de densidad bacteriana crítica (Nazzaro et al., 2013).

En bacterias Gram-negativas, el tipo más estudiado de comunicación celular son los homólogos LuxI/LuxR. LuxI sintetiza la molécula señal generalmente acilhomoserina lactona (AHL); mientras que LuxR sintetiza el receptor de la señal, el cual al unirse a la molécula señal, desencadena una respuesta regulando la transcripción génica (Zohar & Kolodkin-Gal, 2015). En el caso de *E. coli* sólo se codifica el homólogo LuxR llamado SdiA y en su genoma no hay genes (LuxI) que sintetizen acilhomoserina lactonas. A pesar de que no se sintetizan AHL, esta bacteria puede detectar y responder a estas moléculas señal producidas por otras bacterias por medio del receptor SdiA (Zohar & Kolodkin-Gal, 2015). Además, SdiA tiene un papel adicional en el control de la formación de biopelículas. Se ha demostrado que la sobreexpresión de *sdiA* en *E. coli* a 37°C aumenta la formación de biopelículas comparados con las cepas silvestres (Suzuki et al., 2002).

En *E. coli* existe otro sistema de comunicación celular por moléculas llamadas autoinductoras 2 (AI-2). Estas moléculas facilitan la comunicación interespecies e intraespecies representando un lenguaje universal. Las AI-2 derivan de un precursor común 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona, producto de la enzima LuxS (Zohar & Kolodkin-Gal, 2015). Aunque los mecanismos de secreción de AI-2 no son claros, se sabe que esas moléculas son reconocidas por sistemas de transporte Lsr. Las AI-2 regulan varios comportamientos de la bacteria, como la quimiotaxis, síntesis de flagelo, motilidad y factores de virulencia en *E. coli*. González Barrios et al. (2006) demostraron que la AI-2 estimula la formación de biopelículas y la motilidad de *E. coli*. Por otro lado, también se ha

sugerido que la enzima LuxS tiene un efecto en la formación de biopelículas como respuesta a las AI-2 sintetizadas por esta enzima. Niu et al. (2013) indicaron que los niveles de expresión de *luxS* podrían afectar la estructura tridimensional de biopelículas maduras.

Por último, las biopelículas maduras liberan continuamente bacterias planctónicas que pueden dispersarse por la motilidad y adherirse a otras partes del catéter o de las vías urinarias, formando nuevas colonias de biopelículas. Una vez colonizados en el catéter de nuevo, los uropatógenos deben adaptarse al medio de las vías urinarias y adquirir nutrientes, continuando con el proceso de infección (Jacobsen et al., 2008). Generalmente, las bacterias planctónicas se adhieren al cabo de unos minutos a las superficies abióticas, formando microcolonias fuertemente adheridas en un plazo de 2 a 4 h, posteriormente desarrollan una matriz de sustancias poliméricas extracelulares en un plazo de 6 a 12 horas, para dar paso a colonias de biopelículas maduras extremadamente resistentes a antimicrobianos, finalmente excretan bacterias planctónicas en un plazo de 1 a 4 días, según las condiciones de crecimiento como temperatura, pH, nutrientes, características de la superficie del catéter y la cepa bacteriana (Phillips et al., 2010).

El conocer los procesos antes descritos es útil para la búsqueda de estrategias que ayuden a mitigar la virulencia bacteriana y las consecuencias de este padecimiento tan común. Sin embargo, aun cuando se ha descrito gran parte de los factores de virulencia de *E. coli* es necesario resaltar que gran cantidad de información a partir de estudios en cepas no-uropatógenas. Algunos vacíos en el conocimiento específico para cepas uropatógenas incluyen el tiempo en el que cada etapa de la biopelícula se desarrolla, así como la influencia que tienen sobre ella las condiciones ambientales, la cantidad de nutrientes, pH, presencia de otras cepas, entre otros factores que pudieran afectar el proceso de formación. Así mismo, la regulación del proceso y la composición y estructura exacta de *E. coli* uropatógena permanecen sin conocerse del todo. Se ha sugerido que la inhibición transduccional y pos-transduccional de los factores de virulencia bacteriana pueden ser alternativas potenciales para la reducción de infecciones; por lo que la presente tesis se estudió la inhibición de formación de biopelículas, mediante la inhibición de motilidad y adhesión bacteriana como estrategias de prevención para las IUAC.

2.4 Tratamientos Emergentes contra las Infecciones Urinarias

Tradicionalmente, el tratamiento para las IU utiliza antibióticos como ampicilina, trimetoprima, nitrofurantoína, cefalosporinas y ácido nilidíxico (Calderón-Jaimes et al., 2013). Sin embargo, el desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha ido en aumento y es un problema mundial. Se ha observado que *E. coli* aislada de orina de pacientes con IUAC es resistente a los antibióticos más comúnmente utilizados para tratar dicha infección (De Lira Torres et al., 2012). Por otro lado, las células bacterianas incrustadas en la biopelícula son difíciles de tratar, ya que son más resistentes a los antibióticos que sus homólogos planctónicos (Khan & Ahmad, 2012). Las bacterias dentro de las biopelículas pueden tolerar la presencia de altas concentraciones de antibióticos, haciendo difícil erradicar la mayoría de las infecciones relacionadas con el dispositivo. Varios mecanismos son responsables de la resistencia a los antibióticos de las células embebidas en las biopelículas: 1. La matriz extracelular no permite una buena difusión de los agentes antimicrobianos a través de ella, 2. Las células en la biopelícula presentan un metabolismo más lento que las hacen menos susceptibles a antimicrobianos, 3. Presentan bombas de eflujo que expulsan los antimicrobianos, y 4. Células persistentes que resisten la muerte cuando se expone a los antimicrobianos, entre otros (Soto, 2013). Además, en su mayoría los antibióticos son diseñados para inhibir el crecimiento o causar la muerte de bacterias en estado planctónicas, por lo que no son efectivos para inhibir la adhesión celular e inactivar la formación de biopelículas.

Todo esto ha promovido la búsqueda de tratamientos alternativos que no generen resistencia a antibióticos y que sean efectivos para controlar biopelículas bacterianas. Dentro de las estrategias creadas se propone evitar la mera formación de la biopelícula, ya que la erradicación de una biopelícula ya formada requiere mayores esfuerzos y costos (Rafsanjany et al., 2013). Por lo tanto, la motilidad, la adhesión y la comunicación intercelular son las primeras etapas durante el desarrollo de la biopelícula y podrían ser puntos de control importantes para inhibir la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en catéteres. Sin embargo, otro punto a considerar es el tiempo necesario para que ocurra la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas en los catéteres, pues si este proceso se da en tiempos cortos los tratamientos preventivos serían poco prácticos.

Diversas alternativas se han generado para reducir las IU y muchos tratamientos emergentes están dirigidos a bloquear la adhesión de las bacterias y así evitar el establecimiento de reservorios problemáticos (Barber et al., 2013). Pequeñas moléculas conocidas como pilicidas se han diseñado para interferir con el ensamblaje de la fimbria tipo 1; mientras que manósidos o receptores análogos actúan uniéndose a FimH y previenen la interacción entre la adhesina y receptores del huésped impidiendo la adhesión bacteriana (Ribić et al., 2018). Por otro lado, se han desarrollado vacunas de bacterias completas inactivadas por calor, extracto de células bacterianas o factores de virulencia de *E. coli* uropatógena utilizados como antígenos y dirigidas contra fimbrias y pilis para reducir las IU. Otra de las estrategias más estudiadas para evitar la adhesión y desarrollo del agregado bacteriano es la modificación o recubrimiento de la superficie del material con compuestos orgánicos como antibióticos y antimicrobianos o inorgánicos como la plata (Desai et al., 2010; Tenke et al., 2012; Williams & Stickler, 2008). A pesar de que existen numerosos estudios con resultados positivos de estas alternativas, existen algunas desventajas del uso de éstas. La mayoría de los estudios han sido conducidos de manera *in vitro* y poco de ellos se han evaluado en animales y humanos; además, faltan estudios acerca de los riesgos y efectos secundarios en el organismo y en la microbiota para el caso de los pilicidas, manósidos y vacunas (Barber et al., 2013; Cusumano et al., 2011; Kochiashvili et al., 2014). Por otro lado, la principal desventaja de los recubrimientos con antibióticos es el desarrollo de resistencia bacteriana y la dificultad para controlar la cantidad de medicamento liberado (Fisher et al., 2015; Pugach et al., 1999).

Otra de las estrategias más estudiadas como tratamiento para las IUs es el uso de extractos de plantas. Desde la antigüedad se han utilizado plantas medicinales para la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas. En particular para las IUs, el consumo de arándano y sus derivados ha sido ampliamente recomendado (Howell, 2007; Vasileiou et al., 2013). Esto se ha atribuido principalmente a las proantocianidinas del tipo A, compuestos fenólicos presentes en los arándanos que inhiben la adhesión de fimbria P de *E. coli* a las células uroepiteliales, previniendo así la proliferación bacteriana y el desarrollo de la infección (Krueger et al., 2013; Occhipinti et al., 2016). Se ha sugerido que el consumo de arándano también puede disminuir los síntomas relacionados con la IU al suprimir las cascadas inflamatorias como respuesta inmunológica a la invasión de bacterias (Mantzorou & Giaginis, 2018). Además, se ha asociado de manera *in vitro* que el jugo de arándano reduce la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en material de

catéteres como el cloruro de polivinilo (Pinzón-Arango et al., 2011). Sin embargo, el mecanismo exacto de las proantocianidinas y el arándano no han sido totalmente elucidados.

Numerosos estudios clínicos se han llevado a cabo para demostrar la efectividad del arándano para inhibir el desarrollo de las IUs. Un estudio demostró que el 10.8% de mujeres que tomaron una dosis diaria de 500 mg de arándano en polvo comercial (2 mg de proantocianidinas) experimentaron una IU, mientras que en el grupo placebo el 25.8% presentó una IU durante seis meses de seguimiento (Fromentin et al., 2014). A pesar de toda la evidencia científica que respalda la eficacia del arándano en la reducción de las IUs, los resultados continúan siendo controversiales debido a la inconsistencia en los estudios y debido a que no se ha demostrado la superioridad del arándano contra el uso de los antibióticos (Asma et al., 2018).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado la efectividad de extractos de plantas medicinales contra *E. coli* uropatógena y sus factores de virulencia. Wojnicz et al. (2012a) determinaron que *Betula pendula*, *Equisetum arvense*, *Urtica dioica*, y *Vaccinium vitisidaea* ricas en ácido protocateico, ácido cumárico, ácido ferúlico y proantocianidinas afectaron a la fimbria curli y la fimbria P de *E. coli* uropatógena. Rafsanjany et al. (2013) reportan que extractos de plantas de las hojas de *Betula spp.*, *Orthosiphon stamineus* y *Urtica spp.* inhibieron la adhesión de *E. coli* uropatógena a células de vejiga T24. Además, estos autores reportaron que en la combinación de extractos, unos interactúan con la superficie bacteriana (*Zea mays L.*, *Agropyronrepens L.*) y otro con la célula de vejiga (*Orthosiphon stamineus*) presentando un efecto sinérgico para inhibir la adhesión bacteriana.

Algunos de los beneficios de usar extractos de plantas y sus compuestos principales podría ser que la mayoría de ellos son inofensivos para la salud humana y rara vez se asocian con efectos secundarios y resistencia bacteriana. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados señalan los beneficios de los extractos vegetales para inhibir la adhesión bacteriana o controlar las IUs sólo de manera *in vitro*, por lo que hacen falta que se lleven a cabo más estudios clínicos. Una de las desventajas de los extractos vegetales es el hecho de no identificar el compuesto responsable de la acción para reducir la IU y por lo tanto impide establecer un posible mecanismo de acción. Además, la homogeneidad en el extracto y establecer una dosis efectiva resulta sumamente complicado. Por otro lado, para asegurar su efectividad *in vivo*, los compuestos fenólicos de los extractos deben ser absorbidos en el sistema gastrointestinal y estar presentes en las vías urinarias (Rafsanjany et al., 2013). Por ejemplo, se ha observado que la actividad antimicrobiana del té verde contra *E. coli*

uropatógena tiene correlación con la capacidad de las catequinas para ser excretadas en la orina en concentraciones suficientes para reducir la IU (Reygaert & Jusufi, 2013).

Se sabe que las proantocianidinas del arándano son metabolizadas por la microbiota del colón para generar compuestos más sencillos como ácidos fenólicos (Monagas et al., 2010). Diversos estudios demuestran la presencia de fenoles simples en la orina de personas tras el consumo de arándano (Iswaldi et al., 2013; McKay et al., 2015; Wang et al., 2012). Dentro de los compuestos encontrados en mayor concentración en la orina de consumidores de arándano se encuentran ácidos hidroxibenzoicos como el ácido protocateico, ácido vanílico y flavonoides como catequinas (Figura 4) (González de Llano et al., 2015; McKay et al., 2015). Esto podría indicar que tales compuestos derivados del consumo de arándano ejercen un efecto en la reducción de la infección urinaria. Por lo que surgen la pregunta de investigación: ¿Qué efecto tiene la presencia individual y combinada de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina sobre la formación y erradicación de biopelículas de *E. coli* uropatógena de superficies de catéteres urinarios de silicona?

Estudios previos han reportado la efectividad del ácido protocateico, vanílico y catequina para inhibir el crecimiento de bacterias planctónicas (Alves et al., 2013; Pachecho-Ordarz, 2015); sin embargo, la influencia de estos compuestos en la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena y en las IUACs no ha sido estudiada. Esto resulta interesante ya que podrían ser agentes con gran potencial y con disponibilidad biológica para ejercer su efecto antibacteriano.

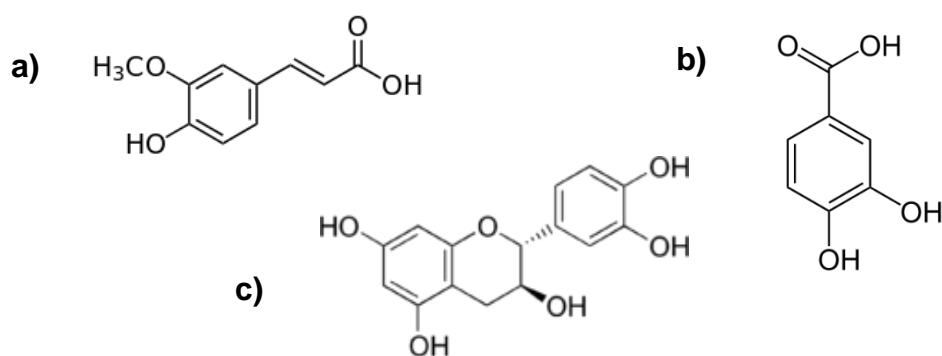


Figura 4. Estructuras de a) ácido vanílico b) ácido protocateico c) catequina.

2.5 Los Compuestos Fenólicos como Agentes Efectivos para el Control de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por plantas caracterizados por uno o más anillos aromáticos y al menos un grupo hidroxilo libre. Este grupo muestra una gran diversidad de estructuras, desde simples como los ácidos fenólicos hasta polifenoles como los taninos (Oliveira et al., 2017). Los compuestos fenólicos ejercen una amplia variedad de actividades biológicas y un gran potencial como antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-alérgicos, anti-carcinogénicos y antimicrobianos (Heleno et al., 2015; Martins et al., 2016; Truchado et al., 2015). Numerosos estudios han reportado la efectividad de compuestos fenólicos para inhibir el crecimiento, causar la muerte y afectar factores de virulencia y formación de biopelículas tanto de bacterias Gram-negativas como -positivas (Borges et al., 2012; Lemos et al., 2014; Serra et al., 2016). Sin embargo, existe poca evidencia acerca del potencial de compuestos fenólicos puros sobre el proceso de formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena.

Algunos ácidos fenólicos han demostrado actividad para reducir la formación de biopelículas bacterianas; por ejemplo, los ácidos *p*-cumárico (0.25%) y ferúlico (0.05%) previnieron la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en catéteres urinarios. Además estos compuestos redujeron la biopelícula formada en el lumen del catéter pero no la inactivaron completamente (Kot et al., 2015). Similarmente, el ácido gálico y ferúlico inhibieron la formación de biopelículas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* sobre superficies de poliestireno en un rango de 15-100% (Borges et al., 2012). Por su parte, los ácidos ferúlico y salicílico a 1 mg/mL y su combinación mostraron una reducción moderada (\approx 13 - 35%) en la formación de biopelículas de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus cereus* (Lemos et al., 2014).

Son diversos los mecanismos por los cuales se puede reducir la formación de biopelículas bacterianas. Como se mencionó anteriormente, un punto de control para la formación de biopelículas podría ser la motilidad. Algunos compuestos fenólicos de extractos vegetales pueden afectar diversos factores de virulencia relacionados como la motilidad. Hidalgo et al. (2011) mostraron que el jugo de arándano y proantocianidinas redujeron la motilidad *swimming* y *swarming* de *E. coli* CFT073 (uropatógena). Esto debido a la inhibición de la expresión del gen (*fliC*) que codifica para flagelina, polímero de proteínas que forma el flagelo, por lo tanto, se limita

la síntesis de flagelo y como consecuencia la motilidad de la bacteria uropatógena. Así mismo, Wojnicz et al. (2012b) reportaron que el extracto de arándano (28.5 mg/mL) redujo la motilidad tipo *swimming* en un 91% de dos cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con pielonefritis (infección en riñones). Además, este extracto de arándano (<38 mg/mL) causó cambios morfológicos en las bacterias en relación al largo normal de la célula y al número de filamentos cortos, lo que podría afectar la superficie bacteriana.

Sin embargo, la efectividad para reducir la motilidad de *E. coli* uropatógena de compuestos fenólicos más simples como ácidos fenólicos y flavonoides de menor peso molecular no se ha estudiado. Se han realizado trabajos similares con otras bacterias, por ejemplo, el ácido gálico y el ácido ferúlico inhibieron la motilidad de *L. monocytogenes* en un 70.5% y 100%, respectivamente, en comparación con el control (Borges et al., 2012). También, Lemos et al. (2014) informaron que el ácido ferúlico a la concentración de 1 mg/mL inhibió la motilidad de *B. cereus* y *P. fluorescens* en \approx 92 y 96%, respectivamente. El mecanismo exacto por el cual los compuestos fenólicos afectan la motilidad bacteriana sigue siendo desconocido; sin embargo, podría ser un efecto sobre la expresión de genes específicos relacionados con la síntesis del flagelo.

Por otro lado, la inhibición de la adhesión de las células bacterianas a las superficies abióticas, como los catéteres urinarios, es un paso crítico para la colonización de patógenos y formación de biopelículas. Actualmente, se han investigado varias estrategias para la inhibición de la adhesión bacteriana, como el uso de compuestos fenólicos que son capaces de modificar la superficie de las bacterias, prevenir la biosíntesis de adhesinas o afectar la estructura y la función de las fimbrias (Klemm et al., 2010). Existe un número limitado de publicaciones que describen la influencia de los ácidos fenólicos y flavonoides simples para inhibir la adhesión de *E. coli* uropatógena a dispositivos biomédicos; la mayoría de las investigaciones se realizan en extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos o en otras superficies abióticas o bióticas.

En este sentido, extractos de plantas medicinales como *Galium odoratum* y *Urtica dioica* a concentraciones de 15 y 20 mg/mL modificaron la superficie de *E. coli* uropatógena haciéndola más hidrofílica (Wojnicz et al., 2012a). Estos autores sugieren que la naturaleza superficial de las células hidrofílicas impide la colonización de los tejidos del huésped y de las superficies abióticas. Este efecto se atribuyó a la composición fenólica principalmente a kaempferol, quercetina, rutina, ácido cumárico y ácido protocateico. El mecanismo exacto por el cual los compuestos fenólicos modifican la superficie no está totalmente esclarecido.

Por otro lado, Gupta et al. (2016) evaluaron diferentes fracciones de jugo de arándano incluyendo proantocianidinas, antocianinas y flavonoles sobre la adhesión de la cepa bacteriana patógena *E. coli* B78. La microscopía de fuerza atómica (AFM) mostró una disminución significativa en las fuerzas de adhesión entre la superficie bacteriana y la punta de nitruro de silicón de la sonda del AFM después del tratamiento con fracciones de arándano. Este efecto podría atribuirse a la posible alteración de la estructura y función de las fimbrias. Los compuestos fenólicos de arándano y sus potenciales derivados del metabolismo microbiano como los fenoles simples (catecol, ácido benzoico, ácido vanílico, ácido fenilacético y ácido protocateico) redujeron la adhesión de *E. coli* uropatógena a células epiteliales de vejiga de una manera dosis dependiente (González de Llano et al., 2015).

Otra estrategia para evitar la adhesión bacteriana y como consiguiente la formación de biopelícula es inhibir la síntesis de fimbrias. Algunos compuestos fenólicos como el galato de epigallocatequina han demostrado ser efectivos para reducir la formación de biopelícula de *E. coli* uropatógena interfiriendo directamente con el ensamblaje de subunidades de fibras amiloides curli reduciendo la expresión de CsgD - un activador crucial de curli (Serra et al., 2016). En otro estudio, el flavonoide miricetina y derivados de éste como galato de epigallocatequina inhibieron la formación de biopelícula dependiente de curli en *E. coli* K12. Utilizando microscopio electrónico de transmisión y análisis de inmunotransferencia demostraron que este compuesto previene la síntesis de fimbria curli al suprimir la expresión de proteínas relacionadas con esta fimbria; mientras que el análisis de PCR-cuantitativa demostró que la presencia de este compuesto redujo los transcritos de *csgA*, *csgB* y *csgD*. Además, el nivel de RpoS, un factor sigma de fase estacionaria, se redujo en presencia del compuesto, mientras que el transcrito de *rpoS* no se afectó. Esto debido a que el compuesto aceleró la degradación de RpoS por la proteasa dependiente de ATP ClpXP en combinación con su adaptador RssB afectando la síntesis de curli (Arita-Morioka et al., 2018).

La inhibición de la formación de biopelículas también puede verse afectada por la interferencia de compuestos fenólicos en la comunicación intercelular mediante diversos mecanismos tales como inhibición de la síntesis de moléculas señal o interferencia con las proteínas receptoras. Se ha reportado que compuestos tales como quercetina, kaempferol, naringenina y apigenina reducen la formación de biopelículas de *E. coli* porque pueden suprimir la actividad de las moléculas señal autoinductoras-2 responsables de la comunicación de célula a célula implicada en la producción de biopelículas (Vikram et al., 2010). También, Lee et al. (2011a) confirmaron que el flavonoide

floretina reprime genes de síntesis de autoinductoras-2 de *E. coli* O157: H7 en biopelículas. Por otro lado, extractos de brócoli y sus compuestos quercetina y kaempferol redujeron la expresión relativa del gen *luxS* responsable de la síntesis de autoinductoras-2 (Lee et al., 2011b). Sin embargo, los mecanismos por los cuales los compuestos fenólicos modifican la expresión de genes no están elucidados.

Todos estos estudios demuestran el potencial de los compuestos fenólicos puros o en extractos vegetales para reducir la formación de biopelícula en superficies abióticas. Las estrategias efectivas contra la biopelícula no se pueden limitar a una sola metodología que pueda interrumpir una vía, sino que deben dirigirse simultáneamente a las diversas rutas adoptadas por los microorganismos para sobrevivir dentro de su ecosistema. Los compuestos fenólicos que pueden actuar en diferentes puntos de control durante el desarrollo de la biopelícula como: i) afectando la motilidad, ii) evitando la adhesión e iii) interfiriendo con la comunicación celular. Esto parece ser una ventaja, ya que la combinación de compuestos fenólicos podría ejercer un efecto sinérgico para el control de biopelículas atacando diferentes sitios de acción al mismo tiempo.

2.6 La Combinación de Compuestos Fenólicos Aumenta su Efectividad Antibacteriana

El valor terapéutico de las interacciones sinérgicas se conoce desde la antigüedad. La medicina herbolaria de diversas culturas se basa en la creencia de que mezclas de hierbas complejas con varios ingredientes puede aumentar la eficacia para la curación (Cottarel & Wierzbowski, 2007). Basado en esto, la combinación de diferentes drogas con antimicrobianos naturales ha adquirido gran interés para el control de bacterias patógenas. El concepto de sinergia antibacteriana se basa en el principio de que, la combinación de agentes antibacterianos dados puede aumentar la eficacia, disminuir la dosis y reducir el avance de la resistencia a los antimicrobianos en comparación con los agentes individuales (Li et al., 1993). Este enfoque tiene implicaciones financieras ya que la reformulación de fármacos o combinaciones existentes puede resultar ser una opción más viable, en lugar de desarrollar un nuevo fármaco; además, de que el disminuir las dosis impacta en la reducción de costos (van Vuuren & Viljoen, 2011).

Existen estudios que han reportado el efecto de la combinación de compuestos fenólicos con antibióticos tanto contra bacterias planctónicas como contra biopelículas (Jayaraman et al., 2010; Lima et al., 2016; Pereira et al., 2014). Tal es el caso, del ácido protocateico (500 µg/mL) que en combinación con sulfametoxazol (32 µg/mL) tuvo un efecto sinérgico para inhibir el crecimiento de células planctónicas de *P. aeruginosa* (Jayaraman et al., 2010). Maisuria et al. (2015) reportaron la efectividad de un extracto fenólico de jarabe de arce a concentraciones subletales en sinergia con antibióticos frente a la formación de biopelículas de *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*. Los autores propusieron como mecanismo de la sinergia que el extracto aumenta la permeabilidad de la membrana externa e inhibe la actividad de las bombas de eflujo; mientras que el antibiótico y ejerce su acción bactericida.

Por otro lado, el efecto sinérgico de la combinación de distintas clases de compuestos fenólicos en biopelículas bacterianas ha sido poco explorado (Lemos et al., 2014). Rodríguez-Pérez et al. (2016) reportaron el efecto de 25 fracciones de un extracto de arándano sobre la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena. Los resultados demostraron que el extracto completo presentó mayor actividad que las fracciones debido a la suma de acciones de todos los componentes. Además, se observó que la fracción que contenía miricetina y quercetina en combinación fue la más efectiva para disminuir la formación de biopelícula de la bacteria en comparación con el control y con las fracciones individuales de estos compuestos. Por otro lado, la combinación de miricetina y quercetina redujo la hidrofobicidad de la bacteria, posiblemente debido a interacciones con las estructuras proteicas superficiales de la membrana y se observó que esta combinación fue más efectiva que las otras fracciones. Este estudio demuestra que la combinación de compuestos fenólicos es una buena estrategia para aumentar la efectividad de los compuestos en comparación con su uso individual.

Similarmente, la combinación de ácido ferúlico y ácido salicílico (1000 µg/mL) fue más efectiva para inactivar biopelículas de *P. fluorescens*, *B. cereus* y biopelículas de ambas especies (Lemos et al., 2014). Además, un estudio evaluó el efecto de la combinación de jugo de arándano con ácido caprílico y timol contra la erradicación de biopelículas de *E. coli* uropatógena formadas en superficies de silicona en presencia de orina artificial (Kim et al., 2019). Los resultados demostraron que los tratamientos individuales no lograron erradicar las biopelículas pre-formadas. Por el contrario, los recuentos de bacterias sobrevivientes en las biopelículas se vieron reducidas de forma sinérgica cuando se combinó el jugo de arándano con los antimicrobianos. El tratamiento

de la combinación de los tres componentes (jugo de arándano 8%, ácido caprílico 0.05% y timol 0.05%) erradicó el 100% de las biopelículas formadas en menos de 1 min de exposición al tratamiento (Kim et al., 2019). Este estudio implica que la combinación de compuestos antimicrobianos puede actuar sinérgicamente para potenciar la actividad erradicadora contra biopelículas bacterianas y en un futuro ser utilizado para el tratamiento de las IUs.

A pesar de la evidencia existente sobre el impacto positivo de la combinación de compuestos fenólicos, poco se sabe de su modo de acción y cómo la combinación de los compuestos contribuye a la eficacia. Además, no se sabe exactamente la contribución de cada componente durante el efecto sinérgico. Se podría pensar que la combinación de diferentes estructuras tendrá un mayor efecto, ya que ciertas características estructurales han sido asociadas a la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos.

Pocos estudios han sido conducidos para determinar la relación entre la estructura de los compuestos fenólicos y su actividad antibacteriana. En este sentido, algunos autores han sugerido que la actividad contra bacterias es favorecido por un mayor grado de hidrofobicidad de los compuestos ya que promueve la interacción con la membrana, flagelo, fimbria, u otras estructuras (Wu et al., 2013). Por ejemplo, Baptista et al. (2018) reportaron que el compuesto 2-metoxifenol fue más efectivo para reducir la formación de biopelícula de *E. coli* debido a la presencia de una cadena lateral hidrocarbonada y su carácter lipofílico comparado con el catecol, veratrol y guayacol con estructura base similar. En el mismo sentido, en un estudio se evaluó el potencial antibacteriano de ácido gálico, cafeico y clorogénico para elucidar su mecanismo de acción contra *S. aureus* (Luís et al., 2014). Los resultados demostraron que el ácido cafeico a 4 mg/mL fue más efectivo para reducir la formación de biopelículas en comparación con el ácido gálico y clorogénico a la misma concentración. Esto debido a que la característica relativamente lipofílica del ácido cafeico que interfiere con la estabilidad de la membrana y la actividad metabólica de la bacteria en comparación con los otros fenoles. Sin embargo, se observó que el ácido gálico influyó en la adhesión de la bacteria y la inhibición de la síntesis de α -hemolisina, un factor de virulencia de *S. aureus* (Luís et al., 2014). Por lo que se puede sugerir que distintos compuestos tienen diferentes sitios de acción antibacterianos.

Por otro lado, se ha sugerido que en los flavonoides la hidroxilación de la posición 5 en el anillo A y la posición 3 en el anillo C mejoraran la actividad antibacteriana debido a una disminución en la fluidez de la membrana (Tsuchiya, 2010). Además, algunos autores han afirmado que el grado de

hidroxilación puede afectar la actividad antimicrobiana, indicando que los flavonoides polares tienen mayor efecto antibacteriano (Rodríguez-Pérez et al., 2016). Sin embargo, los estudios que relacionan la actividad biológica con la estructura de los compuestos fenólicos no han sido totalmente contundentes.

Con base a todo lo anterior, la combinación de diferentes compuestos fenólicos podría tener un mayor efecto en la inhibición de formación de biopelículas en comparación con los compuestos individuales. Esto debido a la acción de cada compuesto en los diferentes puntos de control durante las etapas de la formación de biopelículas como en motilidad, adhesión y comunicación celular, y así como en la erradicación de las mismas.

3. HIPÓTESIS

La combinación de catequina, ácido protocateico y ácido vanílico tiene un efecto sinérgico en la inhibición de formación de biopelículas de *Escherichia coli* uropatógena en superficies de silicona, debido a que los ácidos fenólicos causan cambios superficiales en células planctónicas, reduciendo la motilidad y la adhesión, mientras que el flavonoide inhibe la comunicación intercelular.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la combinación de catequina, ácido protocateico y ácido vanílico sobre el crecimiento planctónico, erradicación de biopelículas, adhesión y formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en superficies de silicona.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto antibacteriano de la combinación de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina sobre *E. coli* planctónica.
2. Analizar el efecto de la combinación de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina sobre la erradicación de biopelículas de *E. coli* uropatógena de los catéteres de silicona.
3. Medir el efecto de la combinación de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina sobre la motilidad y adhesión de *E. coli* uropatógena.
4. Cuantificar el efecto de la combinación de catequina, ácido protocateico y ácido vanílico sobre la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en catéteres de silicona.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la presente tesis se dividió en cuatro etapas, correspondientes a los objetivos específicos planteados.

5.1 Efecto Antibacteriano de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina.

5.1.1 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Compuestos Fenólicos sobre Células Planctónicas de *E. coli* Uropatógena

El efecto antibacteriano de catequina, ácido protocateico y vanílico (<97% HPLC, Sigma Aldrich, Toluca, México) se evaluó sobre células planctónicas de *E. coli* uropatógena (ATCC 70016) utilizando el método de microdilución en caldo (Burt & Reinders, 2003). Esto se realizó con la finalidad de determinar las dosis que se utilizaron en los demás ensayos. El inóculo bacteriano se preparó a partir de un cultivo de 19 h ajustado a 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, se agregaron 3 μ L de esta suspensión en una microplaca estéril (Costar 96) para obtener una concentración final de 1×10^3 UFC/mL, y se agregaron 297 μ L de cada compuesto fenólico a diferentes concentraciones (0 – 65 mM). Las soluciones de los fenoles se prepararon en caldo Luria Bertani (LB, Sigma Aldrich, Toluca, México) con un 5% de DMSO (Sigma Aldrich, Toluca, México) para lograr una solución homogénea. Como control positivo se utilizó el antibiótico nitrofurantoina (Biofurin, Bioreserch de México), el cual es el tratamiento más recomendado para las IUs. La microplaca se incubó a 37°C por 24 h y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración más baja de cada compuesto que inhibió visualmente el crecimiento bacteriano (Alvarez et al., 2014). La concentración mínima bactericida (CMB) de cada compuesto se determinó como la concentración que causa la muerte bacteriana y se obtuvo inoculando 20 μ L de la CMI y tres concentraciones más altas en agar LB incubadas a 37°C por 24

h. Tanto la CMI y la CMB se expresaron en milimoles (mM) de cada compuesto. Todo el experimento se realizó por duplicado y cada determinación se realizó por triplicado.

5.1.2 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de la Combinación de Compuestos Fenólicos sobre Células Planctónicas de *E. coli* Uropatógena

Para determinar el efecto antibacteriano de la combinación ternaria de catequina, ácido protocateico y catequina se utilizó el método del tablero de ajedrez (Ortega-Ramirez et al., 2017). Este método compara el efecto antibacteriano de la combinación a diferentes concentraciones con el efecto individual de cada compuesto. Primeramente, se evaluaron mezclas binarias utilizando fracciones de la CMI (0.0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 x CMI) de un compuesto en combinación con fracciones de la CMI del otro compuesto (ácido protocateico + ácido vanílico, ácido vanílico + catequina y catequina + ácido protocateico). Posteriormente, la mezcla binaria con mejor efecto antibacteriano a menores dosis se combinó con fracciones de la CMI del tercer compuesto. Para determinar el efecto de la combinación se utilizó la concentración fraccionada inhibitoria (Σ CFI). Esta concentración se calculó de la siguiente manera:

$$\Sigma\text{CFI} = \frac{\text{CMIa combinación}}{\text{CMIa individual}} + \frac{\text{CMIb combinación}}{\text{CMIb individual}} + \frac{\text{CMIc combinación}}{\text{CMIc individual}}$$

La interacción entre los compuestos en la combinación se obtiene a partir de los valores de Σ CFI: Sinergismo si $\Sigma\text{CFI} \leq 0.5$, aditivo si $0.5 < \Sigma\text{CFI} \leq 1$, indiferente si $1 < \Sigma\text{CFI} \leq 4$, antagonista si $\Sigma\text{CFI} > 4$.

5.2. Efecto de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina sobre la Erradicación de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena de los Catéteres de Silicona

5.2.1 Determinación de la Concentración Mínima de los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación para Erradicar Biopelículas de *E. coli* Uropatógena de los Catéteres de Silicona

Primeramente, se formaron biopelículas de *E. coli* uropatógena en fragmentos cilíndricos de 1 cm de sonda Foley (24 Fr/CH, 8 mm) dentro de tubos conteniendo 5 mL de caldo LB. Los tubos se inocularon a partir de un cultivo en fase exponencial (19 h, 37°C en caldo LB) para obtener una concentración final de bacteria de 1×10^3 UFC/mL y se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de ese tiempo, los fragmentos de catéter fueron lavados con agua estéril y expuestos durante 1 h a diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos de manera individual (0, 0.5, 1, 2 y 3 veces la CMI), en combinación (diferentes combinaciones de los compuestos) y con el antibiótico nitrofurantoína (0, 0.5, 1, 2, y 3 veces la CMI), diluidos en solución salina con 5% de DMSO (Tapia-Rodriguez et al., 2017). Posteriormente, los catéteres fueron lavados, colocados en solución salina y sometidos a baño de ultrasonido por 5 min. A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de bacterias viables en las biopelículas por unidad de área (Log UFC/cm²) en placas de agar LB incubadas por 24 h a 37°C. Se definió la concentración mínima de erradicación de biopelículas (CMEB) como la concentración más baja de cada compuesto individual y en combinación que inactivaron la viabilidad de bacterias embebidas en biopelículas preformadas en superficies de silicona. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

5.2.2 Cambios en la Permeabilidad de la Membrana de *E. coli* Uropatógena Expuesta a los Compuestos Fenólicos Individuales y Combinados

Uno de los mecanismos para erradicar células viables de una biopelícula formada es a través del daño a la membrana bacteriana causada por los compuestos fenólicos; por lo tanto, se determinó el efecto sobre permeabilidad de la membrana de acuerdo con el método del ensayo de cristal violeta (CV) (Park et al., 2018). Las bacterias se cultivaron durante 19 h a 37°C en caldo LB; luego, se lavaron con solución salina y se resuspendieron a una densidad óptica (DO, 600 nm) de 0.4. Las células bacterianas se trataron de manera individual con 6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico y 7 mM de catequina y en combinación a 1.62, 0.74 y 0.05 mM de cada compuesto, respectivamente, durante 8 horas a 37°C (estas concentraciones fueron determinadas previamente como la mitad de la CMI individual y como la mezcla que presentó un efecto sinérgico). Se utilizó una suspensión bacteriana sin la exposición a compuestos fenólicos como testigo. Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 9937 x g por 15 min y se resuspendieron en una solución de CV a una concentración de 30 µg/mL en solución salina; posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se utilizó como referencia una solución de CV sin inocular y sin compuestos fenólicos. Las muestras se centrifugaron para medir la DO del sobrenadante a 590 nm utilizando un espectrofotómetro Omega FLUOstar (BMGLabtech). El porcentaje de internalización de CV se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Internalización de CV (\%)} = \frac{OD_{590} \text{ valor muestra}}{OD_{590} \text{ valor solución CV}} \times 100$$

Los resultados se expresaron como el porcentaje (%) de CV internalizado en la membrana. Todo el experimento se realizó por duplicado y cada determinación se realizó por triplicado.

5.2.3 Evaluación de la Interacción de Compuestos Fenólicos y su Combinación con un Modelo de Membrana

Con la finalidad de determinar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la erradicación de biopelículas, se evaluó la interacción de estos compuestos con modelos de membranas. Las

isotermas del área de presión superficial (π -A) de la mezcla de dos fosfolípidos (dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, DMPG) se obtuvieron utilizando una balanza Langmuir (modelo 611, Nima Technologies Ltd, Coventry, EK) con una precisión de 0.1 mN/m (Nowotarska et al., 2014). Los fosfolípidos se disolvieron en cloroformo a una concentración final de 1 mg/mL en una proporción de 1:1 en peso, y se dispersaron en la superficie de la balanza. La presión superficial $\pi = \gamma_0 - \gamma$ (diferencia entre la tensión superficial del agua pura y la tensión superficial de la superficie cubierta con fosfolípidos) se midió utilizando el método de la placa de Wilhelmy. El área superficial del canal fue de 221.84 cm² y el volumen de la subfase fue de 270 mL. Se dispersaron 50 μ L de fosfolípidos con una microjeringa Hamilton en la superficie de agua pura (control) o en diferentes suspensiones acuosas de los compuestos fenólicos individuales y en combinación en un rango de concentraciones de 0 a 14 μ M. Todos los experimentos se realizaron dentro de una cabina de vidrio libre de polvo. Después de limpiar la superficie del tanque, se depositaron 480 mL de agua desionizada y las soluciones de cloroformo se depositaron en la subfase. Las isotermas se formaron 15 minutos después de que los fosfolípidos se depositaron para permitir que el cloroformo se evapore. Cuando se usaron suspensiones de compuestos fenólicos como subfase, las isotermas se hicieron después de 1 hora. El experimento se repitió dos veces.

Para el análisis del módulo de compresibilidad en las isotermas de las monocapas (C_s^{-1}) a una presión dada (π), los valores se obtuvieron de la siguiente manera:

$$C_s^{-1} = -A \frac{\partial \pi}{\partial A}$$

donde A es el área por molécula en la superficie a una presión dada. El valor C_s^{-1} se utiliza para identificar las transiciones de fase y para comparar los valores del módulo de compresibilidad a una presión superficial de alrededor de 30 mN/m (presión normal en membranas biológicas) (Nowotarska et al., 2014). Los valores más altos de C_s^{-1} significan una elasticidad interfacial más baja.

Para la penetración de compuestos fenólicos en modelos de membrana, las monocapas de fosfolípidos en la interfase aire-agua se comprimieron hasta 30 mN/m. Después de estabilizar la

presión durante 15 minutos, se inyectaron 5 mL de solución de compuesto fenólico en la subfase y luego se liberó la presión. El incremento en la presión superficial se midió durante 3 horas. El experimento se realizó por duplicado y los resultados se expresaron como mN/m.

5.2.4 Análisis Estadístico

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar a todos los experimentos. Los factores evaluados fueron las concentraciones de catequina, ácidos protocateico y vanílico; las variables de respuesta fueron el número de células adheridas a las superficies de silicona (Log CFU/cm²), el porcentaje (%) de captación de cristal violeta, valores de levantamiento (Å²/molécula) y el módulo de compresibilidad (mN/m). Se realizó un ANOVA para estimar diferencias significativas entre tratamientos y se aplicó la prueba de Tukey-Kramer para comparar las medias ($p \leq 0.05$) utilizando el software NCSS versión 2007.

5.3. Efecto de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina sobre la Motilidad y Adhesión de *Escherichia coli* Uropatógena

5.3.1 Evaluación de la Motilidad de *E. coli* Uropatógena Expuesta a los Compuestos Fenólicos de Manera Individual y en Combinación

Con la finalidad de inhibir la formación de biopelículas, se determinó el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación sobre la motilidad de *E. coli* uropatógena debido a que favorece que la bacteria se adhiera al catéter urinario (Lee et al., 2013). Para este ensayo, se inocularon 10 µL de una suspensión bacteriana en fase exponencial (19 h 37°C) a una concentración de 1×10^5 UFC/mL en el centro de placas de Petri conteniendo agar suave LB al 0.3% y 0.5% para motilidad tipo *swimming* y *swarming*, respectivamente, en

presencia de los compuestos fenólicos. Cada compuesto fenólico se incorporó en el medio a la mitad de la CMI (6.5 mM ácido protocateico, 6 mM ácido vanílico y 7 mM para catequina) con la finalidad de no afectar el crecimiento bacteriano y observar el efecto sobre la variable respuesta. La combinación de los tres compuestos se evaluó a la concentración que resultó con efecto sinérgico a menores dosis la cual fue de 1.62 mM, 0.74 mM y 0.05 mM del ácido protocateico, ácido vanílico y catequina, respectivamente. Se utilizó como testigo una placa de Petri inoculada en ausencia de los compuestos fenólicos. Las placas se incubaron a 37°C y el diámetro (mM) de la motilidad bacteriana fue el resultado expresado después de 24 h de incubación. El experimento se realizó por triplicado.

5.3.2 Determinación de la Carga Superficial de *E. coli* Uropatógena Expuesta a Compuestos Fenólicos de Manera Individual y en Combinación

Debido a que la adhesión bacteriana de *E. coli* está influenciada inicialmente por interacciones fisicoquímicas entre la superficie de la bacteria y el catéter urinario, se evaluó el potencial zeta utilizando un Nano Zetasizer (Malvern Instruments, Reino Unido) para evaluar los cambios en la carga superficial de las bacterias después de la exposición a los compuestos fenólicos individuales y en combinación (Gutierrez-Pacheco et al., 2018). Se prepararon suspensiones de células bacterianas a partir de un inóculo de 19 h a 37°C ajustado a 1×10^3 UFC/mL en caldo LB. A estas suspensiones se les agregó de manera individual 6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico y 7 mM de catequina y para la combinación se agregó 1.62, 0.74 y 0.05 mM de cada compuesto, respectivamente. Se utilizó como testigo el inóculo bacteriano sin adición de compuestos fenólicos. Las suspensiones se centrifugaron a 9937 g durante 10 min, se lavaron dos veces y el precipitado se diluyó en agua estéril. Se evaluó el potencial zeta aplicando un campo eléctrico a través de las suspensiones bacterianas y los resultados se expresaron en milivoltios (mV). El experimento se realizó por duplicado y cada determinación se realizó por triplicado.

5.3.3 Determinación de la Energía Superficial de *E. coli* Uropatógena Expuesta a Compuestos Fenólicos de Manera individual y en Combinación

La energía de superficie de *E. coli* uropatógena se determinó mediante un método espectrofotométrico con la finalidad de estimar la influencia de los compuestos fenólicos sobre la adhesión, ya que ésta está relacionada con las características hidrofóbicas de la bacteria determinadas por la energía superficial (Vazquez-Armenta et al., 2018). Las bacterias se cultivaron durante 19 h a 37°C en caldo LB. Después de ese tiempo, los cultivos se lavaron (3 veces) y se resuspendieron en solución salina, se sometieron a vórtex por 1 min y a un baño de ultrasonido para obtener una suspensión homogénea de aproximadamente 1×10^{10} UFC/mL. Posteriormente, la suspensión bacteriana se expuso durante 2 h a diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos de manera individual (6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico y 7 mM de catequina) y su combinación a 1.62, 0.74 y 0.05 mM de cada compuesto, respectivamente. Después de ese tiempo, las muestras se centrifugaron a $3600 \times g$ durante 3 minutos y el sedimento se resuspendió en solución salina (1 mL). Se prepararon mezclas binarias de etanol y agua a diferentes proporciones (100: 0 a 0: 100 v: v) para obtener valores de tensión superficial entre 23 y 76 mJ/m² determinados por un tensiómetro (CSC-DuNovy, No. 79, 535, Virginia, USA). Luego, se agregaron 100 µL de las suspensiones bacterianas (expuestas y no expuestas a compuestos fenólicos) a 500 µL de cada mezcla de etanol y agua. La solución se agitó y se mantuvo a 25°C durante 20 min. Las muestras se centrifugaron a $200 \times g$ durante 6 minutos para eliminar los sedimentos del sobrenadante. Finalmente, se agregaron 150 µL de cada suspensión a un pocillo de una microplaca (Costar 96) y se midió la DO a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Omega FLUOstar (BMGLabtech, USA). La DO de las muestras se graficó en función de sus respectivos valores de tensión superficial y el valor máximo de dispersión se determinó mediante un ajuste polinomial de tercer orden. Los resultados se expresaron en mJ/m² y todo el experimento se realizó por duplicado y cada determinación se realizó por triplicado.

5.3.4 Evaluación sobre la Fimbria Curli de *E. coli* Uropatógena Expuesta a los Compuestos Fenólicos de Manera Individual y en Combinación

Para determinar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la adhesión, se evaluó la producción de fimbria curli de *E. coli* uropatógena ya que promueve la adhesión a superficies y entre células para favorecer el desarrollo de biopelículas (Lee et al., 2013). En tubos con caldo LB y 5% de DMSO se agregaron concentraciones sub-inhedorias de cada compuesto fenólico de manera individual; las concentraciones utilizadas fueron: 6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico y 7 mM de catequina. Por otro lado, se agregó la combinación de los tres compuestos a una dosis de 1.62 mM, 0.74 mM y 0.05 mM de cada compuesto respectivamente. Estos tubos fueron inoculados a partir de un cultivo de *E. coli* uropatógena en fase exponencial (19 h, 37°C en caldo LB) ajustando el inóculo para una concentración final de 1×10^3 UFC/mL. Se utilizó como testigo un tubo con caldo LB y 5% de DMSO sin inocular. Las soluciones se incubaron por 24 h a 37°C. Después de este tiempo, las bacterias fueron lavadas tres veces con solución salina y tras la última centrifugación se diluyeron hasta obtener una DO (600 nm) de uno. Subsiguiente, 10 µL de cada suspensión se inocularon en placas de Petri con agar YESCA adicionado con 10 µg/g del tinte rojo Congo. Después de 24 h a 30°C se observó la producción de curli, colonias de color rojo indican la interacción del colorante con las fimbrias curli (+), mientras que colonias blancas indican la ausencia de fimbrias curli (-). El experimento fue realizado por triplicado.

5.3.5 Análisis Estadístico

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar a todos los experimentos. Los factores evaluados fueron las concentraciones de los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación y las variables de respuesta fueron el halo de motilidad (mm), la carga superficial (mV) y la energía superficial (mJ/m^2). Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para estimar diferencias significativas entre tratamientos y se aplicó la prueba de Tukey-Kramer para comparar las medias ($p \leq 0.05$) utilizando el software NCSS versión 2007.

5.4. Efecto de la Combinación de Catequina, Ácido Protocateico y Ácido Vanílico sobre la Formación de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena en Catéteres de Silicona

5.4.1 Determinación de las Concentraciones Mínimas de Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación para Inhibir la Formación de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena

Inicialmente se caracterizó la formación de biopelículas en catéteres de silicona para establecer la concentración de inóculo inicial y el tiempo (2-72 h a 37°C) necesarios para alcanzar la mayor adherencia celular. Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de los compuestos fenólicos individuales sobre la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en catéteres de silicona (Gomes et al., 2015). En condiciones estériles, se colocaron fragmentos cilíndricos de 1 cm de sonda Foley (24 Fr/CH, 8 mm) dentro de tubos conteniendo 5 mL de caldo LB. En estos tubos se agregaron diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos de manera individual (0 – 65 mM) y del antibiótico nitrofurantoína (0.05 – 0.2 mM) preparados en caldo LB con 5% de DMSO. Posteriormente, los tubos se inocularon a partir de un cultivo en fase exponencial (19 h, 37°C en caldo LB) para obtener una concentración final de bacteria de 1×10^3 UFC/mL y se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de este tiempo, los catéteres fueron removidos del medio y se lavaron con agua destilada para descartar células débilmente adheridas al catéter. Inmediatamente los catéteres se colocaron en 5 mL de solución salina y se sometieron a un baño de ultrasonido (42 KHz) por 5 min a 25°C para liberar las células adheridas. Se hicieron diluciones seriadas de esta suspensión y se determinó el número de bacterias adheridas por unidad de área (Log UFC/cm²) en agar LB a 37°C durante 24 h. A partir de la suspensión bacteriana donde se encontraban los catéteres inicialmente se cuantificaron las células planctónicas para asegurar que los compuestos fenólicos no afectaran la viabilidad del inóculo (Log UFC/mL) y el efecto fuera sobre la adhesión y formación de las biopelículas en los catéteres. Se definió como la concentración mínima inhibitoria de formación de biopelícula (CMIB) como la concentración más baja de cada compuesto que inhibió la adhesión de la bacteria sin afectar la viabilidad de células planctónicas significativamente. Todo el experimento se realizó por triplicado.

Para determinar la CMIB de las mezclas de los compuestos fenólicos se llevó a cabo el mismo procedimiento que para los tratamientos individuales con una adaptación del método del tablero de ajedrez descrito en la sección 5.1.2. El experimento se realizó por duplicado, cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en concentración (mM) de cada compuesto en la mezcla.

5.4.2 Evaluación del Efecto de los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación sobre la Formación de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena en Catéteres de Silicona

Con la finalidad de determinar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la densidad celular durante la formación de biopelículas a través del tiempo, se colocaron fragmentos del catéter Foley estéril dentro de tubos con 5 mL de caldo LB inoculados con *E. coli* uropatógena a una concentración de 1×10^3 UFC/mL. Para el efecto individual de los compuestos fenólicos, se utilizaron dosis sub-inhedoras para no afectar la viabilidad celular del inóculo agregado (6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico y 7 mM de catequina); mientras que el efecto combinado de los compuestos fenólicos se evaluó utilizando 1.62, 0.74 y 0.05 mM de cada compuesto, respectivamente. Se usó un tubo sin la adición de compuestos fenólicos como testigo. Las células adheridas en los fragmentos de catéter se determinaron en diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 12 y 24 h). Para ello, se retiraron los catéteres y se lavaron con agua destilada estéril para eliminar las células adheridas débilmente. Luego, los fragmentos del catéter se colocaron en tubos que contenían 5 mL de solución salina y se llevaron a un baño de ultrasonido durante 5 minutos para eliminar las células fuertemente adheridas. Se realizaron diluciones en serie a partir de estas suspensiones para determinar el número de bacterias adheridas por unidad de área de catéter (\log CFU/cm²) contando las células viables en agar LB después de 24 h de incubación a 37 °C (Tapia-Rodríguez et al., 2017). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

5.4.3 Análisis por Microscopía Electrónica Invertida de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena Expuestas a los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación

Se utilizó un microscopio Axio Vert (Carl Zeiss, NY, EUA) para observar los cambios morfológicos de biopelículas de *E. coli* uropatógena causados por la exposición a los compuestos fenólicos. Para esto, se formaron las biopelículas en superficies de poliestireno durante 24 h a 37°C utilizando un inóculo de 1×10^3 UFC/mL en caldo LB con los compuestos de manera individual (6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico, 7 mM de catequina) y su combinación a 1.62, 0.74 y 0.05 mM de cada compuesto, respectivamente. La biopelícula formada en ausencia de compuesto fenólico se tomó como testigo. A las 2 y 24 h de incubación, las superficies se lavaron con agua destilada estéril para eliminar las células adheridas débilmente, posteriormente se tiñeron con solución de CV al 0.1% durante 10 minutos, se lavaron para eliminar el exceso de colorante y se secaron al aire. Se realizaron observaciones microscópicas a un aumento de 600x.

5.4.4 Cuantificación de Sustancias Poliméricas Extracelulares Secretadas por *E. coli* uropatógena expuestas a los Compuestos Fenólicos Individual y en Combinación Durante su Adhesión a Catéteres de Silicona

Para determinar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la formación de biopelículas, se evaluó el contenido de SPE ya que proporcionan la estructura tridimensional de la biopelícula. Las SPE se cuantificaron a partir de biopelículas de *E. coli* uropatógena expuestas a compuestos fenólicos individuales y en combinación durante 24 h, elaboradas tal como se describió anteriormente. Para la extracción de SPE, los fragmentos del catéter se retiraron a las 24 h de la incubación, seguido de lavados con solución salina estéril para eliminar las bacterias débilmente adheridas. Después de eso, los catéteres se colocaron en 5 mL de agua destilada con 30 μ L de formaldehído (37 %) a 4°C durante 1 h. A continuación, se agregaron 2 mL de NaOH (1 M) a 4°C, las soluciones se sometieron a un baño de ultrasonido durante 10 min y se dejaron reposar a 4°C durante 3 h. Posteriormente, la solución se filtró a través de una membrana de 0.2 μ m para eliminar las células bacterianas, el

filtrado se purificó con una membrana de diálisis de celulosa (3500 Dalton) a 4°C durante 24 h y finalmente se liofilizó la fracción > 3500 Dalton (Liu y Fang, 2002). Para el análisis, los liofilizados se resuspendieron en agua ultrapura y se cuantificó el contenido de polisacáridos y proteínas de las biopelículas bacterianas (Liu & Fang, 2002). Los polisacáridos se determinaron mediante el método del ácido fenol-sulfúrico (Masuko et al., 2005). Para esto las muestras se mezclaron con 150 µL de ácido sulfúrico y 30 µL de fenol (5%), se incubaron a 90°C durante 5 minutos en un baño de agua estático y se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se midió la DO a 490 nm y los resultados se calcularon con base a una curva estándar de glucosa y se expresaron como µg de equivalentes de glucosa (EG)/cm². El contenido de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford adaptado a un lector de microplacas (Bradford, 1976). En primer lugar, se colocaron 120 µL de solución de SPE en una microplaca de 96 pocillos, luego se agregaron 30 µL de reactivo de Bradford a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La DO se midió a 562 nm y los resultados se calcularon utilizando una curva de albúmina de suero bovino y se expresaron en µg de equivalente de albúmina (EA)/cm². Todos los experimentos se realizaron por duplicado y cada determinación se realizó por triplicado.

5.4.5 Cuantificación de Moléculas Señal Autoinductoras 2 de *E. coli* Uropatógena Expuesta a Compuestos Fenólicos Individual y en Combinación

Se prepararon cultivos de 24 h de *E. coli* uropatógena en LB expuesta durante 24 h a diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos de manera individual (6.5 mM de ácido protocateico, 6 mM de ácido vanílico, 7 mM de catequina) y en combinación a 1.62, 0.74 y 0.05 mM de cada compuesto, respectivamente. Después, las muestras se centrifugaron a 3767 x g por 5 min a 4°C y se filtraron en microfiltros de 0.22 µm para obtener cultivos libres de células. Se cuantificó indirectamente el contenido de autoinductoras-2 utilizando *V. harveyi* BB170 que produjo luminiscencia en presencia de las AI-2 secretadas por la *E. coli* uropatógena (Taga & Xavier, 2011). Para el ensayo, en una microplaca se colocaron 90 µL de un inóculo de *V. harveyi* BB170 incubada en aireación por 14 h a 30°C en medio LB con sal y 10 µL de los cultivos libres de células. Se midió la luminiscencia en un lector de microplacas a 490 nm durante 7 horas tomando lectura cada

30 minutos a 30°C. Se tomó el valor al tiempo donde el control de *V. harveyi* BB170 presentó el menor conteo por minuto de luminiscencia. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como inducción de la luminiscencia, los cuales fueron calculados de la siguiente manera:

$$\text{Inducción bioluminiscencia} = \frac{\text{Conteo por minuto de muestra}}{\text{Conteo por minuto de } V. \text{ hareyi BB170 control}}$$

5.4.6 Análisis Estadístico

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar a todos los experimentos. Los factores evaluados fueron las concentraciones individuales y en combinación de catequina, ácidos protocateico y vanílico; las variables de respuesta fueron el número de células adheridas a las superficies de silicona (Log CFU/cm²) y el número de células planctónicas viables (Log CFU/mL), el contenido de SPE (polisacáridos = µg EG/cm², proteínas = µg AE/cm²) y la inducción de bioluminiscencia. Se realizó un ANOVA para estimar diferencias significativas entre tratamientos y se aplicó la prueba de Tukey-Kramer para comparar las medias ($p \leq 0.05$) utilizando el software NCSS versión 2007

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Efecto Antibacteriano de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina.

En el Cuadro 2 se muestra el efecto antibacteriano de los compuestos fenólicos y de la nitrofurantoína utilizados individualmente contra células planctónicas de *E. coli* uropatógena. La concentración mínima inhibitoria encontrada para el ácido vanílico fue de 11.89 mM, para el ácido protocateico de 12.98 mM y para la catequina de 13.78 mM. Por otra parte, las concentraciones mínimas bactericidas fueron de 17.84 y 19.46 mM para los ácidos vanílico y protocateico, respectivamente; mientras que, la catequina no mostró efecto bactericida a las concentraciones evaluadas (1.72 – 34.45 mM). En ambos ensayos el ácido vanílico fue más efectivo que el ácido protocateico y la catequina. Por otro lado, se evaluó la concentración mínima inhibitoria de nitrofurantoína como control positivo para efectos de comparación con los compuestos fenólicos. Los resultados demostraron que la nitrofurantoína requirió una dosis menor que los compuestos fenólicos para inhibir el crecimiento y causar la muerte de células planctónicas de *E. coli* uropatógena (0.4 mM).

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida de agentes antibacterianos contra células planctónicas de *E. coli* uropatógena incubada por 24 h a 37°C.

| Compuesto | Concentración mínima inhibitoria (mM) | Concentración mínima bactericida (mM) |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Ácido protocateico | 12.98 | 19.46 |
| Ácido vanílico | 11.89 | 17.84 |
| Catequina | 13.78 | ND |
| Nitrofurantoína | 0.4 | 0.4 |

ND: No determinada en el rango evaluado 1.72 – 34.45 mM.

Para demostrar que los compuestos fenólicos en combinación son más efectivos que de manera individual para inhibir el crecimiento bacteriano, se elaboraron varias combinaciones utilizando la técnica de tablero de ajedrez. En el Cuadro 3 se encuentran algunas de las combinaciones evaluadas que mostraron inhibición del crecimiento de bacterias planctónicas. La mezcla de 1.62, 0.74 y 0.05 mM de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina, respectivamente, mostró una Σ CIF de 0.3 representando interacción sinérgica entre los componentes. Aunque otras combinaciones también inhibieron el crecimiento bacteriano, éstas obtuvieron una Σ CIF mayor indicando interacciones aditivas, indiferentes o incluso antagonistas. Por lo que se eligió esta proporción (1.62, 0.74 y 0.05 mM) de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina para evaluar en los ensayos posteriores ya que cumple con el criterio de ser la dosis más baja de la combinación ternaria con mayor eficacia antibacteriana. Sin embargo, es importante mencionar que se podrían encontrar otras combinaciones ternarias efectivas utilizando otras dosis de los compuestos individuales que en este estudio no se evaluaron.

Cuadro 3. Efecto de la combinación de compuestos fenólicos contra células planctónicas de *E. coli* uropatógena incubada por 24 h a 37°C.

| Concentración (mM) | | | Efecto de la combinación | |
|--------------------|-------------|-----------|--------------------------|-------------|
| Ác. Protocateico | Ác Vanílico | Catequina | CIF | Interacción |
| 0.81 | 5.94 | 0.0 | 0.5 | Sinergismo |
| 12.98 | 0.0 | 0.20 | 1.0 | Aditivo |
| 0.0 | 5.94 | 6.89 | 1.0 | Aditivo |
| 1.62 | 0.17 | 6.89 | 0.6 | Aditivo |
| 1.62 | 0.74 | 0.05 | 0.3 | Sinergismo |
| 6.48 | 2.97 | 3.44 | 1 | Aditivo |

Con la combinación seleccionada, las dosis individuales fueron reducidas 8 veces para el ácido protocateico, 16 veces para el ácido vanílico y 276 veces para catequina. Estos resultados reflejaron el impacto de la combinación de compuestos fenólicos para reducir las dosis efectivas individuales. Las actividades antimicrobianas de los compuestos fenólicos en células planctónicas involucran diversos modos de acción. Uno de ellos es la penetración y disrupción de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros y fuga de componentes intracelulares (Simoies et al., 2009). Por otro lado, algunos compuestos fenólicos de bajo peso molecular con uno o varios grupos hidroxilo son hidrosolubles y les permite formar enlaces iónicos o puentes de hidrógeno con proteínas importantes en el metabolismo bacteriano (Negi, 2012). Los fenoles también pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y afectar bombas de energía tanto en bacterias Gram-negativas como positivas (Wu et al., 2018). Debido a que esta clase de compuestos no son totalmente específicos y pueden tener varios sitios de acción es posible observar una sinergia en la actividad antibacteriana durante la combinación.

La catequina y el ácido protocateico son compuestos con gran potencial antibacteriano, sin embargo, en este estudio el ácido vanílico fue más efectivo para inhibir el crecimiento de *E. coli* uropatógena. El potencial antibacteriano se ha asociado con un aumento en el carácter lipofílico de los compuestos. En este caso, el ácido vanílico tiene un LogP de 1.43 que es más alto que el LogP del ácido protocateico (LogP = 0.86) y la catequina (LogP = 0.4), lo que podría indicar una mayor interacción con la membrana citoplasmática y ser más efectivo. Por otro lado, también se ha sugerido que el número de grupos hidroxilos aumenta la actividad inhibitoria de los ácidos hidroxibenzoicos y aún más la sustitución de un grupo hidroxilo con grupo metoxi como en el caso del ácido vanílico, que le proporciona buenas propiedades anfifílicas y por lo tanto una buena característica de penetración celular (Figura 4) (Sánchez-Maldonado et al., 2011). Para corroborar si esta hipótesis es correcta se evaluó la posible interacción entre los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación con modelos de membranas.

Hasta el momento, no se ha encontrado un estudio que haya reportado el efecto antibacteriano de estos ácidos fenólicos y catequina contra *E. coli* uropatógena; sin embargo, se han reportado CMI similares para estos ácidos fenólicos individuales contra otras bacterias (Alves et al., 2013; Miyague et al., 2015). El ácido protocateico mostró una CMI de 19.46 mM contra *L. monocytogenes*, y el ácido vanílico mostró una CMI de 17.84 y 14.86 mM contra *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* Typhimurium, respectivamente. Por otro lado, los flavonoides, como las catequinas,

mostraron un potencial antibacteriano con CMI que varían de 31 mM a 344 mM contra *E. coli*, *S. Typhimurium* y *S. aureus* (Nakayama et al., 2013; Taylor et al., 2005). En promedio, los valores de CMI obtenidos se encuentran en el rango reportado anteriormente, y las variaciones encontradas podrían atribuirse a la discrepancia en el origen de los compuestos y métodos utilizados para determinar la actividad antibacteriana combinada con el uso de diferentes cepas.

En este estudio, los compuestos fenólicos combinados fueron más efectivos comparado a su uso de manera individual obteniendo el mismo efecto pero a dosis menores. Es importante resaltar que aun cuando la catequina no mostró ningún efecto bactericida en las concentraciones más altas probadas, parece tener un papel en la mejora de la eficacia de los ácidos fenólicos durante la combinación. Debido a la gravedad de la resistencia antibacteriana que se ha observado en los últimos años, un cambio de paradigma en la monoterapia de fármacos por la combinación de múltiples fármacos, ha ganado gran interés (Wagner & Efferth, 2017).

Existen estudios en donde se han combinado compuestos fenólicos de extractos de plantas y aceites esenciales, entre ellos o con antibióticos, demostrando que los fitoquímicos pueden inhibir los mecanismos bacterianos relacionados con resistencia o mostrar una sinergia al bloquear uno o más sitios del metabolismo de la bacteria (Hemaiswarya et al., 2008; Maisuria et al., 2015; Wagner & Efferth, 2017). La sinergia de los compuestos fenólicos se basa en que cada componente presenta distintos sitios de acción durante la combinación. En un estudio se demostró que la combinación de algunos flavonoides fue más efectiva para inhibir el crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina en comparación con los compuestos utilizados de manera individual (Amin et al., 2015). Los autores reportan que morina y rutina a una concentración de 500 µg/mL no inhibieron el crecimiento de la bacteria, mientras que la combinación de 280 µg/mL de morina, 280 µg/mL de rutina y 140 µg/mL de quercetina mostró un halo de inhibición de 16.23 mm.

Los resultados obtenidos en esta etapa fueron necesarios para determinar las concentraciones sub-inhedoras que se utilizaron en los ensayos siguientes para descartar un efecto de la pérdida de viabilidad celular en el inóculo y que el efecto fuera sobre la variable respuesta.

6.2. Efecto de los Compuestos Fenólicos Individuales y en Combinación para Erradicar Biopelículas de *E. coli* Uropatógena

Los resultados de esta etapa tienen la finalidad de demostrar que la erradicación de biopelículas de *E. coli* uropatógena es más difícil en comparación con las células planctónicas, y de esta manera evidenciar que resulta mejor prevenir la formación de biopelículas. Además de evaluar uno de los posibles mecanismos supresores de los compuestos fenólicos como lo es la alteración de la membrana bacteriana.

Los compuestos fenólicos redujeron el número de células viables en biopelículas pre-formadas de *E. coli* uropatógena adheridas a superficies de silicona (Figura 5). La CMI del ácido protocateico redujo la densidad celular en las biopelículas pero no la inhibió completamente; mientras que incrementando dos veces la CMI se erradicó la biopelícula bacteriana ($p \leq 0.05$). En cuanto al ácido vanílico, la concentración de 23.78 mM que corresponde a dos veces la CMI fue efectiva para inactivar el 100% de células viables en la biopelícula pre-formada ($p \leq 0.05$). Incluso estas concentraciones fueron mayores a las dosis necesarias para causar la muerte bacteriana (CMB) de células planctónicas. De manera consistente con nuestros ensayos anteriores, la catequina a las dosis evaluadas (hasta 68.9 mM) redujo la densidad celular de las biopelículas pero no las erradicó. Un resultado interesante fue que la nitrofurantoína a una concentración 6.3 veces mayor que la CMI no redujo el crecimiento de las bacterias en biopelículas pre-formadas. Estos resultados indican que la matriz de SPE de la biopelícula con la acción de los agentes antibacterianos ya que se necesitaron dosis mayores contra biopelículas que contra células planctónicas. Aunado a esto, los antibióticos utilizados comúnmente no son efectivos para eliminar biopelículas una vez ya formadas en el catéter y sólo son útiles a nivel planctónico, reforzando así la necesidad de usar alternativas a los antibióticos comúnmente empleados.

En el Cuadro 4 se muestra el efecto de algunas de las combinaciones de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina que lograron erradicar biopelículas de *E. coli* uropatógena pre-formadas durante 24 h a 37°C en superficies de silicona. De estas mezclas, tres de ellas mostraron efecto sinérgico al momento de inactivar células en biopelículas; sin embargo, la combinación en donde se utilizaron dosis menores fue la de 3.2 mM de ácido protocateico, 2.97 mM de ácido vanílico y 1.72 mM de catequina. Durante la combinación de los compuestos fenólicos las dosis utilizadas

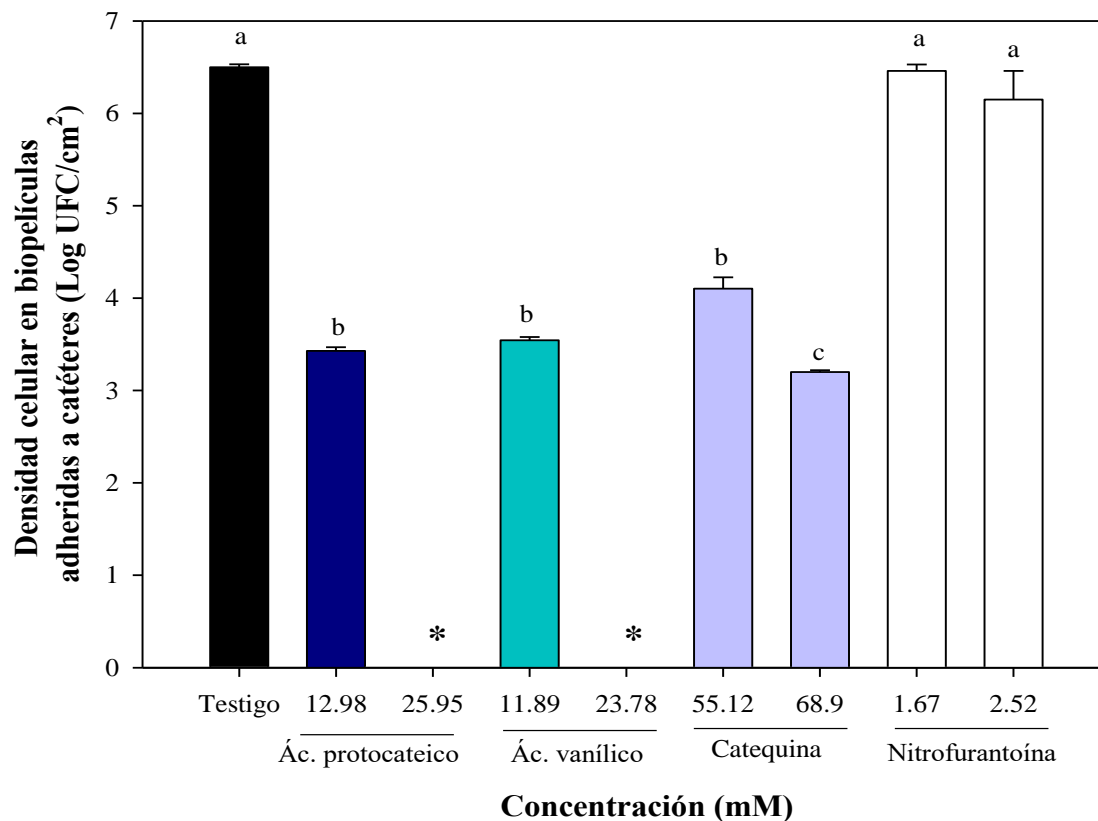


Figura 5. Viabilidad de *E. coli* uropatógena en biopelículas pre-formadas (testigo) y expuestas durante 1 h a ácido protocateico, ácido vanílico, catequina y nitrofurantoína. Diferentes literales indican diferencias entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. * Valor por debajo de los límites de detección (1.3 Log UFC/cm²).

Cuadro 4. Combinación de compuestos fenólicos que erradican biopelículas de *E. coli* uropatógena pre-formadas en superficies de silicona por 24 h a 37°C.

| Combinación (mM) | | | Σ CIF | Interacción de la combinación |
|--------------------|----------------|-----------|--------------|-------------------------------|
| Ácido protocateico | Ácido vanílico | Catequina | | |
| 5.51 | 3.56 | 13.78 | 0.56 | Aditivo |
| 3.20 | 2.97 | 1.72 | 0.30 | Sinérgico |
| 1.62 | 5.94 | 3.44 | 0.43 | Sinérgico |
| 0.0 | 5.94 | 13.78 | 0.38 | Sinérgico |

individualmente lograron ser reducidas 8, 8 y 40 veces para el ácido protocateico, el ácido vanílico y la catequina, respectivamente.

Se ha reportado que la eliminación de la biopelícula y la inactivación de las células de la biopelícula se realizan mediante procesos distintos. La erradicación de biopelículas se refiere a la inactivación de bacterias, pero éstas pueden permanecer adheridas a la superficie; por otro lado, la eliminación de biopelículas debe realizarse mediante la degradación y eliminación de las SPE adheridas. Cualquier agente con actividad de erradicación de biopelículas debe atravesar la matriz creada por sustancias poliméricas extracelulares y atacar las células viables incrustadas. Las bacterias de la biopelícula pueden ser inactivadas por la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos, que incluyen la ruptura de las membranas citoplásmicas, la inhibición enzimática a través de la reacción con el grupo sulfhídrico, o interacciones no específicas con proteínas y la síntesis de ácidos nucleicos (Simoes et al., 2009). Sin embargo, el mecanismo en las bacterias de biopelículas embebidas podría ser diferente, considerando la interferencia de los componentes de las biopelículas. Estos resultados resaltan la importancia de combinar agentes antibacterianos con un modo de acción diferente, con al menos uno capaz de romper la matriz del polímero y otro capaz de causar la muerte celular bacteriana.

Un estudio demostró que la combinación de ácido ferúlico y ácido salicílico (1000 µg/mL) fue más efectiva para inactivar biopelículas de *P. fluorescens*, *B. cereus* y biopelículas de ambas especies (Lemos et al., 2014) que los compuestos individuales. Además, en otro estudio se evaluó el efecto de la combinación de jugo de arándano con ácido caprílico y timol contra la erradicación de biopelículas de *E. coli* uropatógena formadas en superficies de silicona en presencia de orina artificial. Los resultados demostraron que los tratamientos individuales no lograron erradicar las biopelículas pre-formadas (Kim et al., 2019). Por el contrario, los recuentos de bacterias sobrevivientes en las biopelículas se vieron reducidas de forma sinérgica cuando se combinó el jugo de arándano con los antimicrobianos. El tratamiento de la combinación de los tres componentes (jugo de arándano 8%, ácido caprílico 0.05% y timol 0.05%) erradicó el 100% de las biopelículas formadas en menos de 1 min de exposición al tratamiento (Kim et al., 2019). Este estudio indica que la combinación de compuestos antimicrobianos puede actuar sinérgicamente para potenciar la capacidad de erradicar biopelículas bacterianas y en un futuro ser utilizado para el tratamiento de las IUs.

Uno de los mecanismos de acción antibacterianos y para erradicar biopelículas que se han propuesto para los compuestos fenólicos es la alteración de la membrana bacteriana. La integridad de la membrana celular pudo evaluarse en función de la capacidad de la captación de cristal violeta debido al daño en la membrana causada por los compuestos fenólicos. En la Figura 6 se muestra el potencial de estos compuestos de manera individual y en combinación para afectar la integridad de la membrana de *E. coli* uropatógena después de ocho horas de exposición. Los resultados sugieren que los compuestos fenólicos evaluados comprometen la integridad de la membrana bacteriana ($p \leq 0.05$), siendo la catequina a 7 mM la más efectiva permitiendo la internalización de un 62% de cristal violeta. Por su parte, los ácidos protocateico y vanílico a una concentración de 6.5 y 6 mM respectivamente, mostraron un comportamiento similar entre ellos con una internalización de cristal violeta entre 20 – 25%.

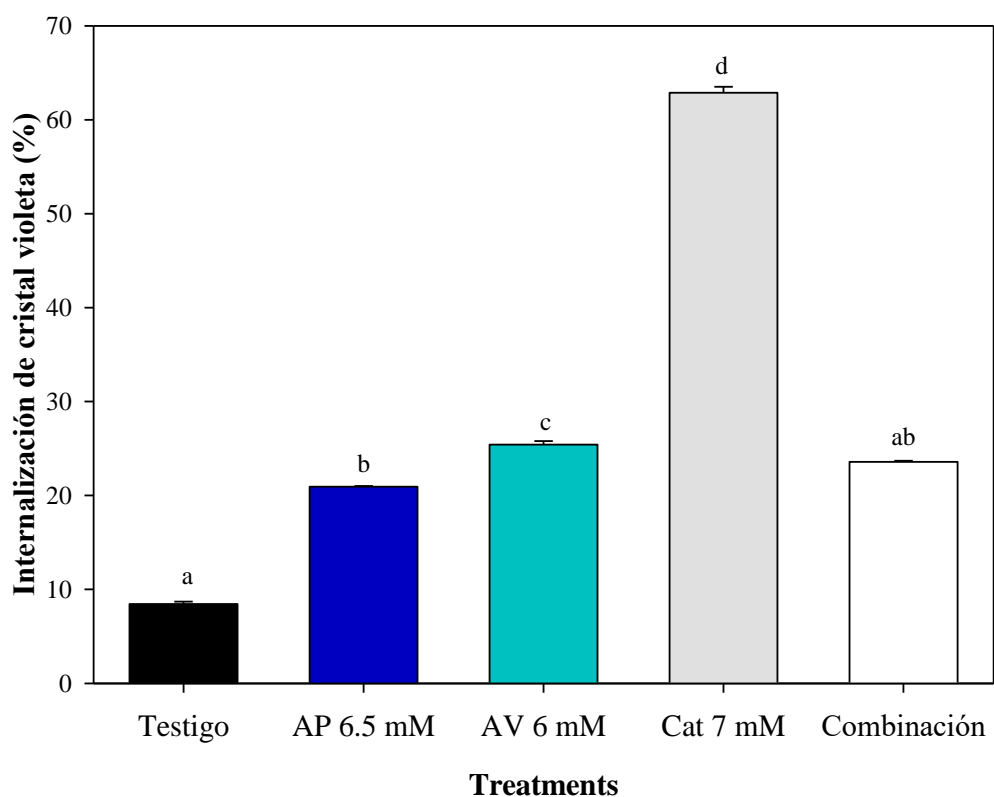


Figura 6. Efecto del ácido protocateico (AP), ácido vanílico (AV) y catequina (Cat) y su combinación [(1.62 mM (AP) + 0.74 mM (AV) + 0.05 mM (Cat))] sobre la permeabilidad de la membrana de *E. coli* uropatógena. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Diferentes letras significan diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

Para continuar con la evaluación del efecto de los compuestos fenólicos sobre la integridad de la membrana bacteriana se ensayaron modelos de monocapas de membrana utilizando la balanza Langmuir. En la Figura 7 se muestran las isotermas de presión superficial por área molecular de la monocapa de fosfolípidos en la interfase aire-agua y la subfase conteniendo los compuestos fenólicos individuales y en combinación. La isoterma correspondiente a la mezcla de fosfolípidos (DPPC y DMPG) conteniendo agua pura en la subfase presenta una curva típica mostrando un valor de $100 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ en el cambio de fase de gas a líquido expandido y presenta una pequeña meseta alrededor de $10\text{-}17 \text{ mN/m}$ que representa el cambio de la fase de líquido expandido a líquido condensado.

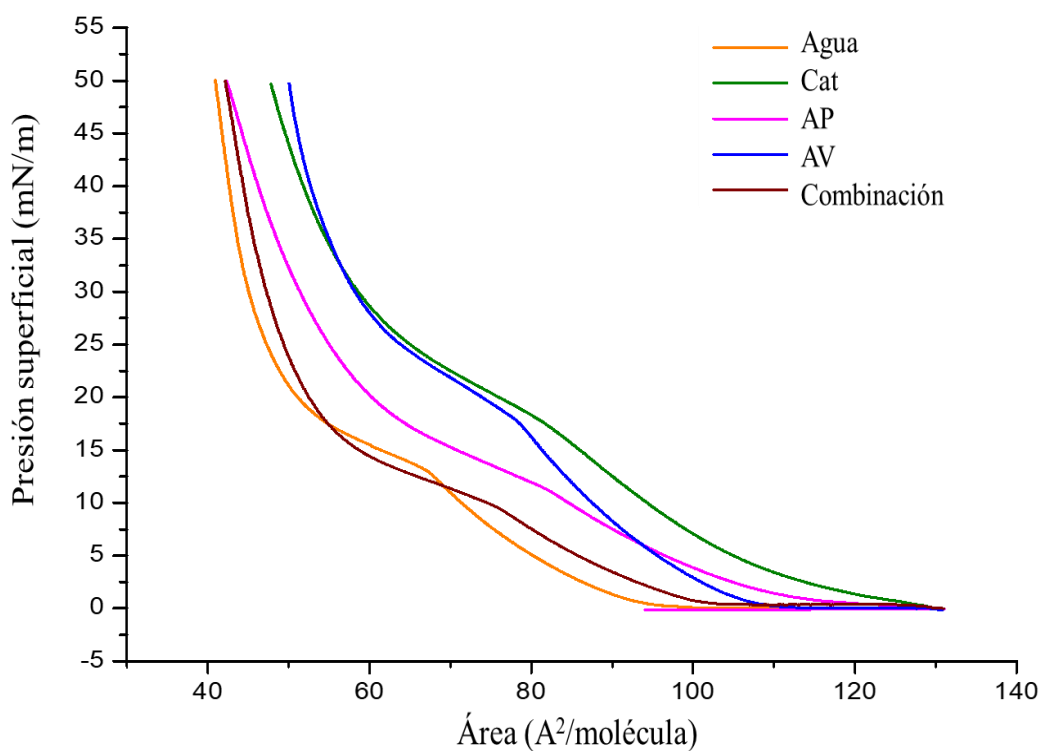


Figura 7. Isotermas de presión superficial por área molecular registrado para las monocapas con subfases conteniendo agua pura con y sin compuestos fenólicos de manera individual y en combinación. AP = ácido protocateico, AV = ácido vanílico, Cat = catequina.

La combinación de compuestos fenólicos causó un comportamiento similar a la isoterma en la que se depositó sólo agua mostrando un valor de cambio de fase a 105 mN/m^2 . La isoterma registrada con subfase en presencia de catequina mostró un aumento del cambio de fase ($128 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$) en comparación con la isoterma de la monocapa tratada sólo con agua ($p \leq 0.05$). Además, esta isoterma de compresión mostró una transición de líquido expandido a líquido condensado entre 12 y 22 mN/m. El ácido protocateico también presentó un aumento del cambio de fase ($124 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$); sin embargo, se pudo observar una forma isotérmica diferente en comparación con los otros compuestos fenólicos. El valor de cambio de fase en la isoterma del ácido vanílico aumentó ($115 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$) en comparación con la isoterma del agua y mostró un comportamiento similar al de la monocapa con la isoterma de la catequina. El aumento en los valores de cambio de fase de gas a líquido expandido significa que el compuesto fenólico expandió la monocapa de lípidos debido a su incorporación entre le membrana del modelo.

Por otra parte, el módulo de compresibilidad frente a la presión superficial se utiliza para caracterizar la elasticidad de las monocapas de fosfolípidos en la interfase aire-agua. Los resultados observados en la Figura 8 muestran el efecto de los compuestos fenólicos sobre la flexibilidad de los modelos de membrana. Específicamente a 30 mN/m , el módulo de compresibilidad (Cs^{-1}) de la mezcla de fosfolípidos con agua pura fue de 127 mN/m ; mientras que cuando los compuestos fenólicos estaban presentes en la subfase este valor disminuyó de 1.4 a 2 veces. Se sabe que los compuestos que interactúan con la monocapa muestran un módulo de compresibilidad más bajo a cualquier presión, lo que sugiere una membrana más fluida. La catequina mostró el mayor efecto en la fluidización del modelo de membrana con un Cs^{-1} de 60 mN/m , seguido por el ácido protocateico (Cs^{-1} de 70 mN/m) y el ácido vanílico (Cs^{-1} de 85 mN/m) ($p \leq 0.05$). La combinación fenólica mostró un Cs^{-1} similar (125 mN/m) en comparación con el agua pura.

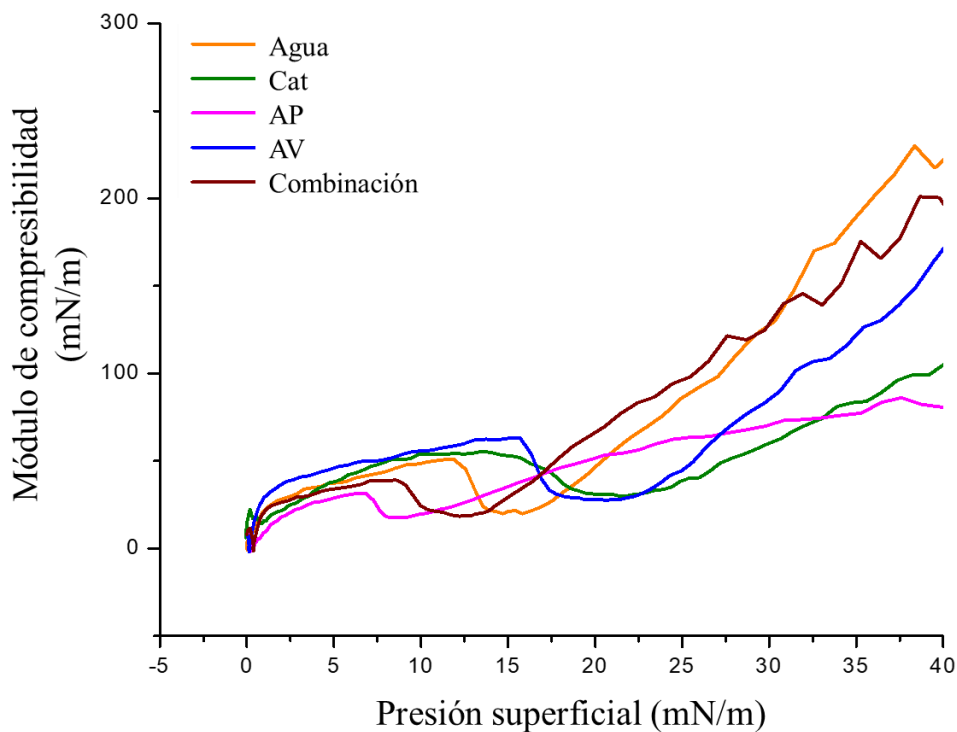


Figura 8. Módulo de compresibilidad (Cs^{-1}) contra presión superficial registrado para las monocapas con subfases conteniendo agua pura con y sin compuestos fenólicos de manera individual y en combinación. AP = ácido protocateico, AV = ácido vanílico, Cat = catequina.

En la Figura 9 se muestra la isoterma de absorción de compuestos fenólicos en la mezcla de fosfolípidos en la interfase aire-agua. Se puede observar una baja estabilidad normal de la monocapa añadida con agua pura. Cuando se emplearon en la subfase los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación se obtuvo un incremento en la presión, lo que sugiere que estos compuestos se absorben en la monocapa y mantienen la estabilidad a lo largo del tiempo.

La posible interacción entre los compuestos fenólicos y la membrana bacteriana se puede evaluar utilizando la balanza de Langmuir para estudiar las propiedades termodinámicas de los modelos de monocapa de fosfolípidos en la interfaz agua-aire. Se sabe que las membranas biológicas son bicapas y son más complejas que estos modelos; sin embargo, teniendo en cuenta que su estudio es difícil, el uso de modelos de monocapa puede ser un enfoque de la superficie externa de las membranas biológicas. Normalmente, una isoterma se obtiene mediante la compresión de la

monocapa que controla la presión de la superficie. Algunas regiones diferentes llamadas fases se pueden observar en la isoterma con la compresión de una monocapa; cuando las moléculas se expanden en la subfase, las monocapas existen en estado gaseoso y cuando se comprimen más, alcanzan una fase de transición al estado líquido expandido. Luego tiene una transición al estado líquido condensado, y en densidades más altas, la monocapa finalmente alcanza el estado sólido. Si la monocapa se comprime después de alcanzar el estado sólido, se colapsará en estructuras tridimensionales. La interacción entre los antimicrobianos y las monocapas influye en la disposición de las moléculas de lípidos y la isoterma de la monocapa.

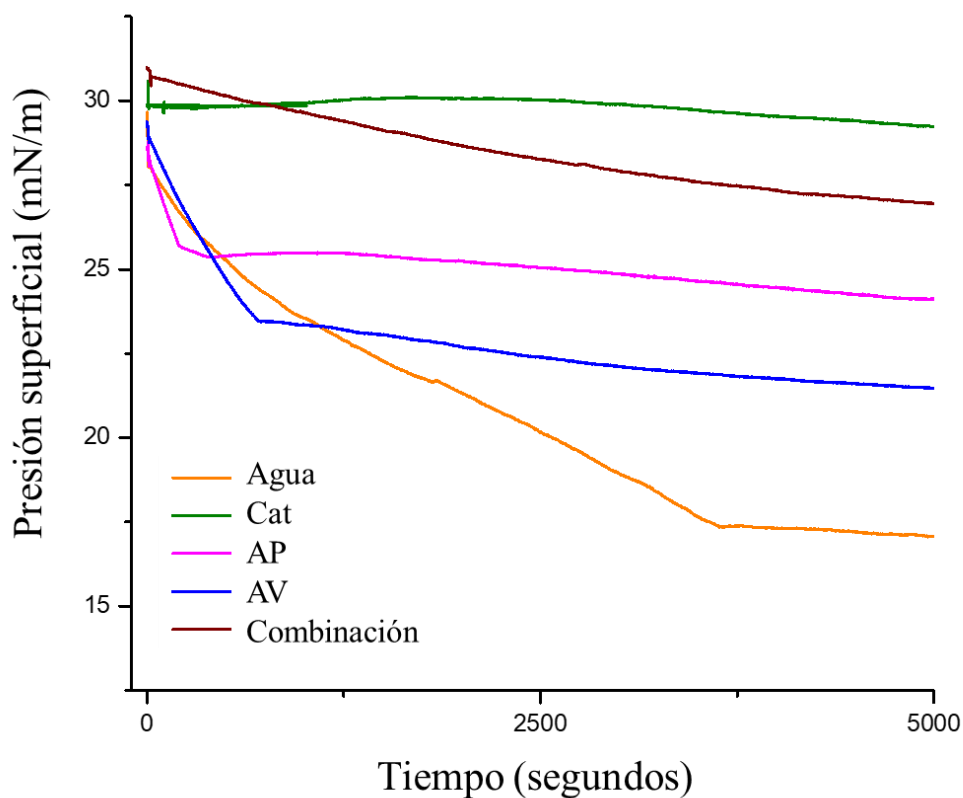


Figura 9. Isothermas de absorción para las monocapas con subfases conteniendo agua pura con y sin compuestos fenólicos de manera individual y en combinación. AP = ácido protocateico, AV = ácido vanílico, Cat = catequina.

Los resultados observados en nuestro trabajo sugieren que la adición de compuestos fenólicos a la subfase alteró la densidad de empaquetamiento de la monocapa de fosfolípidos debido a la expansión observada en las isothermas a áreas más grandes a presiones iniciales. La catequina parece tener el mayor efecto de fluidificación en las monocapas, seguida de los ácidos protocateico y vanílico, debido al mayor valor de cambio de fase obtenido. Esto sugiere que la catequina está interactuando con los fosfolípidos y se encuentra una mayor área entre las moléculas de fosfolípidos expandiendo la monocapa a presiones más altas. Además, la adición de compuestos antibacterianos a la subfase reflejó los defectos de las propiedades viscoelásticas de la monocapa de fosfolípidos debido a un cambio en la efectividad del empaquetamiento molecular, la alteración del área molecular y un aumento en la fluidez de la membrana modelo (Nowotarska et al., 2014). Estos efectos podrían explicarse por las interacciones entre los grupos hidroxilo de la catequina y el grupo de la cabeza polar de los fosfolípidos a través de los enlaces de hidrógeno que permitieron la incorporación de compuestos fenólicos en las monocapas. Además, el grupo carboxílico de los ácidos fenólicos a pH fisiológico puede disociarse, y estas cargas negativas pueden causar repulsión con las cargas negativas de los fosfolípidos DMPG y DPPC, causando la expansión de la monocapa. Estudios anteriores han informado que la incorporación de compuestos fenólicos, como el timol, penetró en monocapas de fosfatidilcolina a altos valores iniciales de presiones superficiales (Ferreira et al., 2016). Además, el ácido rosmarínico y la quercetina interactuaron con los grupos de la cabeza polar de los lípidos en la interfase agua-lípido. Se ha informado que la interacción entre algunos flavonoides y membranas puede depender de la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los flavonoides y los grupos de la cabeza polar de los fosfolípidos (Fadel et al., 2011; Movileanu et al., 2000).

El ensayo de internalización de cristal violeta indicó que la catequina aumentó la permeabilidad de la membrana en mayor medida que los otros dos compuestos, lo cual fue en concordancia con los resultados obtenidos con la balanza de Langmuir. En contraste con nuestros resultados, se sugirió que el aumento en el número y la disponibilidad de grupos hidroxilo moleculares podría disminuir las interacciones con los lípidos de la membrana y, en ocasiones, también disminuir la eficacia antibacteriana (Wu et al., 2013). Por otro lado, también se ha informado que los grupos -OH, específicamente el -OH del carbono en la posición 3 del anillo C del flavonoide, le dan a la catequina una alta actividad antibacteriana que puede interactuar con las proteínas de la membrana, aumentando la rigidez y conduciendo a una pérdida de la estructura y función (Wu et al., 2013).

Asahi et al. (2014) reportaron que la epigallocatequina, en concentraciones inhibitorias, dañó indirectamente la membrana citoplásmica, posiblemente causada por la producción celular de peróxido de hidrógeno, que es un conocido oxidante lipídico, también este efecto se relacionó con una disminución en los factores de virulencia y la producción de biopelículas. La catequina en la combinación sinérgica podría contribuir al daño de la membrana, pero las dosis bajas que se utilizaron no fueron efectivas como antibacterianas y sólo ayudaron a potenciar los efectos del ácido vanílico y del ácido protocateico. Según nuestros resultados, la catequina al afectar la membrana bacteriana podría inhibir la formación de biopelículas al interferir con la adhesión inicial.

6.3. Efecto de la Combinación de Ácido Protocateico, Ácido Vanílico y Catequina sobre la Motilidad y Adhesión de *E. coli* Uropatógena.

En esta etapa se describen los resultados acerca del efecto de los compuestos fenólicos sobre factores como la motilidad, la carga superficial, la energía superficial y la presencia de fimbria curli que favorecen la adhesión bacteriana para formar las biopelículas en superficies de silicona.

La primera etapa para la formación de biopelícula es la adhesión la cual es favorecida por la motilidad de la bacteria que le permite a travesar el medio y llegar al sitio donde formará la biopelícula. En este sentido, la Figura 10 muestra el efecto de los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación sobre la motilidad de la bacteria uropatógena incubada a 37 °C durante 24 h. Las bacterias testigo presentaron un halo de motilidad *swimming* de 69.1 mm, mientras que la bacteria expuesta a la combinación de compuestos fenólicos presentó el menor halo de inhibición (34.3 mm) en comparación con el testigo y los efectos individuales ($p \leq 0.05$). De manera individual, el ácido protocateico a 6.5 mM redujo el 35% de motilidad, el ácido vanílico a 3 y a 6 mM redujo el 21% y el 100% de la motilidad bacteriana, y la catequina a 7 mM no disminuyó este factor de virulencia en comparación con la bacteria testigo ($p \leq 0.05$).

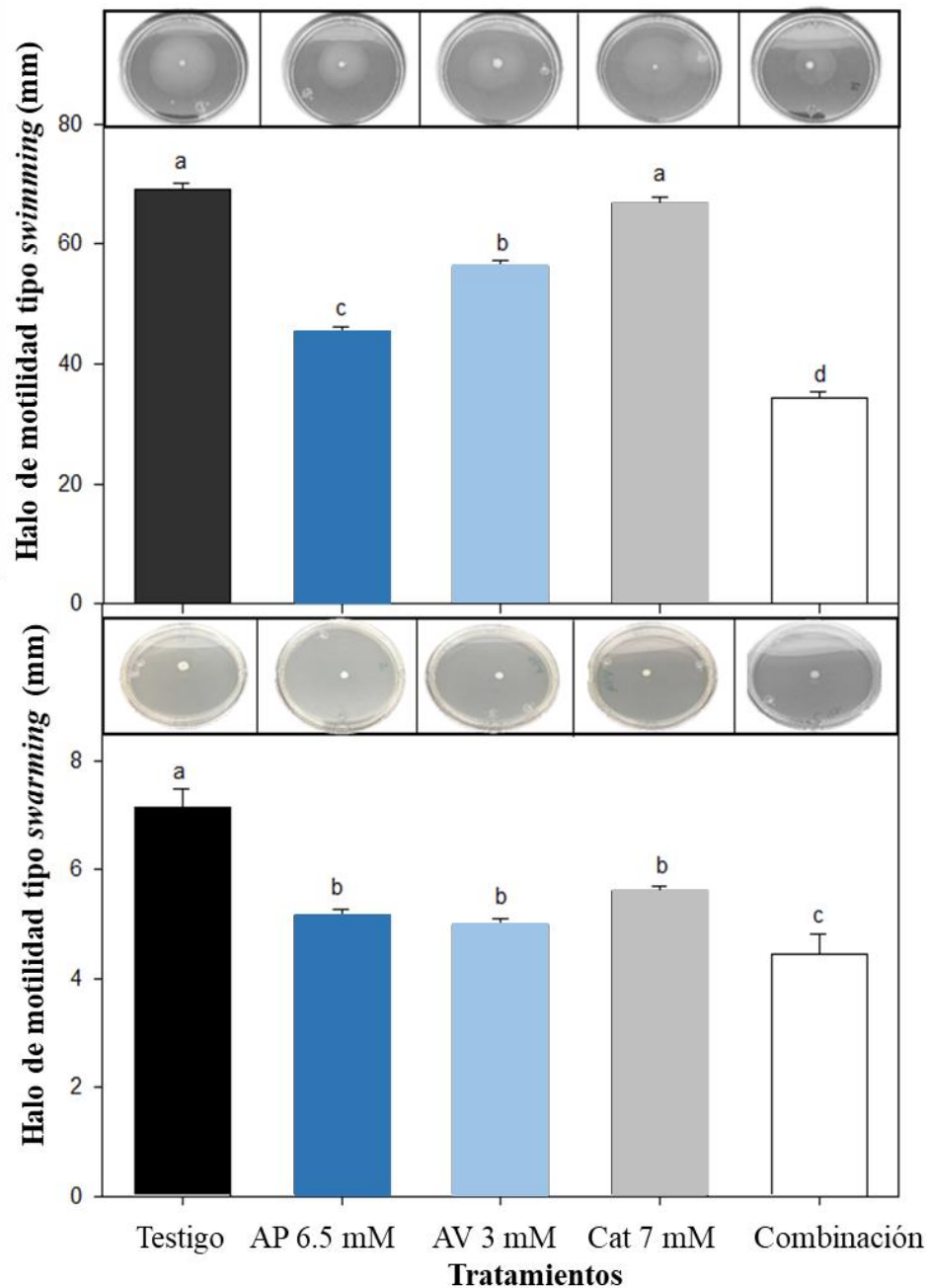


Figura 10. Motilidad tipo *swimming* y *swarming* de *E. coli* uropatógena expuesta a compuestos fenólicos de manera individual y su combinación a 37°C durante 24 h. Valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). AP = ácido protocateico, AV = ácido vanílico, Cat = catequina.

En la Figura 10 también se muestra el efecto de los compuestos fenólicos sobre la motilidad tipo *swarming* de *E. coli* uropatógena. Las bacterias expuestas a los compuestos fenólicos mostraron menores halos de inhibición que la bacteria testigo que presentó un halo de motilidad de 7.13 mm ($p \leq 0.05$). El ácido protocateico a 6.5 mM logró reducir 1.06 mm de motilidad comparado con la bacteria testigo, mientras que el ácido vanílico a 3 mM redujo 1.18 mm y la catequina a 7 mM redujo 1.03 mm. De estos, el ácido vanílico fue más efectivo que los otros compuestos ya que se utilizaron dosis menores para obtener resultados similares. La combinación de los compuestos fenólicos redujo en un 27% el halo de motilidad tipo *swarming* en comparación con el control, siendo el tratamiento más efectivo ($p \leq 0.05$).

Las propiedades de la superficie de la bacteria como la carga superficial son importantes para la adhesión inicial y el desarrollo de biopelículas. En este sentido, se evaluaron los valores de potencial zeta de *E. coli* uropatógena expuesta a compuestos fenólicos de manera individual y en combinación (Cuadro 5). La adición de compuestos fenólicos disminuyó la carga negativa exhibida por las bacterias testigo ($p \leq 0.05$). Aunque no hubo diferencia significativa entre algunos tratamientos, se puede enfatizar que la combinación fenólica generó la mayor disminución en los valores de potencial zeta a dosis más bajas; observando un valor de -29.56 mV para la bacteria expuesta a la combinación y -37.16 mV para la bacteria testigo. Entre los compuestos individuales, el ácido protocateico a 6.5 mM y el ácido vanílico a 6 mM no mostraron diferencia significativa entre ellos; sin embargo, el ácido protocateico disminuyó ligeramente más la carga superficial que los demás compuestos fenólicos.

En el Cuadro 5 se muestran los valores de energía superficial de *E. coli* uropatógena expuesta a los compuestos fenólicos. La bacteria sin exposición a los tratamientos (testigo) presentó un valor de 31.45 mJ/m² que indica que la superficie tiende a ser hidrofílica.

Por su parte, la exposición de las bacterias a la combinación (48.40 mJ/m²), ácido protocateico (43.69 mJ/m²), catequina (40.74 mJ/m²) y ácido vanílico (37.54 mJ/m²) ($p \leq 0.05$) aumentó la energía superficial indicando que la superficie se volvió más hidrofílica comparado con la bacteria sin tratamiento.

Cuadro 5. Efecto de los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación sobre la carga superficial y energía superficial de *E. coli* uropatógena.

| Compuestos fenólicos | mM | Carga superficial (mV) | Energía superficial (mJ/m ²) |
|-------------------------|---|----------------------------|--|
| Control | 0 | -37.16 ± 1.0 ^a | 31.45 ± 1.32 ^a |
| Combinación | 1.62 mM (AP) + 0.74 mM (AV) + 0.05 mM (Cat) | -29.56 ± 1.11 ^b | 48.40 ± 3.59 ^c |
| Ácido protocateico (AP) | 6.5 | -29.73 ± 1.40 ^b | 43.69 ± 2.55 ^b |
| Ácido vanílico (AV) | 6 | -29.96 ± 2.25 ^b | 37.54 ± 4.47 ^b |
| Catequina (Cat) | 7 | -35.2 ± 0.2 ^c | 40.74 ± 1.93 ^b |

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Diferentes letras significan una diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

Otro factor virulencia que favorece la adhesión bacteriana es la fimbria curli debido a que promueve interacciones célula-célula y célula-superficie. En el Cuadro 6 se muestra el efecto de los compuestos fenólicos sobre la fimbria curli de *E. coli* uropatógena evaluada a 28°C. Las bacterias testigo generaron microcolonias teñidas de rojo intenso mediante la exposición al colorante rojo de Congo, lo que indica interacción de la fimbria curli con el colorante. Las bacterias tratadas con los tres compuestos fenólicos de manera individual y en combinación produjeron colonias blanquecinas debido a la falta de interacción de la fimbria curli con el tinte rojo de Congo, lo que pudiera indicar una alteración en la síntesis de la fimbria curli o afectación directa con este factor de virulencia. A pesar de que los compuestos individuales inhibieron la fimbria curli, la combinación fenólica fue más efectiva ya que las concentraciones individuales fueron reducidas desde 6.8 a 280 veces para obtener el mismo resultado. Tomando en cuenta el efecto de los compuestos individuales puede destacarse que el ácido vanílico en dosis menores (6 mM) que el ácido protocateico (6.5 mM) y la catequina (7 mM) afectó la fimbria curli en la misma medida. Son diversos los mecanismos por los cuales se puede reducir la formación de biopelículas bacterianas y un punto de control podría ser la motilidad.

Cuadro 6. Efecto de compuestos fenólicos en la producción de fimbria curli de *E. coli* uropatógena

| Compuestos fenólicos | Mm | Presencia (+) / Ausencia (-) |
|-------------------------|--|------------------------------|
| Control | 0 | + |
| Ácido protocateico (AP) | 6.5 | + |
| Ácido vanílico (AV) | 6 | + |
| Catequina (Cat) | 7 | + |
| Combinación | 1.62 mM (AP) + 0.74 mM (AV) + 0.05 mM (Cat) | + |

Estudios previos han reportado la efectividad de compuestos fenólicos para inhibir la motilidad de bacterias patógenas; por ejemplo, el ácido gálico y el ácido ferúlico inhibieron la motilidad de *L. monocytogenes* en un 70.5% y 100%, respectivamente, en comparación con el control (Borges et al., 2012). También, Lemos et al. (2014) informaron que el ácido ferúlico a la concentración de 1 mg/mL inhibió la motilidad de *B. cereus* y *P. fluorescens* en ≈ 92 y 96%, respectivamente. El mecanismo exacto por el cual los compuestos fenólicos afectan la motilidad bacteriana sigue siendo desconocido. Este modo de acción puede estar relacionado con una disminución de la expresión de los genes implicados en la síntesis flagelar o la interferencia directa con flagelos. Hidalgo et al. (2011) mostraron que las proantocianidinas, compuestos fenólicos complejos, redujeron la motilidad tipo swimming y swarming de *E. coli* CFT073 uropatógena debido a la inhibición de la expresión del gen de la flagelina (*fliC*), un polipéptido que forma el flagelo, afectando su síntesis. Además, se ha reportado que la curcumina, otro compuesto fenólico, afectó la motilidad bacteriana debido a un acortamiento en la longitud del filamento flagelar y disminución de su densidad y del número de bacterias flageladas. Estos efectos se atribuyeron a un efecto postraduccional de la unión de la curcumina mediante enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del aspartato, glutamina, asparagina y residuos de serina del filamento flagelar, haciéndolo más frágil y rompiéndolo en fragmentos más pequeños (Marathe et al. 2016).

La carga superficial de las células bacterianas proporciona información acerca de las posibles interacciones electrostáticas repulsivas/attractivas entre la célula y las superficies de silicona. Por lo tanto, los cambios en la superficie bacteriana podrían afectar su adhesión. Generalmente, bajo condiciones fisiológicas, estas bacterias presentan cargas superficiales negativas debido a los componentes tales como lipopolisacáridos presentes en el exterior de la membrana de Gram-

negativas (Lemos et al., 2014). La exposición a los compuestos fenólicos disminuyó el valor negativo del potencial zeta posiblemente debido a una interacción con los grupos que le confieren cargas negativas a la bacteria como el grupo carboxílico de los lipopolisacáridos. Por otra parte, se ha sugerido que la silicona presenta cargas negativas, lo que ocasionaría una disminución en las fuerzas de repulsión entre la bacteria y la superficie favoreciendo el proceso de adhesión (Hui & Dykes, 2012). Sin embargo, es importante resaltar que este tipo de adhesión reversible es casi instantánea y la adhesión también se ve favorecida por la presencia de SPE y organelos extracelulares como fimbrias y flagelos que podrían tener una mayor influencia en la adhesión.

El grado de hidrofobicidad de la bacteria también influye en el proceso de adhesión bacteriana. Bacterias más hidrofóbicas tienden a colonizar en mayor medida superficies hidrofóbicas como la silicona. En este sentido, los compuestos fenólicos individuales y en combinación aumentaron el grado hidrofílico de la bacteria sugiriendo una posible disminución en la adhesión. La hidrofobicidad está relacionada con la presencia de apéndices extracelulares como fimbrias, pilis y flagelos y por lo tanto un menor grado de hidrofobicidad causado por los compuestos fenólicos podría deberse a interferencia con alguno de estos organelos (Suwalak & Voravuthikunchai, 2009). Anteriormente, se ha informado que los compuestos fenólicos afectan las superficies bacterianas. Borges et al. (2012) informaron que los ácidos ferúlico y gálico cambiaron la carga superficial de *E. coli* y *P. aeruginosa* a valores menos negativos en comparación con las bacterias testigo. Estos podrían atribuirse a una alteración de los componentes de la superficie, como las adhesinas, pili y flagelos, que podrían ofrecer una alta hidrofobicidad a la bacteria como en el caso de taninos en superficies de *E. coli* (Suwalak & Voravuthikunchai, 2009). Así mismo, extractos de plantas medicinales como *Galium odoratum* y *Urtica dioica* a concentraciones de 15 y 20 mg/mL modificaron la superficie de *E. coli* uropatógena haciéndola más hidrofílica (Wojnicz et al., 2012a). Estos autores sugieren que la naturaleza superficial de las células hidrofílicas impide la colonización de los tejidos del huésped y de las superficies abióticas. Este efecto se atribuyó a la composición fenólica principalmente a kaempferol, quercetina, rutina, ácido cumárico y ácido protocateico. El mecanismo exacto por el cual los compuestos fenólicos modifican la superficie no está totalmente esclarecido.

Dentro de las estrategias para evitar la adhesión bacteriana y como consiguiente la formación de biopelícula es inhibir la síntesis de fimbrias. Algunos compuestos fenólicos como el galato de epigallocatequina han demostrado ser efectivos para reducir la formación de biopelícula de *E. coli*

uropatógena interfiriendo directamente con el ensamblaje de subunidades de fibras amiloides curli reduciendo la expresión de CsgD - un activador crucial de curli (Serra et al., 2016). En otro estudio, el flavonoide miricetina y derivados de éste como galato de epigallocatequina inhibieron la formación de biopelícula dependiente de curli en *E. coli* K12. Utilizando microscopio electrónico de transmisión y análisis de inmunotransferencia demostraron que este compuesto previene la síntesis de fimbria curli al suprimir la expresión de proteínas relacionadas con esta fimbria; mientras que el análisis de PCR-cuantitativa en tiempo real demostró que la presencia de este compuesto redujo los transcritos de *csgA*, *csgB* y *csgD*. Además, el nivel de RpoS, un factor sigma de fase estacionaria, se redujo en presencia del compuesto, mientras que el transcrito de *rpoS* no se afectó. Esto debido a que el compuesto aceleró la degradación de RpoS por la proteasa dependiente de ATP ClpXP en combinación con su adaptador RssB afectando la síntesis de curli (Arita-Morioka et al., 2018).

6.4. Efecto de la Combinación de Catequina, Ácido Protocateico y Ácido Vanílico sobre la Formación de Biopelículas de *E. coli* Uropatógena en Catéteres de Silicona.

Primeramente, se caracterizó la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en superficies de silicona con la finalidad de establecer la cantidad de inóculo y el tiempo de incubación que se emplearían y posteriormente evaluar el efecto de los compuestos fenólicos sobre dicho proceso. En la Figura 11 se muestra el comportamiento de la adhesión bacteriana a los fragmentos de catéteres durante 72 h en medio LB a 37°C. Se puede observar que no hay adhesión bacteriana en las primeras horas y es hasta la cuarta hora cuando comienza la adhesión. Entre las 4 h y 12 h incrementa la densidad celular adherida a los catéteres y se observa un mayor incremento de las 12 h a las 24 h. Posterior a las 24 h, ocurre una disminución gradual de la densidad celular hasta las 72 h.

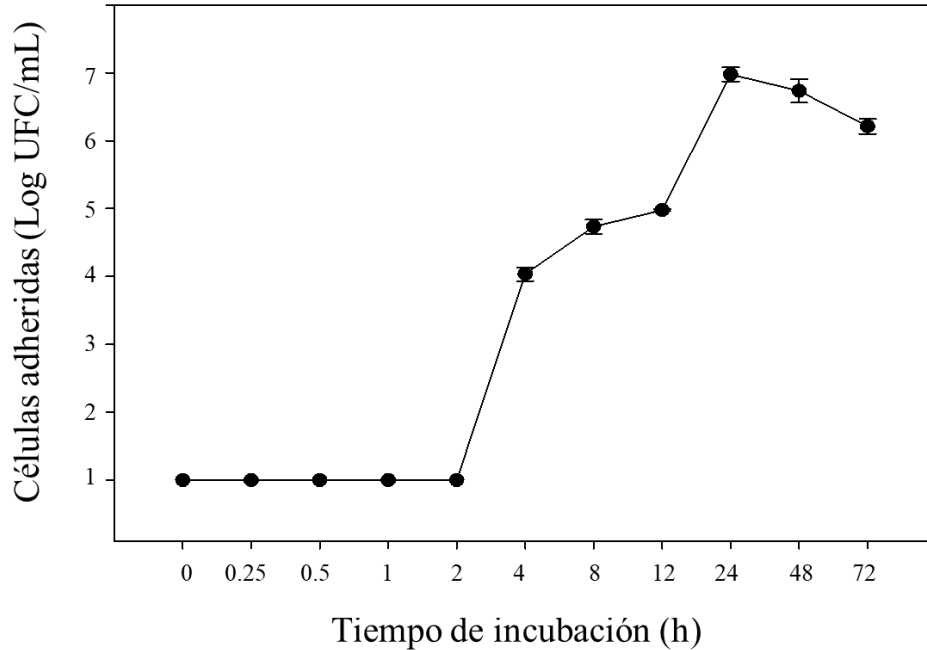


Figura 11. Adhesión de *E. coli* uropatógena en catéteres de silicona por 24 h a 37°C. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. El inóculo inicial agregado al sistema fue de 3 Log UFC/mL

La caracterización de la formación de biopelículas es importante para comprender el comportamiento de las bacterias y los cambios en la densidad celular durante el tiempo que se desarrollan las biopelículas; además el estudio de los factores que contribuyen a la formación de biopelículas puede ser importante para concebir nuevas soluciones terapéuticas para tratar estas infecciones. Se ha demostrado que en algunas situaciones clínicas las biopelículas de *E. coli* se encuentran completamente maduras después de 24 h y con una mayor densidad celular a ese tiempo, igual que en nuestro estudio. Gomes et al. (2015) informaron que *E. coli* JM109 formó una biopelícula madura en superficies de silicona a las 24 h con una densidad celular de 8 células logarítmicas totales/cm², siendo mayor que la densidad celular encontrada al mismo tiempo en nuestro estudio. Por el contrario, Cerqueira et al. (2013) encontraron una densidad celular de 6.9 log UFC/cm² de *E. coli* cepa 434 adherida a superficies de silicona en presencia de orina artificial después de 48 h. Esta cantidad de densidad celular se encontró a las 24 h en nuestro estudio, lo que indica que diferentes cepas de *E. coli* y el medio en el que se encuentre influyen en el proceso de

formación de biopelícula. Por otro lado, Gomes et al. (2015) evaluaron la formación de biopelículas de *E. coli* en diferentes materiales, obteniendo una mayor densidad celular en superficies de silicona en comparación con el vidrio y el cloruro de polivinilo. Esta adhesión bacteriana se relacionó con el carácter hidrofóbico de las superficies encontrando que a mayor hidrofobicidad del material mayor adhesión como en el caso de la silicona.

En la Figura 12 se observa la actividad de diferentes dosis de los compuestos fenólicos utilizados de manera individual contra células de *E. coli* uropatógena adheridas a catéteres de silicona durante 24 h a 37°C. Los resultados indican que los compuestos fenólicos a determinada concentración pueden inhibir la adhesión celular sin afectar considerablemente la viabilidad del inóculo planctónico. Es importante considerar las células planctónicas en el medio, debido a que son éstas las que van agregándose en el catéter para formar las biopelículas, por lo que una reducción en el inóculo resultaría obvia en una reducción de biopelículas. El ácido protocateico redujo ligeramente la densidad celular en la biopelícula adherida a concentraciones de 3.24 a 7.78 mM en comparación con la bacteria sin exposición al tratamiento (Figura 12A). Sin embargo, la adhesión bacteriana se inhibió por completo a concentraciones superiores a 11.03 mM y esta concentración no afectó más del 35% de viabilidad de células planctónicas por lo que se seleccionó como la CMIB del ácido protocateico ($p \leq 0.05$). Se observaron resultados similares utilizando el ácido vanílico (Figura 12B); su CMIB fue de 7.13 mM y sólo afectó el 40% de células planctónicas, mientras que concentraciones mayores inhibieron las células adheridas al catéter debido a la muerte de las bacterias en la suspensión ($p \leq 0.05$). La catequina redujo las células adheridas al catéter en una manera dosis – dependiente; sin embargo, su CMIB no se pudo determinar a las dosis evaluadas. Además, las células planctónicas ligeramente fueron afectadas por catequina a 68.90 mM, sugiriendo que este compuesto no tiene efecto bactericida, pero puede reducir la adhesión a las superficies de silicona. Además, se evaluó el efecto de la nitrofurantoína sobre la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena para poder comparar su efectividad con la de los compuestos fenólicos. El antibiótico a una concentración de 0.4 mM inhibió la formación de la biopelícula como consecuencia de la muerte celular planctónica (Figura 12D) ($p \leq 0.05$).

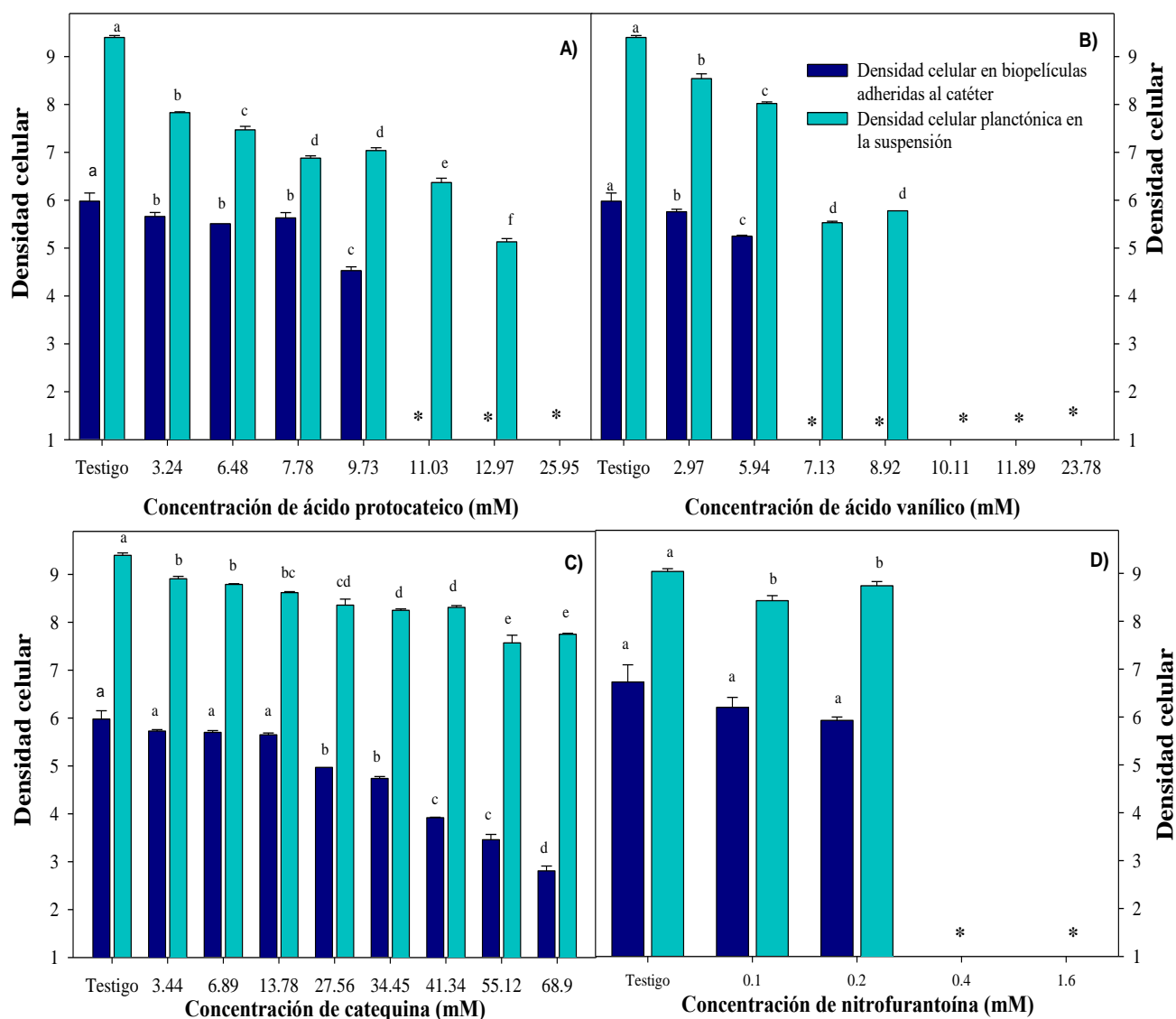


Figura 12. Efecto de A) Ácido protocateico, B) Ácido vanílico, C) Catequina y D) Nitrofurantoina en la densidad celular de biopelículas de *E. coli* uropatógena adheridas a catéteres de silicona (Log UFC/cm²) y células planctónicas (Log CFU/mL) por 24 h a 37°C. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). *Valores menores del nivel de detección (1.3 Log UFC/cm²).

Para determinar si la combinación de los compuestos fenólicos era más efectiva que los compuestos utilizados de manera individual para inhibir la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena, se elaboraron mezclas con diferentes proporciones de ácido protocateico, ácido vanílico y

catequina. El Cuadro 7 muestra el efecto de algunas de las combinaciones evaluadas, aunque sólo tres mezclas fueron efectivas para evitar la adhesión bacteriana a superficies de silicona sin inhibir completamente la viabilidad de células planctónicas. De estas tres combinaciones, la combinación de 1.62 mM de ácido protocateico + 0.74 mM de ácido vanílico + 0.05 mM de catequina mostró un efecto sinérgico con un valor de Σ CIF de 0.25. Con esta combinación se redujeron las concentraciones efectivas de cada compuesto de manera individual desde 6.89 veces para el ácido protocateico, 9.63 veces para el ácido vanílico y hasta 1398 veces para catequina para reducir la adhesión *E. coli* uropatógena.

Cuadro 7. Efecto de la combinación de compuestos de fenólicos en células planctónicas y biopelículas de *E. coli* uropatógena en superficies de silicona (24 h a 37°C).

| Combinación (mM) | | | Log UFC/cm ² | Log UFC/mL | Σ CIF | Efecto de la combinación |
|------------------|--------------|-----------|-------------------------|----------------------|--------------|--------------------------|
| Ác. Protocateico | Ác. Vanílico | Catequina | Células adheridas | Células planctónicas | | |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.96 ± 0.1 | 8.76 ± 0.01 | | |
| 2.75 | 1.48 | 13.78 | 4.23 ± 0.0 | 8.59 ± 0.09 | 0.62 | Aditivo |
| 5.51 | 1.48 | 13.78 | 3.68 ± 0.17 | 8.47 ± 0.07 | 0.87 | Aditivo |
| 2.75 | 3.56 | 13.78 | 5.14 ± 0.04 | 8.35 ± 0.05 | 0.95 | Aditivo |
| 5.51 | 3.56 | 13.78 | 2.35 ± 0.05 | 3.08 ± 0.01 | 1.20 | Indiferente |
| 1.62 | 0.74 | 0.05 | * | 8.78 ± 0.06 | 0.25 | Sinérgico |
| 3.20 | 2.97 | 1.72 | 3.3 ± 0.13 | 8.71 ± 0.06 | 0.74 | Aditivo |
| 6.48 | 2.97 | 3.44 | 4.41 ± 0.06 | 7.03 ± 0.01 | 1.05 | Indiferente |
| 1.62 | 5.94 | 3.44 | * | 6.37 ± 0.02 | 1.18 | Indiferente |
| 3.24 | 2.97 | 0.0 | 5.95 ± 0.07 | 8.86 ± 0.04 | 0.71 | Aditivo |
| 2.75 | 5.94 | 0.0 | * | 7.02 ± 0.03 | 1.08 | Indiferente |
| 6.48 | 2.97 | 0.0 | 3.35 ± 0.1 | 8.02 ± 0.15 | 0.88 | Aditivo |
| 0.0 | 5.94 | 3.44 | 5.6 ± 0.1 | 8.14 ± 0.06 | 1.00 | Indiferente |

* Valor por debajo de los límites de detección (1.3 Log UFC/cm²). Los valores se expresan como la media ± desviación estándar.

Con la finalidad de establecer el efecto de cada compuesto fenólico y su combinación para reducir la adhesión de *E. coli* uropatógena en superficies de silicona a través del tiempo, se utilizaron dosis sub-inhedoras para no afectar la viabilidad celular. En la Figura 13 se muestra el efecto de la mitad de la CMI de cada compuesto de manera individual y la combinación sobre la formación de biopelícula durante 24 h a 37°C. En todos los tratamientos la bacteria comienza a adherirse a partir de las 4 h y la carga bacteriana incrementa a través del tiempo alcanzando la densidad máxima a las 24 h ($p \leq 0.05$). La combinación de los compuestos fenólicos fue más efectiva para reducir el desarrollo de la biopelícula en comparación con los compuestos individuales ($p \leq 0.05$). Comparado con el control, la combinación redujo 2.03 log CFU/cm² de células adheridas a las 8 h, 1.13 log CFU/cm² a las 12 h y 1.0 log CFU/cm² a las 24 h. Mientras que, de los compuestos fenólicos de manera individual, el ácido vanílico fue el más efectivo para reducir la formación de biopelícula logrando una reducción de 0.54 log UFC/cm² a las 24 h, seguido de ácido protocateico y catequina que redujeron 0.47 log UFC/cm².

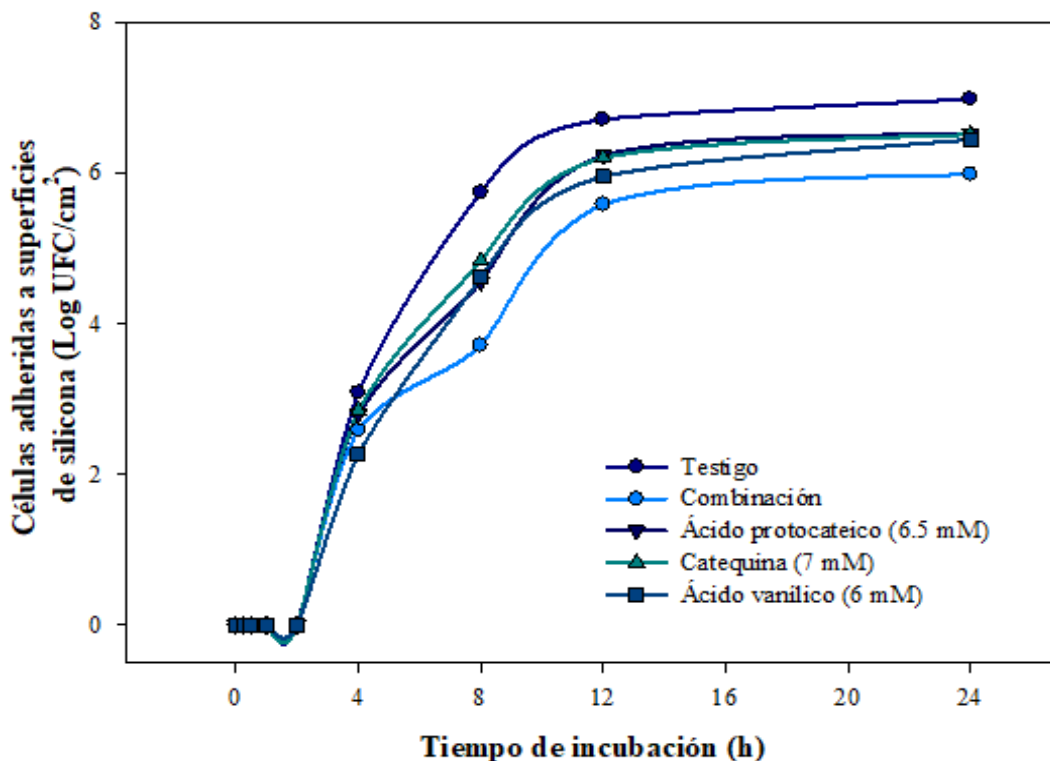


Figura 13. Efecto de concentraciones sub-inhedoras de compuestos fenólicos de manera individual y en combinación (1.62 mM ácido protocateico + 0.74 mM ácido vanílico + 0.05 mM catequina) sobre la densidad celular de *E. coli* uropatógena durante la formación de biopelículas en superficies de silicona incubadas a 37°C durante 24 h.

Mediante microscopía por contraste de fase se observó la capacidad de los agentes antibacterianos utilizados de manera individual y en combinación para inhibir la adhesión de *E. coli* uropatógena en superficies de poliestireno (Figura 14). Las biopelículas sin exposición a los compuestos fenólicos mostraron una mayor densidad celular a las 2 h y 24 h de incubación observado mediante una mayor aglomeración de colorante comparado con el resto de los tratamientos. Además, las biopelículas de la bacteria testigo parecen más densas con una forma de estructura tipo red (Figura 14A). Por su parte, los compuestos fenólicos causaron una posible alteración de la compleja disposición espacial de las biopelículas, tal como se puede observar con la pérdida de la estructura tipo red y una menor tinción de la biomasa. En las biopelículas formadas con la exposición de la combinación de los compuestos fenólicos se observó la menor densidad celular (Figura 14B); mientras que, de los compuestos individuales, los ácidos fenólicos presentaron menor tinción de biomasa seguido del flavonoide (Figura 14C-E).

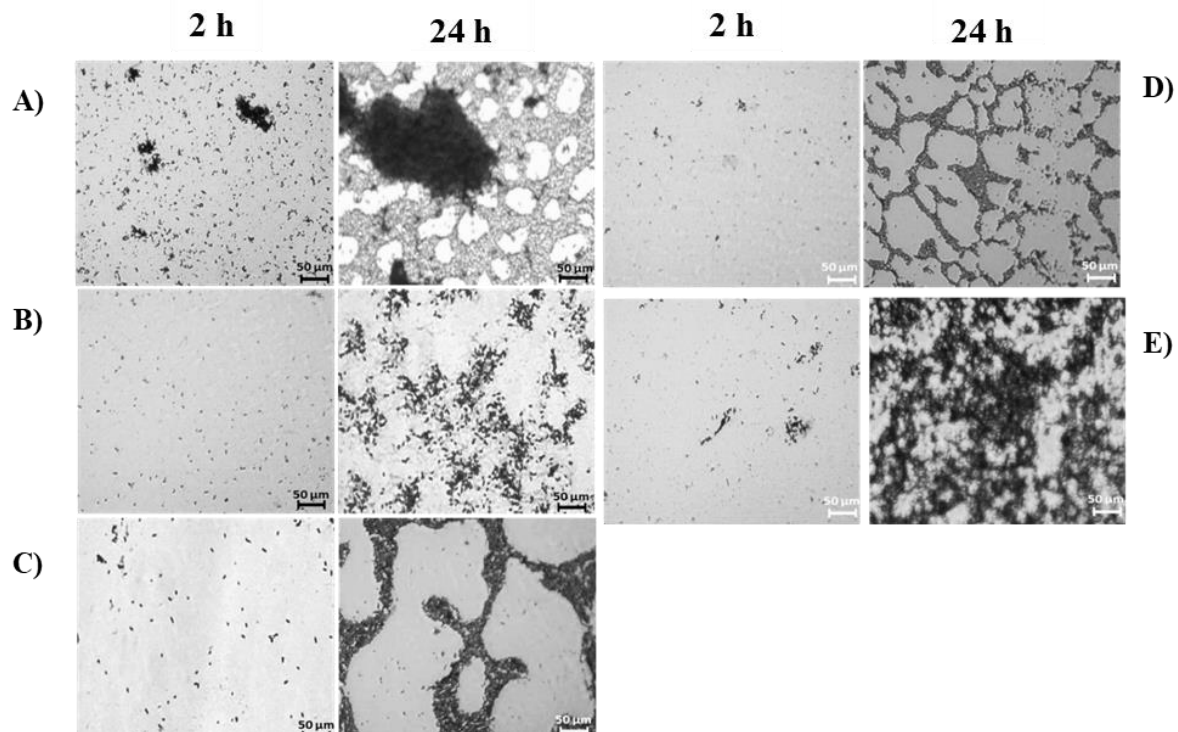


Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de biopelículas de *E. coli* uropatógena sin tratar (A) y expuestas a la combinación (1.62 mM AP + 0.74 mM AV + 0.05 mM Cat) (B), ácido protocateico (AP, 6.5 mM) (C), ácido vanílico (AV, 6 mM) (D) y catequina (Cat, 7 mM) (E) en superficies de poliestireno incubadas a 37°C durante 2 y 24 h. Las biopelículas se tiñeron con cristal violeta y se observó una morfología con un aumento de 600x en un microscopio Axio-Vert (Carl Zeiss).

Las SPE forman parte de la arquitectura y estructura de las biopelículas bacterianas y favorecen la resistencia frente a antimicrobianos. En este sentido, se evaluó el efecto de los compuestos fenólicos de manera individual y en combinación sobre el contenido de las SPE de biopelículas de *E. coli* uropatógena formadas durante 24 h a 37°C (Figura 15). Las biopelículas testigo presentaron una composición de 8.14 µg EG/cm² de carbohidratos y 6.36 µg EA/cm² de proteínas, observando una cantidad similar entre ambos componentes. Los compuestos fenólicos redujeron el contenido de SPE ($p \leq 0.05$), siendo la combinación la que produjo la mayor reducción en el contenido de proteínas (2.34 µg de EA/cm²) y carbohidratos (1.92 µg de GE/cm²) comparado con la bacteria testigo y los compuestos individuales ($p \leq 0.05$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre el efecto de los compuestos fenólicos de manera individual; sin embargo, el efecto del ácido vanílico se obtuvo utilizando dosis más bajas en comparación con los otros compuestos.

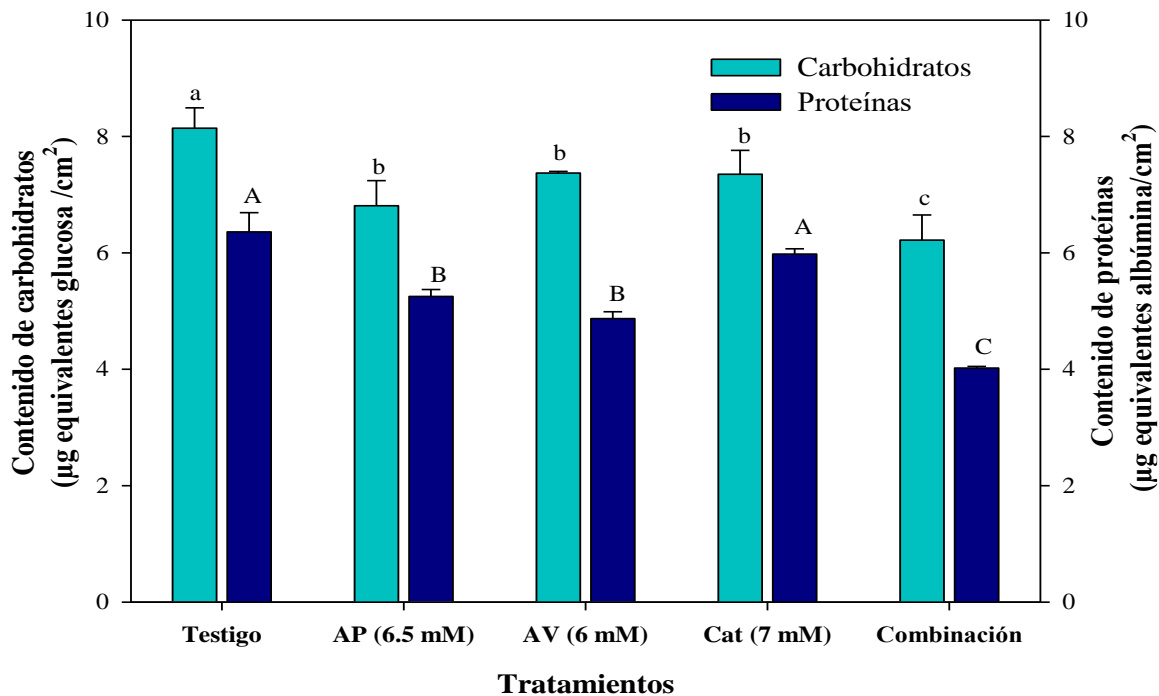


Figura 15. Contenido de sustancias poliméricas extracelulares en biopelículas de *E. coli* uropatógena expuestas al ácido protocateico (PA), ácido vanílico (VA), catequina (Cat) y su combinación (1.62 mM (PA), 0.74 mM (VA) y 0.05 mM (Cat)) a 37°C durante 24 h. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas significan una diferencia significativa en el contenido de carbohidratos y diferentes letras mayúsculas significan una diferencia significativa en el contenido de proteínas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

El sistema de comunicación intercelular regula importantes procesos bacterianos como la formación de biopelículas. En este sentido, se evaluó la interferencia que causan los compuestos fenólicos con el sistema de comunicación intercelular de una bacteria modelo biosensora, la cual produce bioluminiscencia en función de la presencia de AI-2 de otra bacteria. Estos resultados pueden ser asociados con la reducción en la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena. En este ensayo se muestra de manera indirecta la reducción de la concentración de AI-2 extracelular en el sobrenadante de los cultivos de *E. coli* uropatógena expuesta a concentraciones sub-inhedoras de los compuestos fenólicos individuales y en combinación. En la Figura 16 se muestra la inducción de bioluminiscencia de *V. harveyi* BB70 ocasionada por la bacteria testigo; se observa un incremento de la bioluminiscencia a través de 7 h de incubación, obteniendo el máximo al finalizar este tiempo. Los compuestos fenólicos individuales a la mitad de la CMI disminuyeron la inducción de bioluminiscencia de *V. harveyi* BB170 en comparación con la bacteria testigo. Los ácidos protocateico y vanílico mostraron un comportamiento similar con una reducción promedio a través del tiempo de 13 y 12%, respectivamente en comparación con la bacteria testigo; mientras que la catequina mostró la mayor reducción con un 23%. Por su parte, la combinación de los compuestos fenólicos fue más efectiva que el ácido vanílico y el ácido protocateico, mostrando una reducción de la inducción de la luminiscencia del 21%.

Se ha sugerido que los compuestos fenólicos pueden afectar diferentes puntos dentro del proceso de formación de biopelículas. De acuerdo con nuestros resultados, la formación de biopelículas de las bacterias expuestas a los compuestos fenólicos individuales y en combinación pudo verse afectada por la reducción en motilidad impidiendo que la bacteria llegara a los catéteres de silicona y por los cambios superficiales demostrados por la disminución en la carga superficial y el aumento en la energía superficial de la bacteria. Debido a que los cambios superficiales de la bacteria interfieren en el proceso de adhesión se correlacionaron los valores obtenidos en estos ensayos con los resultados de la adhesión. Con respecto a la energía superficial, se ha asociado que superficies bacterianas menos hidrofílicas tienden a adherirse más en superficies hidrofóbicas como en el catéter de silicona. Se encontró una correlación negativa ($r = -0.89$, $p = 0.0394$), observando que a menor energía superficial (31.45 mJ/m^2) se presenta una mayor adhesión bacteriana ($6.99 \text{ Log CFU/cm}^2$) como lo muestran los resultados de la bacteria testigo. Mientras que con la mezcla fenólica se observó una mayor energía superficial (48.40 mJ/m^2) y menor adhesión bacteriana ($5.96 \text{ Log CFU/cm}^2$) a los fragmentos de silicona después de 24 h.

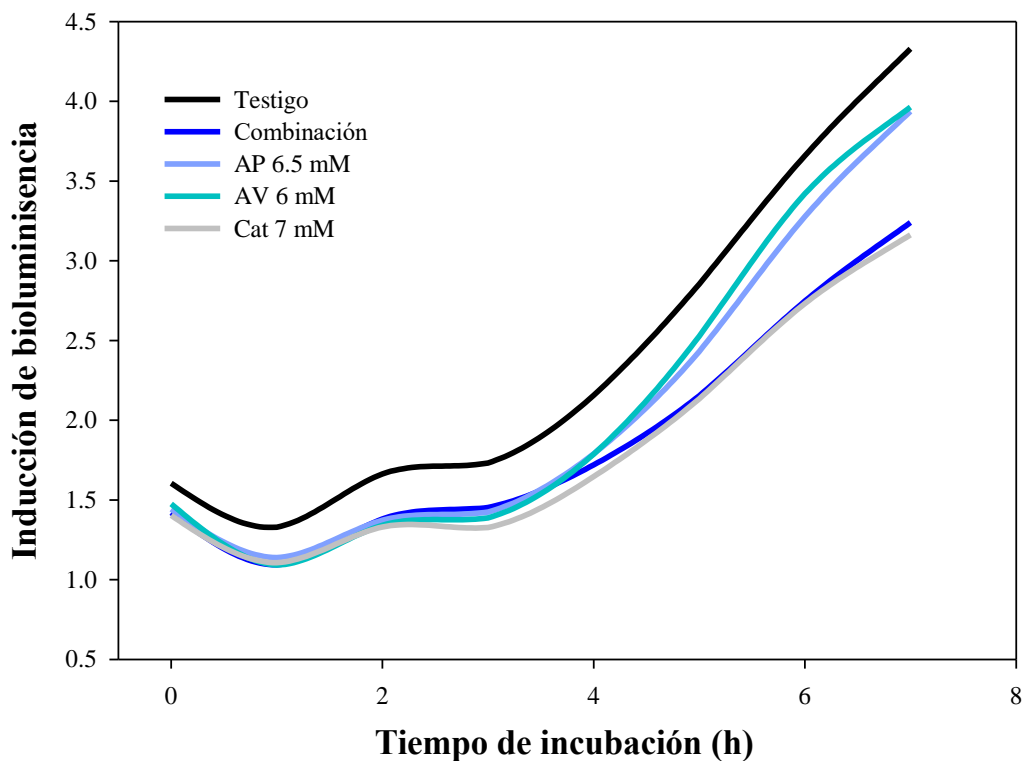


Figura 16. Inducción de bioluminiscencia de *V. harveyi* 170 por *E. coli* uropatogena expuesta y no a los compuestos fenólicos individuales y en combinación por 24 h a 37 °C. AP= ácido protocateico, AV= ácido vanílico, Cat= catequina.

En un estudio se demostró que los ácidos fenólicos, gálico, ferúlico, cafeico y clorogénico impidieron la adhesión de bacterias Gram-negativas atribuido a un aumento en la hidrofobicidad superficial y disminución del potencial de adhesión de la bacteria (Borges et al., 2012; Gupta et al., 2016; Wojnicz et al., 2012a). Gupta et al. (2016) evaluaron diferentes fracciones de jugo de arándano incluyendo proantocianidinas, antocianinas y flavonoles sobre la adhesión de la cepa bacteriana patógena *E. coli* B78. La microscopía de fuerza atómica (AFM) mostró una disminución significativa en las fuerzas de adhesión entre la superficie bacteriana y la punta de nitruro de silicona de la sonda del AFM después del tratamiento con fracciones de arándano. Este efecto podría atribuirse a la posible alteración de la estructura y función de las fimbrias.

La formación de biopelículas puede verse disminuida por la reducción del contenido de SPE tanto en proteínas y carbohidratos que afectan la adhesión y la estructura de la biopelícula. En este sentido, se correlacionó el contenido de proteínas y carbohidratos de la matriz de SPE con los resultados de adhesión en silicona a las 24 h. Se encontró una correlación positiva y fuerte entre

estos factores ($r = 0,92$, $p = 0,0182$), lo que pudiera indicar que una menor densidad celular en las biopelículas está relacionada con la disminución en el contenido de SPE. Los compuestos fenólicos fueron efectivos para reducir el contenido de SPE, y disminuir la adhesión a las superficies de silicona, así como alterar la arquitectura de las biopelículas de *E. coli* uropatógena analizadas por microscopía. El mecanismo exacto por el cual los compuestos fenólicos podrían disminuir la producción de SPE no está bien establecido; sin embargo, se ha propuesto una interferencia en el sistema de detección de quórum, regulación a la baja de la expresión génica relacionada con la producción de fimbrias, celulosa, flagelos u otros componentes o mediante una interacción directa con las enzimas responsables de la síntesis de esos componentes (Kim et al., 2017; Packiavathy et al., 2014; Serra et al., 2016).

En un estudio se relacionó el efecto inhibitorio del ácido gálico en la síntesis de SPE con la reducción de la formación de biopelículas de *E. coli* (Kang et al., 2018). El ácido gálico a una concentración de 2 mg/mL inhibió completamente la formación de biopelículas y mediante tinción cuantitativa con cristal violeta y análisis de microscopía electrónica de barrido ambiental, se indicó que el efecto inhibitorio ocurrió de manera dosis-dependiente. Lo interesante de este estudio fue que el ácido gálico disminuyó el contenido de lipopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos presentes en la biopelícula bacteriana. Los autores estudiaron como uno de los posibles mecanismos la reducción de genes implicados en la síntesis de SPE. El ácido gálico a dosis sub-inhedoras (0.25 - 2 mg/mL) redujo la expresión de los genes *pgaABC* involucrados en la síntesis del polisacárido PGA que juega un papel importante en la formación de biopelículas y es uno de los principales componentes de la matriz de SPE (Kang et al., 2018). Por otro lado, derivados de catequina como el galato de epigallocatequina puede eliminar la matriz de biopelículas de *E. coli* al interferir con el ensamblaje de las subunidades curli en fibras amiloides y biosíntesis de celulosa, y al reducir la expresión de CsgD, un activador crucial de curli y celulosa (Serra et al., 2016).

Por otro lado, también se ha sugerido que la formación de biopelículas puede ser afectado por la interferencia en la comunicación intercelular bacteriana. *E. coli* modula la expresión de algunos genes de virulencia y formación de biopelículas a través de la vía de señalización de AI-2 para la comunicación entre especies (Cloak et al., 2002). En un estudio se demostró que la concentración extracelular de AI-2 se redujo significativamente un 6.9% cuando *E. coli* O157:H7 se suplementó con 100 µg/mL de epigallocatequina galato comparado con la bacteria testigo; mientras que a concentraciones menores los niveles de AI-2 se redujeron del 13 al 40% (Lee et al., 2009). Además,

los niveles de transcripción en los genes *qseB* y *qseC* (*Quorum sensing E. coli regulator*) también se redujeron a 40.5% en ambos casos en presencia del flavonoide, lo que afectó la transcripción del gen *flhD* involucrado en el ensamblaje de flagelos y motilidad. Estos resultados indicaron que epigallocatequina galato afectan los cambios fenotípicos de *E. coli* como la producción de exopolisacáridos y la motilidad debido a la inhibición de la comunicación intercelular (Lee et al., 2009). Uno de los posibles modos de acción de los compuestos fenólicos para interrumpir el sistema de comunicación intercelular puede ser una inhibición competitiva o unión alostérica con la molécula productora o receptora de los compuestos señal como las AI-2 (Castillo et al., 2015). En nuestro estudio se observó que el ácido vanílico en una concentración más baja que los otros dos compuestos mostró una mayor reducción de las células adheridas, así como una mayor ruptura en la estructura de la red de la biopelícula, como se observó en las micrografías. Asimismo, se encontró que este compuesto era más efectivo que los otros dos para reducir la motilidad y el contenido de SPE, los cuales favorecen el proceso de adhesión y, por lo tanto, justificarían su mayor efectividad para reducir la adhesión de *E. coli* uropatógena. La posible actividad de relación de estructura de este compuesto podría atribuirse a la presencia del grupo metoxi que aumentó el carácter lipofílico, mientras que los otros compuestos no tenían este grupo funcional. Se ha establecido que la actividad antibacteriana se vio favorecida por un mayor grado de hidrofobicidad de los compuestos, ya que promovió la interacción con la membrana, flagelos, fimbrias y otras estructuras (Wu et al., 2013). El ácido vanílico tiene un LogP de 1.43 que es más alto que el LogP de los otros compuestos, lo que indica un mayor grado de hidrofobicidad que podría permitir que este ácido fenólico sea más efectivo en estas variables.

De manera similar, se estudió el potencial anti-biopelículas de los ácidos gálico, cafeico y clorogénico para dilucidar su mecanismo de acción contra *S. aureus* (Luís et al., 2014). El efecto de los ácidos cafeico y clorogénico a 4 mg/mL (reducción del 80%) en la producción de biopelículas fue más evidente que el efecto del ácido gálico en una concentración similar (reducción del 40%). Además, los autores informaron un posible mecanismo diferente para cada compuesto fenólico, el ácido cafeico podría interferir con la estabilidad de la membrana y la actividad metabólica de *S. aureus* debido a las propiedades más lipofílicas comparadas con las del ácido gálico. Del mismo modo, Baptista et al. (2018) informaron que el 2-etoxifenol fue más efectivo al reducir la formación de biopelículas en comparación con el catecol, el resveratrol y el

guayacol, que tienen estructuras similares, debido a la cadena lateral de hidrocarburo y a un mayor carácter lipofílico (LogP 1.86).

Otro hecho interesante es que la nitrofurantoína no pareció afectar ningún mecanismo de adhesión, sino que atacó la viabilidad de las células planctónicas. Esto podría atribuirse a su modo de acción ya que no interfiere con la motilidad, la adhesión o la comunicación celular, que son factores que influyen en el desarrollo de biopelículas (Munoz-Davila, 2014). Sin embargo, el mecanismo de acción de la nitrofurantoína es complejo y parece estar causado por la producción de nitrofuranos (intermedios reactivos) que pueden dañar las proteínas ribosómicas, el ADN y otras macromoléculas (Konar et al., 2016). Por esta razón, es importante considerar agentes antibacterianos alternativos a este antibiótico. Además, como se observó anteriormente, la adhesión celular y la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena en los catéteres tardaron poco tiempo (4 h) y la nitrofurantoína solo afectó a las células planctónicas por lo que su administración debería ocurrir antes de que se produzca la adhesión celular.

El sinergismo antibacteriano observado en la combinación de compuestos fenólicos podría atribuirse a diferentes mecanismos antibacterianos para inhibir la formación de biopelículas. Un posible mecanismo sinérgico propuesto en nuestro estudio es que la catequina interfiere con la capa lipídica de la membrana bacteriana, afectando su integridad o funcionalidad estructural. El ácido protocateico causa cambios superficiales de la bacteria afectando su adhesión, mientras que el ácido vanílico afecta la motilidad de la bacteria y por lo tanto evita que llegue a la superficie para formar las biopelículas. La acción simultánea de estos mecanismos podría ser responsable del efecto antibacteriano sinérgico observado que inhibe la densidad celular en la formación de biopelículas (Figura 17).

Estudios previos han reportado la efectividad de la combinación de compuestos fenólicos y con antibióticos para inhibir la formación de biopelículas bacterianas. Por ejemplo, Rodríguez-Pérez et al. (2016) reportaron el efecto de 25 fracciones de un extracto de arándano sobre la formación de biopelículas de *E. coli* uropatógena. Los resultados demostraron que el extracto completo presentó mayor actividad que las fracciones debido a la suma de acciones de todos los componentes. Además, se observó que la fracción que contenía miricetina y quercetina en combinación fue la más efectiva para disminuir la formación de biopelícula de la bacteria en comparación con el control y con las fracciones individuales de estos compuestos. Por otro lado, la combinación de miricetina y quercetina redujo la hidrofobicidad de la bacteria, posiblemente debido a interacciones

con las estructuras proteicas superficiales de la membrana y se observó que esta combinación fue más efectiva que las otras fracciones. Este estudio demuestra que la combinación de compuestos fenólicos es una buena estrategia para aumentar la efectividad de los compuestos en comparación con su uso individual.

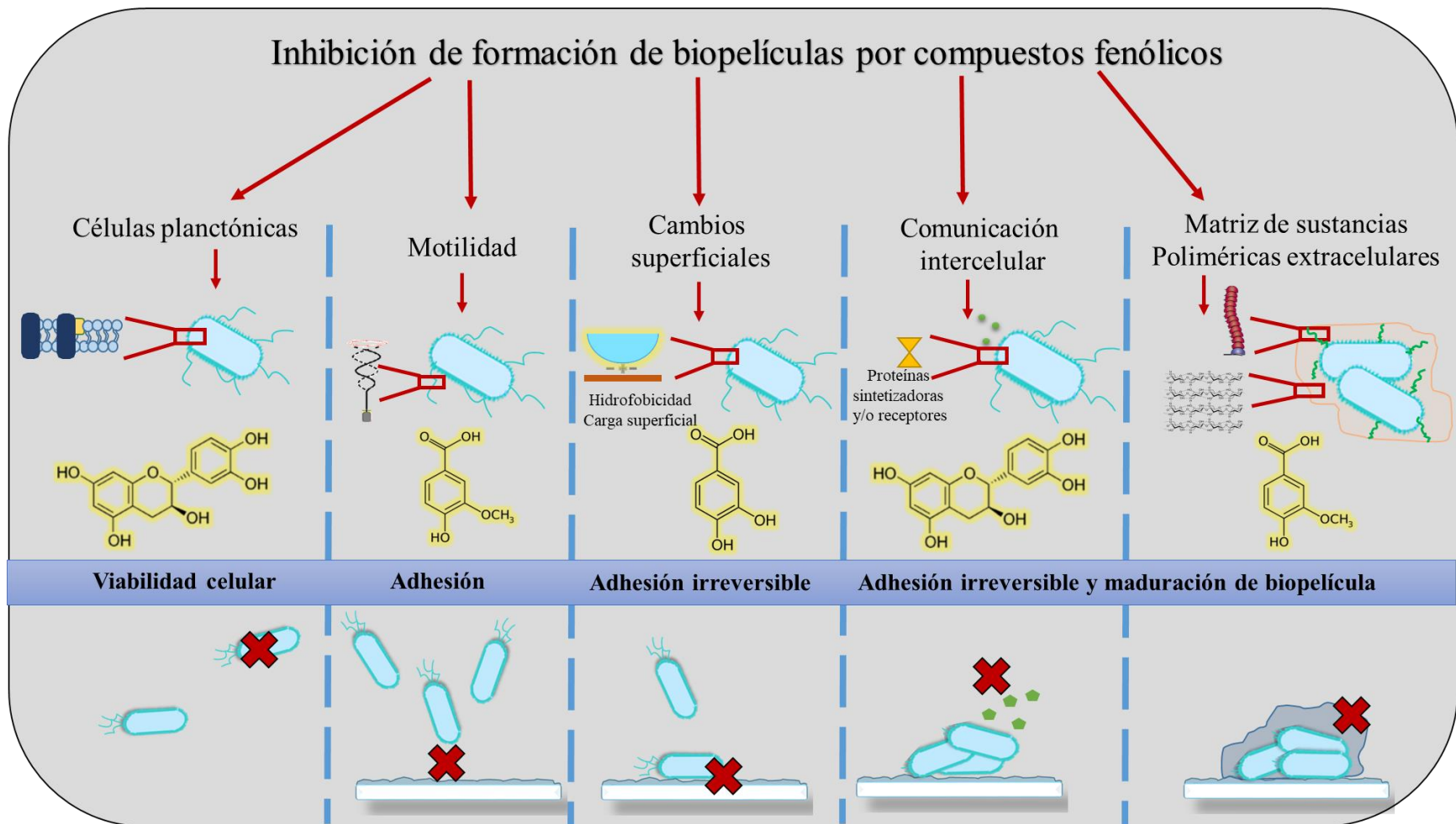


Figura 17. Inhibición de formación de biopelículas de *Escherichia coli* uropatógena en superficies de silicona por la combinación de catequina, ácido vanílico y ácido protocateico.

CONCLUSIONES

La combinación de ácido protocateico, ácido vanílico y catequina mostró un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de células planctónicas, la formación de biopelículas y la erradicación de *E. coli* uropatógena en las superficies de silicona. La acción sinérgica de la combinación para inhibir la formación de biopelículas puede deberse a diferentes contribuciones de cada compuesto; el ácido vanílico inhibió la motilidad de las bacterias, el ácido protocateico afectó la carga superficial y la energía superficial, el ácido vanílico redujo el contenido de proteínas y carbohidratos en la matriz de las biopelículas, y la catequina afectó la permeabilidad de las células de la membrana e interfirió con la comunicación intercelular de la bacteria.

RECOMENDACIONES

Para futuros estudios y seguir contribuyendo al conocimiento se sugiere profundizar en los mecanismos de los compuestos fenólicos durante la combinación sinérgica mediante la evaluación de la expresión de genes relacionados con motilidad, síntesis de flagelos y pilis como curli y fimbria tipo 1 y comunicación intercelular como *sdiA* y *luxS*. Además, sería interesante evaluar la interacción de los compuestos fenólicos con proteínas clave para el desarrollo de biopelículas de *E. coli* uropatógena tales como CsgD, FimH, FliC, LuxS, entre otros.

También, se sugiere realizar combinaciones de los compuestos fenólicos con antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de infecciones en vías urinarias.

Para una futura aplicación, se sugiere evaluar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la adhesión bacteriana en células epiteliales de vejiga o en sistemas *in vivo* con animales.

REFERENCIAS

- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., Bernal-Mercado, A. T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G. A., . . . Ayala-Zavala, J. F. (2014). Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*, 5, 699.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R., Martins, A., & Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 346-357.
- Amin, M. U., Khurram, M., Khattak, B., & Khan, J. (2015). Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 59.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, 301(5629), 105-107.
- Arita-Morioka, K.-i., Yamanaka, K., Mizunoe, Y., Tanaka, Y., Ogura, T., & Sugimoto, S. (2018). Inhibitory effects of Myricetin derivatives on curli-dependent biofilm formation in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 8(1), 8452.
- Asahi, Y., Noiri, Y., Miura, J., Maezono, H., Yamaguchi, M., Yamamoto, R., . . . Ebisu, S. (2014). Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *P orphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1164-1171.
- Asma, B., Vicky, L., Stephanie, D., Yves, D., Amy, H., & Sylvie, D. (2018). Standardised high dose versus low dose cranberry Proanthocyanidin extracts for the prevention of recurrent urinary tract infection in healthy women: A double blind randomised controlled trial protocol. *BMC Urology*, 18(1), 29.
- Baptista, J., Simões, M., & Borges, A. (2018). Effect of plant-based catecholic molecules on the prevention and eradication of *Escherichia coli* biofilms: a structure activity relationship study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 141, 101-113.
- Barber, A. E., Norton, J. P., Spivak, A. M., & Mulvey, M. A. (2013). Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clinical Infectious Diseases*, 57(5), 719-724.
- Belas, R. (2013). When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Molecular Microbiology*, 90(1), 1-5.
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9), 517-527.
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J.-M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. In *Bacterial Biofilms* (pp. 249-289): Springer.
- Besharova, O., Suchanek, V. M., Hartmann, R., Drescher, K., & Sourjik, V. (2016). Diversification of gene expression during formation of static submerged biofilms by *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1568.

- Blango, M. G., Ott, E. M., Erman, A., Veranic, P., & Mulvey, M. A. (2014). Forced resurgence and targeting of intracellular uropathogenic *Escherichia coli* reservoirs. *PLoS One*, 9(3), e93327.
- Borges, A., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, 28(7), 755-767.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162-167.
- Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Landa-Juárez, S., Moreno-Espinosa, S., . . . Valdez-Vázquez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 70(1), 3-10.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., & Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157: H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiology*, 57, 81-89.
- Castillo, S., Heredia, N., & García, S. (2015). 2 (5H)-Furanone, epigallocatechin gallate, and a citric-based disinfectant disturb quorum-sensing activity and reduce motility and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Folia Microbiologica*, 60(1), 89-95.
- Cerqueira, L., Oliveira, J. A., Nicolau, A., Azevedo, N. F., & Vieira, M. J. (2013). Biofilm formation with mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa/Escherichia coli* on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters. *Biofouling*, 29(7), 829-840.
- Cloak, O. M., Solow, B. T., Briggs, C. E., Chen, C.-Y., & Fratamico, P. M. (2002). Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4666-4671.
- Colas, A., & Curtis, J. (2004). Silicone biomaterials: history and chemistry. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2, 80-85.
- Control, C. f. D., & Prevention. (2015). Urinary tract infection (catheter-associated urinary tract infection [CAUTI] and non-catheter-associated urinary tract infection [UTI]) and other urinary system infection [USI] events. *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*: <http://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/7pscCAUTICurrent.pdf>.
- Cottarel, G., & Wierzbowski, J. (2007). Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends in Biotechnology*, 25(12), 547-555.
- Curtis, J., & Klykken, P. (2008). A comparative assessment of three common catheter materials.
- Cusumano, C. K., Pinkner, J. S., Han, Z., Greene, S. E., Ford, B. A., Crowley, J. R., . . . Hultgren, S. J. (2011). Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Science Translational Medicine*, 3(109), 109ra115-109ra115.

- Davis, N. F., & Flood, H. D. (2011). *The pathogenesis of urinary tract infections*: INTECH Open Access Publisher.
- De Lira Torres, M., Flores, A., Fragoso, L., Oliva, B., López, E., & Márquez, M. (2012). Infecciones del tracto urinario asociado a catéter vesical. Áreas de cirugía y medicina interna de dos hospitales del sector público. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(1), 13-18.
- Desai, D. G., Liao, K. S., Cevallos, M. E., & Trautner, B. W. (2010). Silver or nitrofurazone impregnation of urinary catheters has a minimal effect on uropathogen adherence. *The Journal of Urology*, 184(6), 2565-2571.
- Dhakal, B., Kulesus, R., & Mulvey, M. (2008). Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(s2), 2-11.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155-166.
- Fadel, O., El Kirat, K., & Morandat, S. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(12), 2973-2980.
- Ferreira, J. o. V. N., Capello, T. M., Siqueira, L. J., Lago, J. o. H. G., & Caseli, L. (2016). Mechanism of action of thymol on cell membranes investigated through lipid Langmuir monolayers at the air–water interface and molecular simulation. *Langmuir*, 32(13), 3234-3241.
- Fisher, L. E., Hook, A. L., Ashraf, W., Yousef, A., Barrett, D. A., Scurr, D. J., . . . Parmenter, C. D. (2015). Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broadspectrum antibiofilm activity. *Journal of Controlled Release*, 202, 57-64.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269-284.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660.
- Fromentin, E., Vostalova, J., Vidlar, A., Galandakova, A., Vrbkova, J., Ulrichova, J., . . . Simanek, V. (2014). A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to investigate the efficacy of cranberry fruit powder (Pacran®) in the prevention of recurrent urinary tract infection in women (639.4). *The FASEB Journal*, 28(1_supplement), 639.634.
- Gomes, L., Silva, L., Simões, M., Melo, L., & Mergulhão, F. (2015). *Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(4), 1414-1423.
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology*, 188(1), 305-316.

- González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Sánchez-Patán, F., Martínlvarez, P. J., Moreno-Arribas, M., & Bartolomé, B. (2015). Anti-adhesive activity of cranberry phenolic compounds and their microbial-derived metabolites against uropathogenic *Escherichia coli* in bladder epithelial cell cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(6), 12119-12130.
- Gupta, P., Song, B., Neto, C., & Camesano, T. A. (2016). Atomic force microscopy-guided fractionation reveals the influence of cranberry phytochemicals on adhesion of *Escherichia coli*. *Food and Function*, *7*(6), 2655-2666.
- Gutierrez-Pacheco, M., Gonzalez-Aguilar, G., Martinez-Tellez, M., Lizardi-Mendoza, J., Madera-Santana, T., Bernal-Mercado, A., . . . Ayala-Zavala, J. (2018). Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Food Control*, *89*, 210-218.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, *173*, 501-513.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, *15*(8), 639-652.
- Hidalgo, G., Chan, M., & Tufenkji, N. (2011). Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 fliC expression and motility by cranberry materials. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(19), 6852-6857.
- Hooton, T. M., Bradley, S. F., Cardenas, D. D., Colgan, R., Geerlings, S. E., Rice, J. C., . . . Tenke, P. (2010). Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(5), 625-663.
- Howell, A. B. (2007). Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*(6), 732-737.
- Hui, Y. W., & Dykes, G. A. (2012). Modulation of cell surface hydrophobicity and attachment of bacteria to abiotic surfaces and shrimp by Malaysian herb extracts. *Journal of Food Protection*, *75*(8), 1507-1511.
- Iswaldi, I., Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., del Mar Contreras, M., Uberos, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Identification of polyphenols and their metabolites in human urine after cranberry-syrup consumption. *Food and Chemical toxicology*, *55*, 484-492.
- Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., & Okabe, S. (2009). Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(12), 4093-4100.
- Jacobsen, S. á., Stickler, D., Mobley, H., & Shirliff, M. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*(1), 26-59.
- Jayaraman, P., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Tang, T. H., & Sakharkar, K. R. (2010). Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International Journal of Biological Sciences*, *6*(6), 556-568.

- Kang, J., Li, Q., Liu, L., Jin, W., Wang, J., & Sun, Y. (2018). The specific effect of gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating pgaABCD genes expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1837-1846.
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2012). Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), 618-621.
- Kim, H., Chung, D., Kim, S. A., & Rhee, M.-S. (2019). Synergistic cranberry juice combinations with natural-borne antimicrobials for the eradication of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm within a short time. *Letters in Applied Microbiology*, 68(4), 321-328.
- Kim, Y., Jang, S.-J., Kim, H.-R., & Kim, S.-B. (2017). Deodorizing, antimicrobial and glucosyltransferase inhibitory activities of polyphenolics from biosource. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(5), 1400-1404.
- Klemm, P., Vejborg, R. M., & Hancock, V. (2010). Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 451-459.
- Kochiashvili, D., Khuskivadze, A., Kochiashvili, G., Koberidze, G., & Kvakhajelidze, V. (2014). Role of the bacterial vaccine Solco-Urovac® in treatment and prevention of recurrent urinary tract infections of bacterial origin. *Georgian Med News*, 231, 11-16.
- Konar, J., Ghosh, R., Chatterjee, S. S., Majumdar, A. K., Pathak, M., & Bhattacharya, S. (2016). Nitrofurantoin: The time-tested choice in uncomplicated urinary tract infection. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 5, 1872-1875.
- Kot, B., Wicha, J., Piechota, M., Wolska, K., & Gruzewska, A. (2015). Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(4), 919-924.
- Krueger, C. G., Reed, J. D., Feliciano, R. P., & Howell, A. B. (2013). Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(13), 4385-4395.
- Lawrence, E., & Turner, I. (2005). Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Medical Engineering & Physics*, 27(6), 443-453.
- Lee, J.-H., Cho, H. S., Joo, S. W., Chandra Regmi, S., Kim, J.-A., Ryu, C.-M., . . . Lee, J. (2013). Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157: H7. *Biofouling*, 29(10), 1189-1203.
- Lee, J.-H., Regmi, S. C., Kim, J.-A., Cho, M. H., Yun, H., Lee, C.-S., & Lee, J. (2011a). Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infection and Immunity*, 79(12), 4819-4827.
- Lee, K.-M., Kim, W.-S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S.-W., . . . Park, S. (2009). Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Protection*, 72(2), 325-331.
- Lee, K.-M., Lim, J., Nam, S., Yoon, M. Y., Kwon, Y.-K., Jung, B. Y., . . . Yoon, S. S. (2011b). Inhibitory effects of broccoli extract on *Escherichia coli* O157: H7 quorum sensing and in vivo virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 321(1), 67-74.

- Lemos, M., Borges, A., Teodósio, J., Araújo, P., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2014). The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *86*, 42-51.
- Li, R., Schentag, J., & Nix, D. E. (1993). The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *37*(3), 523-531.
- Lima, V. N., Oliveira-Tintino, C. D., Santos, E. S., Morais, L. P., Tintino, S. R., Freitas, T. S., . . . Menezes, I. R. (2016). Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis*, *99*, 56-61.
- Liu, H., & Fang, H. H. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, *95*(3), 249-256.
- Lo, E., Nicolle, L. E., Coffin, S. E., Gould, C., Maragakis, L. L., Meddings, J., . . . Yokoe, D. S. (2014). Strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections in acute care hospitals: 2014 update. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *35*(S2), S32-S47.
- Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, *30*(1), 69-79.
- Maisuria, V. B., Hosseinidoust, Z., & Tufenkji, N. (2015). Polyphenolic extract from maple syrup potentiates antibiotic susceptibility and reduces biofilm formation of pathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(11), 3782-3792.
- Mandakhalikar, K. D., Chua, R. R., & Tambyah, P. A. (2016). New technologies for prevention of catheter associated urinary tract infection. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, *8*(1), 24-41.
- Mantzorou, M., & Giaginis, C. (2018). Cranberry Consumption Against Urinary Tract Infections: Clinical State-of-the-Art and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *19*(13), 1049-1063.
- Martínez, J. A., & Mensa, J. (2005). Infección urinaria asociada a catéteres urinarios en la comunidad. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *23*, 57-66.
- Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S., & Hultgren, S. J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, *19*(12), 2803-2812.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, *48*, 1-12.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*(1), 69-72.
- McKay, D. L., Chen, C.-Y. O., Zampariello, C. A., & Blumberg, J. B. (2015). Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry*, *168*, 233-240.

- Miyague, L., Macedo, R. E., Meca, G., Holley, R. A., & Luciano, F. B. (2015). Combination of phenolic acids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology*, *64*(1), 333-336.
- Mobley, H., Chippendale, G., Tenney, J., Hull, R., & Warren, J. (1987). Expression of type 1 fimbriae may be required for persistence of *Escherichia coli* in the catheterized urinary tract. *Journal of Clinical Microbiology*, *25*(12), 2253-2257.
- Molina, C. G. E., Rodríguez, E. B., Romero, H. G. A., Avalos, F. C., & Rojo, S. E. A. (2007). Perfil microbiológico en infección urinaria asociada a catéter vesicouretral. *Medicrit*, *4*(3), 59-65.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., . . . Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, *1*(3), 233-253.
- Movileanu, L., Neagoe, I., & Flonta, M. L. (2000). Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, *205*(1-2), 135-146.
- Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, *4*(5), 257-271.
- Munoz-Davila, M. (2014). Role of old antibiotics in the era of antibiotic resistance. Highlighted nitrofurantoin for the treatment of lower urinary tract infections. *Antibiotics*, *3*(1), 39-48.
- Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Tomiyama, D., . . . Miyamoto, T. (2013). A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. *Food Control*, *33*(2), 433-439.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., & Coppola, R. (2013). Quorum sensing and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12607-12619.
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(1), 7-17.
- Nicolle, L. E. (2014). Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *3*(1), 1.
- Niu, C., Robbins, C. M., Pittman, K. J., Stubblefield, B. A., Simmons, R. B., & Gilbert, E. S. (2013). LuxS influences *Escherichia coli* biofilm formation through autoinducer-2-dependent and autoinducer-2-independent modalities. *FEMS Microbiology Ecology*, *83*(3), 778-791.
- Nohales, F., & Nohales, M. (2010). Arándano americano (*Vaccinium macrocarpon*): conclusiones de la investigación y de la evidencia clínica. *Revista de Fitoterapia*, *10*, 5-21.
- Nowotarska, S., Nowotarski, K., Friedman, M., & Situ, C. (2014). Effect of structure on the interactions between five natural antimicrobial compounds and phospholipids of bacterial cell membrane on model monolayers. *Molecules*, *19*(6), 7497-7515.

- Occhipinti, A., Germano, A., & Maffei, M. E. (2016). Prevention of urinary tract infection with Oximacro®, a cranberry extract with a high content of a-type proanthocyanidins: A pre-clinical double-blind controlled study. *Urology Journal*, 13(2), 2640-2649.
- Oliveira, B., Rodrigues, A., Bertoldi, M., Taylor, J., & Pinto, U. M. (2017). Microbial control and quorum sensing inhibition by phenolic compounds of acerola (*Malpighia emarginata*). *International Food Research Journal*, 24(5), 2228-2237.
- Orndorff, P. E., Devapali, A., Palestrant, S., Wyse, A., Everett, M. L., Bollinger, R. R., & Parker, W. (2004). Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. *Infection and Immunity*, 72(4), 1929-1938.
- Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Vargas-Arispuro, I., Gonzalez-Aguilar, G. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Nazzaro, F., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Combination of *Cymbopogon citratus* and *Allium cepa* essential oils increased antibacterial activity in leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), 2166-2173.
- Otto, K., & Hermansson, M. (2004). Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *Journal of Bacteriology*, 186(1), 226-234.
- Pacheco-Ordaz, R. (2015). *Efecto de compuestos fenólicos presentes en mango cv. Ataulfo, sobre el crecimiento de bacterias patógenas y benéficas*. (Tesis de Maestría), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Packiavathy, I. A. S. V., Priya, S., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2014). Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin—an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 148, 453-460.
- Park, K.-M., Jo, S.-K., Yu, H., Park, J.-Y., Choi, S. J., Lee, C. J., & Chang, P.-S. (2018). Erythorbyl laurate as a potential food additive with multi-functionalities: Antibacterial activity and mode of action. *Food Control*, 86, 138-145.
- Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M., Rosa, E., & Saavedra, M. (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, 52, 1-7.
- Phillips, P., Wolcott, R., Fletcher, J., & Schultz, G. (2010). Biofilms made easy. *Wounds International*, 1(3), 1-6.
- Pinzón-Arango, P. A., Holguin, K., & Camesano, T. A. (2011). Impact of cranberry juice and proanthocyanidins on the ability of *Escherichia coli* to form biofilms. *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1315-1321.
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285-293.
- Pugach, J. L., DiTIZIO, V., MITTELMAN, M. W., BRUCE, A. W., DiCOSMO, F., & Khoury, A. E. (1999). Antibiotic hydrogel coated Foley catheters for prevention of urinary tract infection in a rabbit model. *The Journal of Urology*, 162(3 Part 1), 883-887.

- Rafsanjany, N., Lechtenberg, M., Petereit, F., & Hensel, A. (2013). Antiadhesion as a functional concept for protection against uropathogenic *Escherichia coli*: In vitro studies with traditionally used plants with antiadhesive activity against uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, *145*(2), 591-597.
- Reisner, A., Maierl, M., Jörger, M., Krause, R., Berger, D., Haid, A., . . . Zechner, E. L. (2014). Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *196*(5), 931-939.
- Reygaert, W., & Jusufi, I. (2013). Green tea as an effective antimicrobial for urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 162.
- Escherichia coli* Ribić, R., Meštrović, T., Neuberg, M., & Kozina, G. (2018). Effective anti-adhesives of uropathogenic. *Acta Pharmaceutica*, *68*(1), 1-18.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Uberos, J., Jiménez-Sánchez, C., Peña, A., & Segura-Carretero, A. (2016). Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food & Function*, *7*(3), 1564-1573.
- Salud, S. d. (2010). *Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de Infección Urinaria asociada a sonda vesical en la Mujer*. México.
- Sánchez-Maldonado, A., Schieber, A., & Gänzle, M. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(5), 1176-1184.
- Serra, D. O., Mika, F., Richter, A. M., & Hengge, R. (2016). The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the σ E-dependent sRNA RybB. *Molecular Microbiology*, *101*(1), 136-151.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(2), 309-319.
- Simoës, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, *26*(6), 746-757.
- Singha, P., Locklin, J., & Handa, H. (2017). A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomaterialia*, *50*, 20-40.
- Soto, S., Smithson, A., Martinez, J., Horcajada, J., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *The Journal of Urology*, *177*(1), 365-368.
- Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, *4*(3), 223-229.
- Soutourina, O. A., & Bertin, P. N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(4), 505-523.

- Suwalak, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2009). Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. *Journal of Electron Microscopy*, 58(5), 315-320.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., Georgellis, D., . . . Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5130-5140.
- Taga, M. E., & Xavier, K. B. (2011). Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. *Current Protocols in Microbiology*, 23(1), 1C. 1.1-1C. 1.15.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75, 255-261.
- Taylor, P. W., Hamilton-Miller, J. M., & Stapleton, P. D. (2005). Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Science and Technology Bulletin*, 2, 71.
- Tenke, P., Köves, B., Nagy, K., Hultgren, S. J., Mendling, W., Wullt, B., . . . Pickard, R. (2012). Update on biofilm infections in the urinary tract. *World Journal of Urology*, 30(1), 51-57.
- Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., & Allende, A. (2015). Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), 189-204.
- Tsuchiya, H. (2010). Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry*, 120(4), 1089-1096.
- van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77(11), 1168-1182.
- Vasileiou, I., Katsargyris, A., Theocharis, S., & Giaginis, C. (2013). Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutrition Research*, 33(8), 595-607.
- Vazquez-Armenta, F., Bernal-Mercado, A., Lizardi-Mendoza, J., Silva-Espinoza, B., Cruz-Valenzuela, M., Gonzalez-Aguilar, G., . . . Ayala-Zavala, J. (2018). Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 32(8), 889-907.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Franssaer, J., Vermant, J., & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10), 496-506.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G., Jesudhasan, P., Pillai, S., & Patil, B. (2010). Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 515-527.
- Wagner, H., & Efferth, T. (2017). Introduction: Novel hybrid combinations containing synthetic or antibiotic drugs with plant-derived phenolic or terpenoid compounds. *Phytomedicine*, 37, 1-3.

- Wang, C., Zuo, Y., Vinson, J. A., & Deng, Y. (2012). Absorption and excretion of cranberry-derived phenolics in humans. *Food Chemistry*, 132(3), 1420-1428.
- Williams, G. J., & Stickler, D. J. (2008). Effect of triclosan on the formation of crystalline biofilms by mixed communities of urinary tract pathogens on urinary catheters. *Journal of Medical Microbiology*, 57(9), 1135-1140.
- Wojnicz, D., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., Kicia, M., & Tichaczek-Goska, D. (2012a). Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. *Urological Research*, 40(6), 683-697.
- Wojnicz, D., Sycz, Z., Walkowski, S., Gabrielska, J., Aleksandra, W., Alicja, K., . . . Hendrich, A. B. (2012b). Study on the influence of cranberry extract Żuravit S· O· S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. *Phytomedicine*, 19(6), 506-514.
- Wood, T. K., Barrios, A. F. G., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 361-367.
- Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., & Xu, X. (2013). A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(11), 2751-2756.
- Wu, Y., Bai, J., Liu, X., Liu, L., Zhong, K., Huang, Y., & Gao, H. (2018). Antibacterial effect of 3-p-trans-coumaroyl-2-hydroxyquinic acid, a phenolic compound from needles of *Cedrus deodara*, on cellular functions of *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*, 8(9), 4969-4975.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452-1463.
- Zohar, B.-A., & Kolodkin-Gal, I. (2015). Quorum sensing in *Escherichia coli*: interkingdom, inter- and intraspecies dialogues, and a suicide-inducing peptide. In *Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight* (pp. 85-99): Springer.