



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
*"Francisco García Salinas"*

Unidad Académica de Ciencias Químicas  
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

**Selección mediante un cribado del derivatizado de  
fluoroquinolonas más efectivo sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae* y  
su evaluación en un modelo murino de neumonía aguda**

Para Obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias y Tecnología Química

**Presenta:**

Q.F.B. Luis Angel Veyna Hurtado

**Director:**

Dr. en C. Alberto Rafael Cervantes Villagrana

**Codirectores:**

Dr. en C. Hiram Hernández López

Dra. en C. Fuensanta del Rocío Reyes Escobedo (externo)

24 de noviembre de 2021

## DEDICATORIA

Para Coco, Nene, y mi madre.

Siempre han sido y serán la fuerza impulsora de mis mejores proyectos.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios experimentales de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ), así como en los laboratorios de Microbiología, de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, y en el Bioterio Claude Bernard de la Universidad Autónoma de Zacatecas, por lo que se agradece el constante apoyo recibido por parte de la Unidad Académica.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de maestría con registro No. 970845, así como al grupo de investigación, y directores de tesis por el constante asesoramiento en el transcurso de este proyecto.

Agradezco a mi familia, especialmente mis padres, Coco, Nene, Chuya, por todo el incontable apoyo que me han dado, así como el direccionamiento correcto durante todo mi proceso formativo y de vida.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b> .....	iii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
1. Introducción .....	3
2. Marco Teórico .....	4
2.1 Generalidades de las bacterias .....	4
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	7
2.4 Antibióticos de mayor uso contra infecciones bacterianas .....	10
2.5 Resistencia farmacológica bacteriana .....	12
3. Antecedentes .....	13
4. Planteamiento del problema .....	22
5. Justificación .....	23
6. Hipótesis .....	24
7. Objetivo General .....	24
8. Objetivos Específicos .....	24
9. Materiales y métodos .....	24
9.1 Reactivos .....	24
9.2 Evaluación Kirby Bauer .....	26
9.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante macrodilución en caldo .....	30
9.4 Evaluación de citotoxicidad de FQB-9 en cultivo celular .....	30
9.5 Modelo <i>in vivo</i> de neumonía aguda .....	32
9.6 Comité de bioética .....	34
9.7 Análisis estadístico .....	34
10. Resultados .....	35
10.1 Evaluación Antimicrobiana de los compuestos derivatizados de fluoroquinolonas .....	35
10.2 Evaluación de CMI por macrodilución y CMB en agar MH .....	40
10.3 Evaluación del compuesto FQB-9 en la citotoxicidad en cultivo de células LLC .....	42
10.4 Evaluación de FQB-9 en modelo <i>in vivo</i> de neumonía aguda .....	43
11. Discusión .....	50

12.	Conclusiones .....	55
13.	Perspectivas .....	55
14.	Referencias .....	56
	Anexos .....	62

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Familias de tratamientos antibacterianos.....	10
Tabla 2. Prioridad de obtención de antibióticos para distintas bacterias .....	13
Tabla 3. Bacterias susceptibles a la acción de fluoroquinolonas .....	17
Tabla 4. Identificación de compuestos evaluados en el cribado por Kirby-Bauer .....	27
Tabla 5. Estructuras de compuestos evaluados en cribado por Kirby-Bauer .....	28
Tabla 6. Valores de pH en las disoluciones acuosas de los compuestos 13-17 .....	29
Tabla 7. Resultados de CMI y CMB para FQB-9 .....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>S. aureus</i> en tinción Gram .....	6
Figura 2. Morfología de <i>S. aureus</i> .....	6
Figura 3. Tinción Gram de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a partir de un cultivo positivo de MacConkey.....	8
Figura 4. Resistencia bacteriana identificada en hemocultivos de pacientes de ambos géneros con septicemia .....	15
Figura 5. Resistencia farmacológica de <i>S. aureus</i> en hemocultivos, obtenidos de pacientes de con septicemia .....	15
Figura 6. Mecanismo de acción de fluoroquinolonas .....	19
Figura 7. Heat map de los acoplamientos <i>in silico</i> de los derivatizados de fluoroquinolonas con la topoisomerasa .....	20
Figura 8. Estructura del compuesto FQB-9 sintetizado por nuestro grupo de investigación. ....	25
Figura 9. Diseño experimental para determinar la citotoxicidad de los derivados de fluoroquinolonas sobre células microcíticas de cáncer de pulmón.....	31
Figura 10. Diseño de tratamiento experimental.....	34
Figura 11. Áreas de inhibición obtenidas por compuestos evaluados en <i>K. pneumoniae</i> .....	36
Figura 12. Área de inhibición promedio de FQB-9 contra <i>K. pneumoniae</i> , evaluación Kirby-Bauer	38
Figura 13. Área de inhibición promedio de FQB-9 contra <i>S. aureus</i> , evaluación Kirby-Bauer.....	39
Figura 14. Áreas neumónicas en cortes histológicos de pulmón tras infección de <i>K. pneumoniae</i> .	46
Figura 15. Áreas neumónicas en cortes histológicos de pulmón tras infección de <i>S. aureus</i> .....	49

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad en células LLC.....	43
Gráfica 2. Diferencia de gramos en el peso diario de grupos infectados por <i>K. pneumoniae</i> significativas.....	44
Gráfica 3. Diferencia de gramos en el peso diario de grupos infectados por <i>S. aureus</i> .....	48

## ABREVIATURAS

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB. Concentración mínima bactericida

CMI. Concentración mínima inhibitoria

Cpx. Ciprofloxacino

DMEM. Dulbecco's Modification of Eagle Medium

DMSO. Dimetilsulfóxido

FQ. Fluoroquinolona

DFQ. Difluoroquinolona

H y E. Hematoxilina y Eosina

IRA. Infección respiratoria aguda

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía

ITU. Infección de tracto urinario

LLC. Lewis lung carcinoma

MDR. Resistencia a múltiples fármacos (del inglés, multiple drug resistance)

MH. Müller-Hinton

MHA. Agar Müller-Hinton

MRSA. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

UFC. Unidades formadoras de colonias

VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana.

VEGF-A. Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor)

## RESUMEN

El descubrimiento e implementación de los antibióticos ha conducido a un mejor pronóstico en enfermedades infecciosas. Las fluoroquinolonas son una familia de antibióticos con amplio espectro de acción y efectividad antibacteriana. Sin embargo, las cepas bacterianas han incrementado su resistencia a los antibióticos, es por ello, que la Organización Mundial de la Salud ha divulgado la urgencia para desarrollar nuevas moléculas activas, por lo que distintos compuestos fueron derivatizados de fluoroquinolonas por nuestro grupo de investigación, encontrando un compuesto con buen potencial antibacteriano, el cual fue nombrado FQB-9. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* del derivatizado FQB-9 en cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae*. La inhibición de *S. aureus* y *K. pneumoniae* (aislados clínicos) se evaluó por la técnica Kirby-Bauer, donde el FQB-9 generó halos de inhibición promedio de  $8.55 \pm 0.395 \text{ cm}^2$  y  $8.24 \pm 1.239 \text{ cm}^2$  para las cepas respectivamente. Para la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, se realizaron macrodiluciones de FQB-9 obteniendo  $0.25 \mu\text{g/mL}$  en ambas determinaciones para *S. aureus*; mientras que para *K. pneumoniae*  $1 \mu\text{g/mL}$ . Para determinar la seguridad del FQB-9 se evaluó la citotoxicidad del compuesto en células LLC, donde no se encontró diferencias significativas con el grupo control negativo. Para el modelo *in vivo*, ratones Balb/c fueron infectados por vía intratraqueal con *S. aureus* o *K. pneumoniae*, y después tratados diariamente con ciprofloxacino ( $80 \text{ mg/kg/día}$ ) o FQB-9 ( $80 \text{ mg/kg/día}$ ). Al séptimo día post-infección se sacrificaron los ratones y se obtuvieron los pulmones para realizar tinción de hematoxilina y eosina, evaluando el porcentaje de neumonía. Se encontró que FQB-9 reduce significativamente la generación de neumonía ( $5.83\%$  con *S. aureus* y  $5.96\%$  con *K. pneumoniae*) mientras que el grupo infectado sin tratamiento genera los siguientes porcentajes de neumonía:  $60.51\%$  con *S. aureus* y  $71.70\%$  con *K. pneumoniae*. El compuesto FQB-9 es un agente antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo *in vitro* de cepas bacterianas Gram positiva (*S. aureus*) y Gram negativa (*K. pneumoniae*). Además, es efectivo para disminuir la generación de neumonía aguda inducida por *S. aureus* o *K. pneumoniae* en el modelo murino.

## ABSTRACT

The discovery and implementation of antibiotics has led to a better prognosis in infectious diseases. Fluoroquinolones are a family of antibiotics with a broad spectrum of action and antibacterial effectiveness. However, bacterial strains have increased their resistance to antibiotics, for this reason, the World Health Organization has reported the urgency to develop new active molecules, therefore, different compounds were derived from fluoroquinolones by our research group, finding a compound with good antibacterial potential, which was labeled FQB-9. The objective of the research was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial effect of the derivatized FQB-9 on *S. aureus* and *K. pneumoniae* strains. The inhibition of *S. aureus* and *K. pneumoniae* (clinical isolates) was evaluated by the Kirby-Bauer technique, where FQB-9 generated average inhibition areas of  $8.55 \pm 0.395 \text{ cm}^2$  and  $8.24 \pm 1.239 \text{ cm}^2$  for the strains, respectively. For the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration, macrodilutions of FQB-9 were performed obtaining  $0.25 \mu\text{g/mL}$  in both determinations for *S. aureus*; meanwhile for *K. pneumoniae*  $1 \mu\text{g/mL}$ . To determine the safety of FQB-9, its cytotoxicity was evaluated in LLC cells, where no significant differences were found compared to the negative control group. For the *in vivo* model, Balb/c mice were infected intratracheally with *S. aureus* or *K. pneumoniae*; the animals were treated daily with ciprofloxacin (80mg/kg/day) or FQB-9 (80mg/kg/day). On the seventh day post-infection, the animals were sacrificed, and lungs were obtained for hematoxylin and eosin staining, evaluating the percentage of pneumonia. It was found that FQB-9 significantly reduced the generation of pneumonia (5.83% with *S. aureus* and 5.96% with *K. pneumoniae*) while the untreated infected group generated the following percentages of pneumonia: 60.51% with *S. aureus* and 71.70% with *K. pneumoniae*. Compound FQB-9 is an antimicrobial agent capable of inhibiting *in vitro* development of Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*K. pneumoniae*) bacterial strains. In addition, FQB-9 is effective in treating acute pneumonias induced by *S. aureus* or *K. pneumoniae* in the murine model.

## 1. Introducción

Las infecciones representan la principal causa de muerte observada de forma prominente en la humanidad, debido al desconocimiento del mecanismo o agente causal [1]. Conforme el conocimiento científico avanzó, fue posible descubrir los microorganismos y sus interacciones con los humanos, además de establecer que los mismos colonizan al propio organismo, en su mayoría siendo inofensivos [2].

Alrededor del año 1928, Alexander Fleming comenzó a realizar observaciones que posteriormente llevarían al aislamiento de los antibióticos, a partir del descubrimiento e implementación de las penicilinas [3]. Entonces comenzaron a desarrollarse distintos compuestos con estructuras similares, buscando que también poseyeran actividad antimicrobiana, lo cual permitió tratar de forma eficaz las enfermedades infecciosas, disminuyendo así la mortalidad y morbilidad en poblaciones humanas [1].

A pesar de los avances en la salud que supuso el descubrimiento de los antibióticos, su uso generalizado e irresponsable, así como la automedicación de dosis distintas a las efectivas, conllevó a la generación de resistencia farmacológica en distintas bacterias, las cuales se adaptaban y sobreviven a los tratamientos comúnmente administrados [4].

Actualmente, la farmacorresistencia bacteriana es un problema de salud pública que requiere de medidas inmediatas en la población y la comunidad científica. Debido a esto, en febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió un comunicado, donde enlista las bacterias con alta resistencia, de acuerdo con la prioridad por obtener nuevos fármacos activos para su tratamiento. Existe entonces, la necesidad generalizada en el ámbito científico de obtener nuevos compuestos farmacológicos capaces de reemplazar aquellos que han perdido potencia y eficacia, principalmente contra bacterias que muestran mayor farmacorresistencia, como lo son *S. aureus* y *Klebsiella pneumoniae* [5].

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Generalidades de las bacterias

Existen gran cantidad de enfermedades del aparato respiratorio cuyo agente etiológico pueden ser bacterias, entre ellas se enlistan desde el catarro común hasta la neumonía, amigdalitis, bronquitis aguda, bronquiolitis o laringitis; las cuales suelen presentar síntomas o signos clínicos similares, como tos, rinorrea, obstrucción nasal, etc. Estos cuadros pueden agravarse si no se recibe un tratamiento antibacteriano adecuado. Las bacterias juegan un papel importante en la colonización del epitelio respiratorio superior, donde pueden desencadenar enfermedades, o migrar al tracto respiratorio inferior, donde generalmente son más peligrosas [6].

Se solía pensar que las infecciones respiratorias eran siempre consecuencia directa de la adquisición, el crecimiento excesivo, la diseminación y la invasión de un número limitado de patógenos virales y bacterianos [7]. Sin embargo, varias décadas de investigación indican que la mayoría de los patógenos bacterianos humanos también son capaces de colonización asintomática, encontrando su nicho ecológico primario dentro del tracto respiratorio de individuos sanos, pero al alterarse su equilibrio biológico, se pueden desarrollar diferentes enfermedades infecciosas de distinta gravedad [7].

Contrario a lo que se describía en décadas pasadas, la microbiota respiratoria se asocia con enfermedades infecciosas de las vías respiratorias inferiores y afecciones relacionadas, pudiendo contribuir al desarrollo de infecciones locales o invasivas, incluyendo las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) [8].

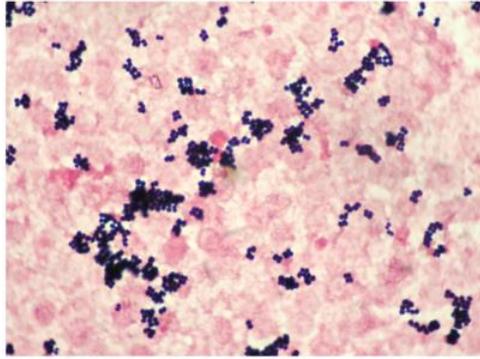
Las IRA presentan evolución en menos de 15 días, y continúan siendo la enfermedad transmisible más letal, en el año 2016 causaron tres millones de defunciones en todo el mundo. En México, constituyen la primera causa de morbilidad; y a nivel mundial, son la principal causa de muerte en la infancia y la cuarta causa más común de muerte en adultos [6, 7].

La forma grave de IRA del tracto respiratorio inferior que afecta el parénquima pulmonar en uno o ambos pulmones se conoce como neumonía. Las bacterias típicas que causan neumonía son: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* del grupo A, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, entre otros agentes patógenos [9].

La neumonía que se presentan en pacientes ambulatorios es conocida como neumonía adquirida en la comunidad (CAP, del inglés Community-Acquired Pneumonia), y ocurre cuando la defensa del huésped no es activada correctamente, o el patógeno abruma la respuesta inmune (o bien, un gran inóculo microbiano infeccioso). La propagación de bacterias virulentas en el parénquima pulmonar activa la respuesta inmune, donde actúan macrófagos, neutrófilos y células T, y se desencadena una cascada de respuesta inflamatoria (TNF- $\alpha$ , IL-8, e IL-1), aumentando la permeabilidad en los capilares del revestimiento y conduciendo a la congestión exudativa. Este proceso conforma la patogenia de la neumonía [9].

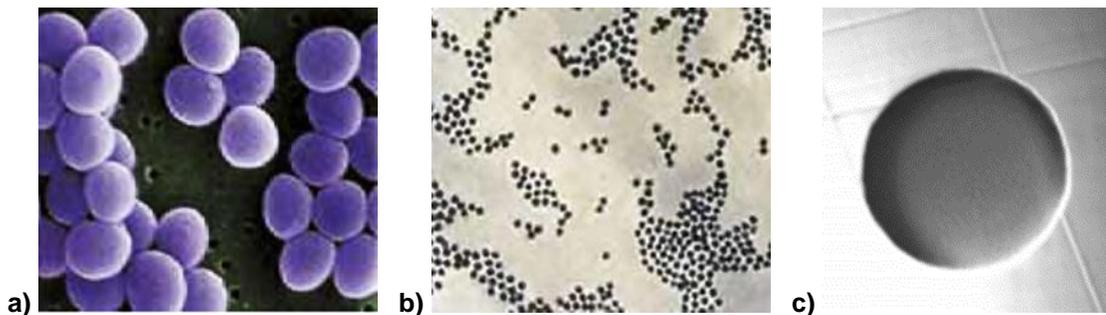
## 2.2 *Staphylococcus aureus*

La bacteria *Staphylococcus aureus* se encuentra presente en un tercio de la población, pero la mayor parte del tiempo no genera una enfermedad infecciosa. Estas bacterias son grampositivas de entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentran agrupadas en conjuntos (**figura 1**). Es capaz de infectar a todos los mamíferos, y presenta una fácil infección entre individuos, llegando a ser la principal causa en humanos de infecciones en el torrente circulatorio, y de infecciones nosocomiales, debido principalmente al retraso en la identificación de farmacorresistencia [10].



**Figura 1. *S. aureus* en tinción Gram.** Se observan las agrupaciones “en racimo” características de esta especie, y su coloración azulada, propia de bacterias Gram positivas. Tomada de: Berga, A. (2009) Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* [11]

Los estafilococos tienen forma esférica y se agrupan en racimos de forma irregular. Aunque los *S. aureus* también se pueden observar en diplococos o tétradas, la gran mayoría de las bacterias en el campo de observación se agruparán (**figuras 2a y 2b**). No son móviles, ni tampoco son esporuladas, por lo que tales características podrán ser observadas por microscopía. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros (**figura 2c**). Son anaerobias facultativas (puede desarrollarse en ausencia de oxígeno) y en las pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa, presentan un resultado positivo [10, 12].



**Figura 2. Morfología de *S. aureus*.** a) Microscopía electrónica de barrido de *S. aureus*. Las bacterias se observan de forma agrupada, característica de los estafilococos, tomado de: Buckley, D. (2015) Brock, biología de los microorganismos [13]; b) Tinción Gram de *S. aureus*. La coloración oscura tras la tinción denota a bacterias Gram positivas. Tomado de [13]; c) Morfología macroscópica de colonia de *S. aureus*. Los bordes son enteros en las colonias redondas observadas en esta especie, además de lisa y elevada. Tomado de: Han, J., et al. 2014 [14].

La bacteria *S. aureus* es una de las principales causas de intoxicación alimentaria en países industrializados, debido principalmente a la gran población presente en los mismos y a los malos hábitos de higiene de la población. Cabe mencionar que esta bacteria ha desarrollado farmacorresistencia desde hace décadas, por lo que antibióticos como la penicilina, es inefectiva en casi la totalidad de los casos [15].

*S. aureus* coloniza el organismo intermitentemente, aunque sus superficies más comunes como microbiota son la nasofaringe, ocasionalmente en piel y raramente en la vagina; en forma excepcional, se encuentra en el recto o el área perineal. Si se rompen barreras, llega tejidos subyacentes y puede acceder a canales linfáticos y al torrente sanguíneo, con la posibilidad de generar una infección riesgosa o una septicemia, desarrollo de abscesos causados por liberación de toxinas en piel y órganos, o bacteriemia estafilocócica [10, 12].

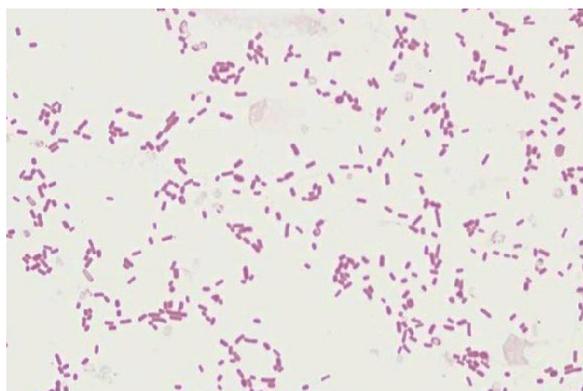
La neumonía bacteriémica por *S. aureus* es una infección grave que, hoy en día, afecta a personas con comorbilidades metabólicas. A pesar de ser una causa poco frecuente de hospitalización, posee una alta tasa de mortalidad de 38% [9].

*Staphylococcus aureus* es una bacteria endémica de México, su amplia distribución en superficies corporales y aumentada resistencia a los fármacos comunes nos evidencia la necesidad de tener alternativas para su efectiva eliminación. El tratamiento usado para combatir a *S. aureus* en una enfermedad infecciosa dependerá de la patología, donde un tratamiento efectivo en neumonías es mediante quinolonas, familia que posee amplios espectro, potencia, distribución y eficacia, por lo que las nuevas moléculas diseñadas a partir de esta familia pueden representar importantes prospectos en el diseño de nuevos fármacos efectivos [16, 17].

### ***2.3 Klebsiella pneumoniae***

La bacteria *Klebsiella pneumoniae* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales, donde resultan ser resistentes a un amplio rango de

antibióticos. Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se describe como bacilos Gram negativos encapsulados (**figura 3**), aerobios facultativos, inmóviles, y forman parte de la microbiota en un tercio de los humanos. Las personas con comorbilidades significativas son susceptibles a infecciones de gravedad, como neumonía potencialmente mortal, infecciones en sitio quirúrgico, en tracto urinario (ITU), o torrente sanguíneo [18].



**Figura 3. Tinción Gram de *Klebsiella pneumoniae* a partir de un cultivo positivo de MacConkey.** Se observan bacilos Gram negativos largos de color rojo a rosa con disposición irregular. Tomado de: Baban, S. (2017) [19]

Las especies de *Klebsiella* se han identificado como la tercera causa de neumonía adquirida en hospital en los Estados Unidos, también son la causa principal de neumonía asociada al ventilador en pacientes de las unidades de cuidados intensivos, representando el 83% de las neumonías adquiridas en el hospital. Las tasas de mortalidad en neumonías por *K. pneumoniae* se han reportado tan altas como 50% [20].

Las factores de riesgo implicados en infecciones patógenas de *K. pneumoniae* incluyen comorbilidades como diabetes mellitus, obstrucción del tracto urinario, insuficiencia renal crónica, pacientes con trasplante de órganos, diálisis, o tumores malignos [21]. Se dice entonces que *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista capaz de causar neumonía, infección del tracto urinario, y con el potencial de desarrollar infecciones diseminadas, incluidas endoftalmitis bacteriemia y meningitis [22].

*K. pneumoniae* se encuentra frecuentemente en el agua de consumo, las aguas residuales, el suelo y las superficies de las plantas. Tal microorganismo coloniza superficies de la mucosa en humanos, incluidas la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Las tasas de colonización difieren según el sitio del cuerpo. En la nasofaringe se han reportado del 3 al 15% y generalmente son más altos en adultos que en niños, donde el aumento también se asocia con el consumo de alcohol [20].

Ha habido un aumento preocupante en la adquisición de resistencia a una amplia gama de antibióticos por cepas derivadas de *K. pneumoniae* "clásica". Como consecuencia de esta resistencia a los antibióticos, infecciones simples como las ITU se han vuelto recalcitrantes al tratamiento, y las infecciones más graves como las neumonías y las bacteriemias se han vuelto potencialmente más mortales con el paso del tiempo [23].

Los regímenes actuales para la neumonía por *K. pneumoniae* adquirida en la comunidad incluyen un tratamiento de 14 días con cefalosporina de tercera o cuarta generación como monoterapia; o una quinolona respiratoria como monoterapia; o cualquiera de los regímenes anteriores junto con un aminoglucósido. Si el paciente es alérgico a la penicilina, se debe realizar un tratamiento con aztreonam o una quinolona respiratoria, lo cual recalca la importancia de esta clase de antibióticos en los tratamientos actuales [24].

Por los motivos mencionados, aunado a los extendidos reportes de infecciones bacterianas agravadas en distintas locaciones del organismo, es necesaria la utilización de fármacos denominados antibióticos, capaces de eliminar distintos tipos de bacterias (bactericidas), o que permitan incapacitar su multiplicación (bacteriostáticos) [7].

Pese a todas las dificultades que supone la interacción constante con distintas bacterias potencialmente patógenas, se han desarrollado a lo largo de la historia distintos tratamientos [7, 25, 26], siendo el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, el punto de partida para la generación y producción de moléculas con la capacidad de eliminar bacterias, cada vez más

diversificadas, complejas, con diferentes mecanismos de acción, y diferentes espectros de inhibición bacterianos [1, 25].

## 2.4 Antibióticos de mayor uso contra infecciones bacterianas

Estos tratamientos incluyen sustancias antibacterianas ampliamente recetadas, como eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina y quimioterapéuticos como la doxorubicina [25]. Los antibióticos se agrupan en familias y poseen distintos blancos de acción, es decir, la superficie o actividad bacteriana que habrán de interrumpir, promoviendo así su inhibición (**tabla 1**).

**Tabla 1. Familias de tratamientos antibacterianos.** Modificada de: Grossman, S (2014) Porth Fisiopatología [27]

Familia	Ejemplo	Blanco de acción	Efectos adversos
<b>Penicilinas</b>	Ampicilina	Pared celular	Reacciones alérgicas
<b>Cefalosporinas</b>	Cefalexina	Pared celular	Reacciones alérgicas
<b>Monobactámicos</b>	Aztreonam	Pared celular	Exantema
<b>Carbapenémicos</b>	Imipenem	Pared celular	Náuseas, diarrea
<b>Aminoglucósidos</b>	Tobramicina	Ribosomas (síntesis de proteínas)	Pérdida auditiva, nefrotoxicidad
<b>Tetraciclinas</b>	Doxiciclina	Ribosomas (síntesis de proteínas)	Irritación gastrointestinal, reacciones alérgicas, displasia de dientes y hueso
<b>Macrólidos</b>	Claritromicina	Ribosomas (síntesis de proteínas)	Colitis, reacciones alérgicas
<b>Glucopéptidos</b>	Vancomicina	Ribosomas (síntesis de proteínas)	Reacciones alérgicas, pérdida auditiva, nefrotoxicidad
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacino	ADN girasa, topoisomerasa IV (Síntesis de ADN)	Irritación gastrointestinal, rotura tendinosa
<b>Diversos</b>	Cloranfenicol Rifampicina Trimetoprim	Ribosomas Ribosomas Síntesis de ácido fólico	Anemia Hepatotoxicidad Reacciones alérgicas
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfadiazina	Síntesis de ácido fólico	Reacciones alérgicas, anemia, irritación gastrointestinal
<b>Oxazolidinonas</b>	Linezolid	Ribosomas	Diarrea, trombocitopenia
<b>Estreptograminas</b>	Quinupristin/ dalfopristin	Ribosomas	Dolores musculares y articulares
<b>Clicilcilina</b>	Tigeciclina	Ribosomas	Náuseas, vómito, diarrea
<b>Polimixinas</b>	Colisitina	Membrana	Confusión, trastornos visuales, vértigo, daño renal
<b>Lipopéptido</b>	Daptomicina	Despolarización de membrana	Náuseas, vómito, estreñimiento, diarrea, cefaleas

Se administran antibióticos a más del 10% de los niños europeos anualmente, y en los EE. UU., los antibióticos representan el 25% de todas las recetas escritas a la población pediátrica, donde los tipos más comunes son amoxicilina (derivado de la penicilina), azitromicina (macrólido) y amoxicilina/clavulanato (inhibe  $\beta$ -lactamasas). Se ha demostrado que el tratamiento con antibióticos altera drásticamente la composición de la microbiota en adultos y niños [28].

A pesar de la amplia cantidad de fármacos antibacterianos que han sido sintetizados a lo largo de los años, los microorganismos sufren cambios, buscando ser más aptos en su ambiente, o resistir las situaciones adversas, y por esto, los medicamentos utilizados para curar sus infecciones dejan de ser eficaces. A este proceso se le denomina farmacorresistencia, y reduce las posibilidades de un tratamiento eficaz para enfermedades bacterianas, además de obligar a utilizar medicamentos costosos y aumentar estancias hospitalarias. Una de las principales causas de farmacorresistencia, es el uso indiscriminado de antibióticos y los tratamientos inadecuados (generalmente debidos a la automedicación) [29].

Muchas de las bacterias ampliamente estudiadas poseen su información genética en uno o dos cromosomas circulares (aunque hay también bacterias con múltiples copias de su genoma, cromosomas múltiples, y plásmidos) a partir de los cuales son capaces de obtener sus proteínas esenciales, que en algunos casos les confieren patogenicidad [30]. Además, desde principios de este siglo, se ha descubierto que también son el origen de enzimas capaces de inactivar muchos antibióticos, tal como la AmpC  $\beta$ -lactamasa, capaz de inutilizar gran cantidad de antibióticos derivados de la penicilina [2].

Las bacterias también pueden poseer los denominados plásmidos, ADN circular extracromosomal que resultan ser los elementos genéticos móviles más importantes, ya que desempeñan un papel crucial en el desarrollo y la difusión de la resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias clínicamente relevantes, teniendo la capacidad de codificar proteínas que incrementan su virulencia y resistencia [2, 31]. Este tipo de características, sumado a la mutación en su

información genética, les permiten a estos microorganismos generar o acrecentar la resistencia a antibióticos [31].

## 2.5 Resistencia farmacológica bacteriana

Alexander Fleming realizó algunas de las observaciones sobre la resistencia a la penicilina, poco después de su implementación, declarando en 1929 que: “el crecimiento de *E. coli* y una serie de otras bacterias pertenecientes al grupo coli-tifoidea no fue inhibido por la penicilina”. Él explicó este fenómeno con la suposición de que la dosis fue muy reducida, o bien administrada por muy poco tiempo [1]. Aunque se han realizado muchos más casos similares en el transcurso de la historia, el conocimiento acerca de la farmacorresistencia bacteriana sigue presentando incógnitas, aunque de forma general, se suele considerar que esto se da como resultado de mutaciones o sobreexpresiones de material genético [1].

La resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos; es una característica inherente de la bacteria o puede ser una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso [32]. En 30-50% de los pacientes, la indicación del tratamiento, la elección del antibiótico, o la duración de la terapia es inapropiada, lo que conlleva un beneficio terapéutico cuestionable y expone a los pacientes a posibles complicaciones de la terapia con antibióticos [33].

En el año 2017, la OMS publicó un comunicado en el que enlistaba las bacterias para cuyas infecciones se requieren nuevos antibióticos, ordenadas por su prioridad, y mencionando la creciente resistencia en bacterias Gram negativas. En la **tabla 2**, se agrupan las bacterias mencionadas en tal comunicado [5]. En un nuevo comunicado en el año 2021, la OMS remarca que la tendencia de la farmacorresistencia bacteriana no se ha invertido, y ninguno de los 43 antibióticos que están actualmente en fase de desarrollo clínico podrá resolver suficientemente el problema, poniendo de manifiesto la necesidad de explorar enfoques innovadores en el desarrollo de estos fármacos [34].

**Tabla 2. Prioridad de obtención de antibióticos para distintas bacterias.** Modificado de: OMS (2017) [www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es) [5]

Prioridad	Bacterias
Crítica	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomona</i> , varias enterobacteriáceas como <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Serratia</i> , y <i>Proteus</i>
Elevada	<i>S. aureus</i> , <i>H. pylori</i> , <i>Campylobacter</i> spp, <i>Salmonellae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Shigella</i> spp.

### 3. Antecedentes

En México, la emergencia de resistencia bacteriana se ha atribuido a la automedicación y venta descontrolada de antibióticos. Además, los productos farmacéuticos catalogados como genéricos carecen de controles de calidad, favoreciendo la farmacorresistencia. Los antibióticos se vendían con gran frecuencia en décadas pasadas (40% de las ventas totales) en farmacias privadas y sin receta médica. Los denominados medicamentos similares, poseen baja potencia y biodisponibilidad, lo que exalta la farmacorresistencia de cepas bacterianas que sobreviven al tratamiento [35].

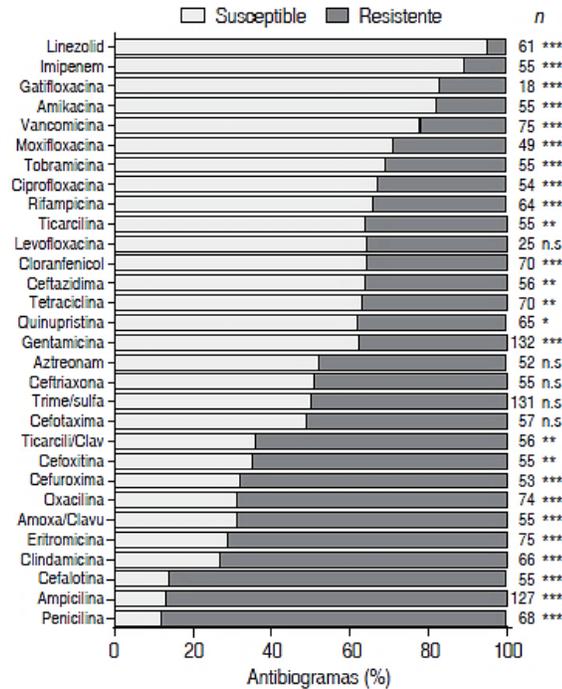
En el año 2019 se identificó que las principales bacterias con alta farmacorresistencia y causantes de infecciones hospitalarias en México son *Klebsiella* spp. resistentes a múltiples fármacos (MDR) y productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), *Enterobacter* spp. BLEE, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* MDR, MRSA y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina [36]. También se ha identificado alta resistencia en las bacterias causantes de ITU, encontrando en un estudio realizado en la Ciudad de México que en 50.4% de las cepas analizadas fueron MDR, entre las cuales destacan *E. coli* y *Klebsiella* spp. La mayor resistencia fue para ampicilina con 74.1% [37].

Se ha reportado que las infecciones nosocomiales más comunes en México son: neumonía nosocomial con 31.6% del total de infecciones en el estudio;

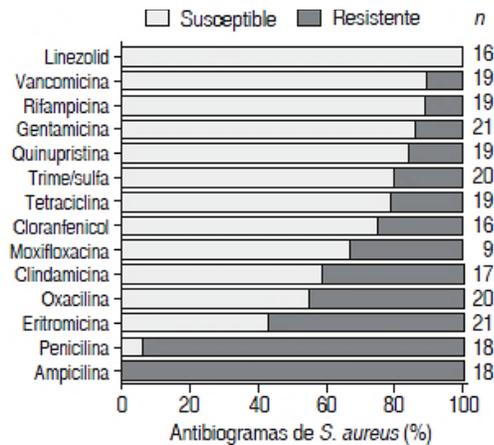
infección del sitio de inserción con 10.5%; neumonía asociada a ventilador con 9.1%; infección de vías urinarias con 8.7%; y sepsis con 8.5%. De igual forma, las bacterias identificadas con alta resistencia en otros estudios, figuran también en este reporte como las que mayor prioridad requieren en el país [38].

Recientemente, se ha estudiado también en un hospital en el norte de México, los patrones encontrados en la resistencia a antibióticos a partir de urocultivos, obteniendo resultados concordantes con los anunciados por otras regiones: los microorganismos aislados con más frecuencia fueron bacterias Gram negativas en un 85% de los cultivos, y las Gram positivas 15%, de las que *E. coli*, seguida de *Staphylococcus spp*, *Klebsiella spp* y *Pseudomonas* fueron más frecuentes. Se encontró resistencia superior al 75% a los antimicrobianos cefalotina y ampicilina; y más del 50% a quinolonas. Esto viene a recalcar las necesidad de reservar determinados antibióticos para patógenos sensibles [39].

Nuestro grupo de investigación ha publicado que fármacos como linezolid, imipenem y gatifloxacina son los más efectivos contra cepas bacterianas aisladas de pacientes con septicemia; mientras que las penicilinas, después de haber sido un fármaco sumamente utilizado en el siglo pasado, presentan recientemente la menor efectividad contra distintas bacterias analizadas (**figura 4**). De igual manera, linezolid y vancomicina fueron eficaces contra cultivos de *S. aureus*, mientras que se sigue evidenciando la gran resistencia que esta especie posee contra penicilinas (**figura 5**). Las bacterias que presentan mayor resistencia fueron *Staphylococcus hominis*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cabe mencionar que, a pesar de que en este estudio *Klebsiella pneumoniae* es la bacteria que mostró menor resistencia entre las distintas bacterias, su alta frecuencia en pacientes con septicemia hace hincapié en la necesidad de obtener nuevos tratamientos eficaces como alternativas farmacológicas [35].



**Figura 4. Resistencia bacteriana identificada en hemocultivos de pacientes de ambos géneros con septicemia.** Se puede observar en el gráfico que los antibióticos con más tiempo en el mercado, como la penicilina, suelen ser resistidos por las bacterias analizadas en el estudio; mientras que los fármacos de más reciente creación sí presentaron actividad antibacteriana. Tomada de: Rodríguez, M.S.E. (2014) [35]



**Figura 5. Resistencia farmacológica de S. aureus en hemocultivos, obtenidos de pacientes de con septicemia.** El gráfico evidencia que algunos antibióticos, como ampicilina y penicilina, han dejado de ser activos en el tratamiento de las infecciones por S. aureus, mientras que otras alternativas resultan más efectivas. Tomada de: Rodríguez M.S.E. (2014) [35]

A pesar del aumento de resistencia bacteriana, la innovación en antibióticos no ha aumentado de forma correspondiente. Si la tendencia por perder tratamientos efectivos no es revertida, podríamos enfrentar una era post-

antibiótica, donde volverían las pandemias bacterianas, y aumentarían las defunciones tras intervenciones quirúrgicas [40]. Estos efectos comienzan a observarse en distintas revisiones, donde bacterias de importancia clínica como la *K. pneumoniae* presentan una tendencia creciente a aparecer en aislados clínicos, y a la vez, muestran resistencia a antibióticos de uso común, como la amikacina, imipenem, ciprofloxacino, o cefazolina, presentando esta última un rango de resistencia cercano a 60% [41].

El aumento de farmacorresistencia requiere la continua obtención de nuevos tratamientos efectivos, especialmente para aquellas bacterias que plantean la mayor amenaza con respecto a la resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles, como lo son *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Las quinolonas, y específicamente las fluoroquinolonas, son importantes agentes antiinfecciosos, los cuales poseen aún una elevada efectividad y potencia, además de tener la posibilidad de obtener nuevos derivados [42].

En la búsqueda por nuevos fármacos, ha sido posible la obtención de compuestos con la capacidad de evadir mecanismos de resistencia, como es el caso del ozenoxacin, fluoroquinolona que presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.833 mg/L en cepas de *S. aureus* con sobreexpresión de la bomba de eflujo NorA, mientras que para ciprofloxacino se reporta 8 mg/L [41].

El nemonoxacin, una quinolona de reciente creación con capacidad bactericida para Gram positivos, ha demostrado conservar su CMI menor a 8 µg/mL al evaluarse en cepas *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, y *Enterococcus faecalis* con mutaciones inducidas, a diferencia de fármacos como ciprofloxacino o levofloxacino, que incrementaron su CMI hasta 32 µg/mL, evidenciando la capacidad que tiene la innovación en esta familia por aumentar la efectividad en nuevos compuestos [43].

Ante las perspectivas actuales, se han generado nuevos compuestos derivados de fluoroquinolonas, como el levonadifloxacino (también denominado WCK 771) que además de presentar actividad contra *S. aureus*, también se

reporta efectivo ante cepas resistentes a quinolonas, y cepas intermedias a vancomicina. La fluoroquinolona levonadifloxacina tiene CMI  $\leq 1$  mg/L ante las cepas mencionadas, a diferencia del ciprofloxacino y el levofloxacino, que alcanzan hasta 32 mg/L de CMI [44].

Dentro de las quinolonas, las fluoroquinolonas presentan una notable actividad y amplio espectro antibacteriano (**tabla 3**), siendo además efectivas contra micobacterias, contra *Escherichia coli*, algunas especies de *Salmonella* y *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* [45].

**Tabla 3. Bacterias susceptibles a la acción de fluoroquinolonas.** Modificado de: Leyva-Ramos, S. (2017) [45]

Gram negativas	Gram positivas
Enterobacteriaceae, como <i>K. pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> y otras especies de <i>Staphylococcus</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i>	Algunas especies de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i>
<i>Haemophilus</i> spp. y <i>H. influenzae</i>	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> y especies del género <i>Nocardia</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y especies del género <i>Vibrio</i>	

Los fármacos derivados de las fluoroquinolonas deben ser utilizados de forma responsable con la finalidad de evitar un tratamiento innecesario, considerando el incremento en las tasas de resistencia a los antibióticos, buscando conservar esta alternativa antibiótica por su amplio espectro de acción y su alta efectividad, lo que les permite ser activas en el tratamiento de *K. pneumoniae* y *S. aureus* susceptible a meticilina [46]. Conforme ha avanzado el desarrollo de estos fármacos, ha aumentado el conocimiento respecto a sus mecanismos de acción, diseñando moléculas con menos efectos secundarios y un ampliado espectro [47].

El interés de analizar moléculas derivadas de quinolonas radica también, en la baja resistencia que presentan las bacterias a últimas generaciones de estos fármacos, por lo que ha sido posible su utilización como primera línea de tratamiento en infecciones como pielonefritis aguda leve a moderada no complicada, aprovechando su amplia distribución y su excelente biodisponibilidad; propiedades importantes para el tratamiento de infecciones de tejidos profundos [46].

En estudios recientes, algunas quinolonas han mostrado actividad contra eucariotas, por lo que tienen un potencial como tratamiento anti-cáncer [48]; además de mostrar un efecto sinérgico antifúngico con anfotericina B, y presentar actividad sobre el VIH [45].

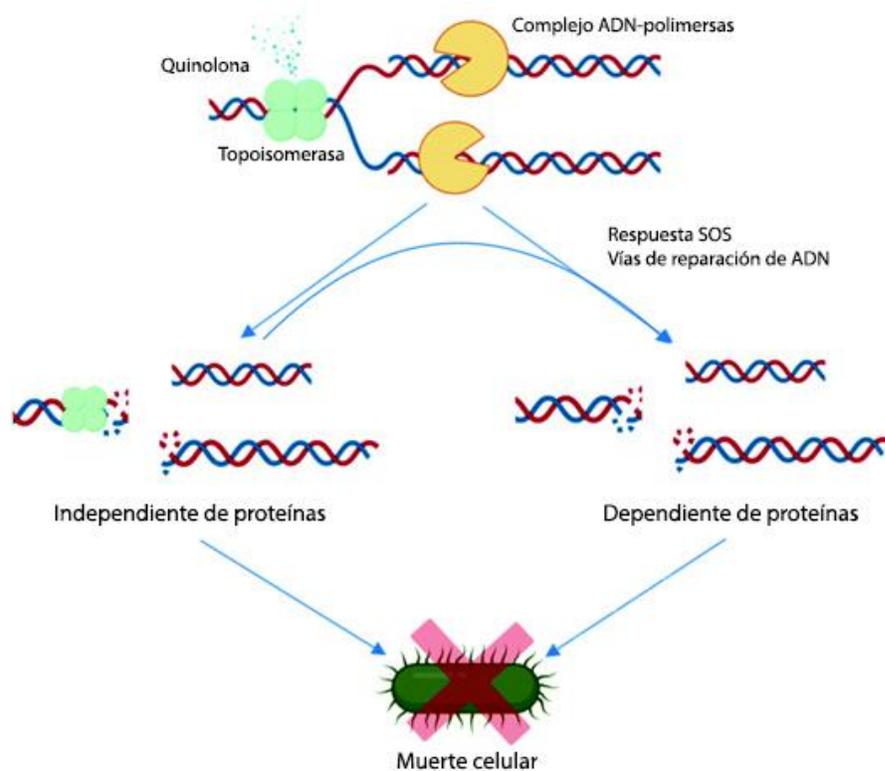
Los microorganismos MDR han podido ser tratados mediante el uso de delafloxacino, una fluoroquinolona de última generación, siendo efectiva en infecciones bacterianas agudas causadas por bacterias susceptibles [17]. Las nuevas fluoroquinolonas han presentado también actividad contra *Staphylococcus aureus*, MRSA y *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que se proyecta su uso potencial para infecciones complicadas del tracto urinario y neumonía bacteriana [17].

Las fluoroquinolonas de reciente creación han evidenciado una baja en su resistencia bacteriana y se ha eliminado la fototoxicidad. Tales fármacos son utilizados especialmente para su uso ante infecciones respiratorias que, al ser de fácil propagación y contagio, han sido capaces de presentar una acelerada farmacoresistencia [49]. Por ello, estos nuevos fármacos suelen ser reservados para casos específicos, donde las fluoroquinolonas se han convertido en una opción antimicrobiana estándar para muchas infecciones asociadas a la atención médica y adquiridas en la comunidad; no limitadas a solamente infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario o infecciones intraabdominales [49].

El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en inhibir a la girasa del ADN y la topoisomerasa IV, impidiendo así la replicación y la transcripción del

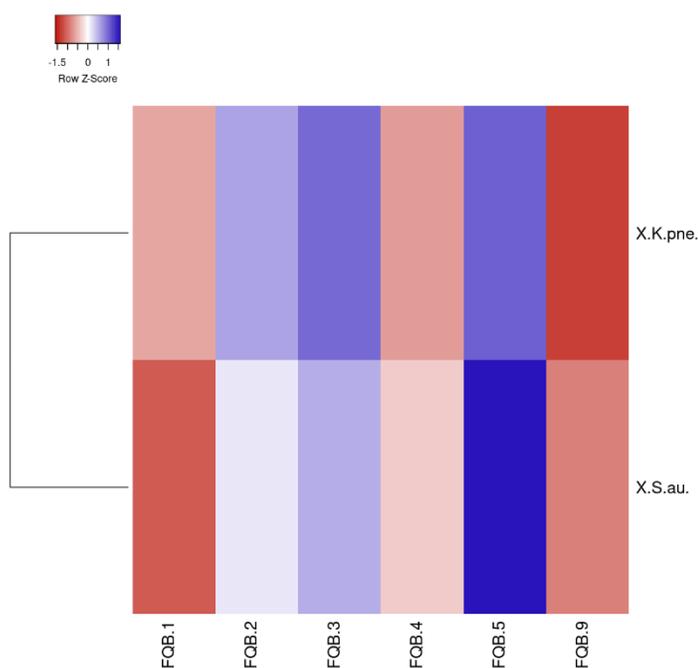
ADN bacteriano, conllevando la muerte celular (**figura 6**). Las enzimas mencionadas pertenecen a las topoisomerasas II, encargadas de evitar el superenrollamiento de ADN durante su replicación, por lo que su inhibición conduce al daño del material genético [50]. Las fluoroquinolonas también evitan la separación del complejo quinolona-enzima-ADN, con el cual colisiona la maquinaria de replicación genética, generando posteriormente daños irreparables en el cromosoma de la bacteria, conduciéndola a la apoptosis [6].

La capacidad bactericida de las fluoroquinolonas aumenta por la combinación de los rompimientos cromosomales, y la posterior desrepresión de la respuesta SOS y otras vías de reparación del ADN, tanto dependiente de proteínas (filamentos celulares extendidos), como independiente de proteínas (activación de módulos de toxina-antitoxina); pero que resultarán en la incapacidad por reparar el material genético [51].



**Figura 6. Mecanismo de acción de fluoroquinolonas.** Se observa que las quinolonas inhiben las topoisomerasas II y estabilizan el complejo formado con ADN, provocando daños al material genético, y conduciendo por distintas vías a la apoptosis de la bacteria. Modificado de: Pham, T. (2019) [51]

Como parte del trabajo de tesis doctoral de la M. en C. Mitzzy Medellín Luna, se realizaron estudios *in silico* de diversas moléculas fluoroquinolónicas sintetizadas por nuestro equipo de investigación, las cuales mostraron una interacción adecuada con topoisomerasas IIA, en las bacterias *S. aureus* y *K. pneumoniae*, presentando una puntuación de acoplamiento similar al reportado en el fármaco de referencia. Los resultados obtenidos muestran que el compuesto FQB-9 es el candidato que mejor interacción presentó con la enzima mencionada, sugiriendo su evaluación de forma experimental. Ver **figura 7**.



**Figura 7. Heat map de los acoplamientos *in silico* de los derivatizados de fluoroquinolonas con la topoisomerasa.** Análisis *in silico* con el software AutoDock Vina. La intensidad del color rojo representa la predicción de interacciones más fuertes con el sitio activo.

La estructura de las fluoroquinolonas ha sido modificada en distintos sitios en años recientes, incluso aquellos que solían reservarse porque se asumía que disminuirían su actividad (como el ácido carboxílico en posición 3). Los complejos metálicos de fluoroquinolona han mostrado una aumentada actividad antibacteriana, y también una mejoría en las propiedades fisicoquímicas, como una mayor solubilidad, propiedades farmacocinéticas y biodisponibilidad, respecto a las quinolonas de anteriores generaciones [52].

El uso de boro ha mostrado ser una alternativa para formar un complejo con un las fluoroquinolonas como sustituyente captador de electrones para activar la posición C-7 quimioselectivamente [52]. Un complejo de derivatizado fluoroquinolónico con boro, denominado FQB-9, se evalúa en esta investigación mediante distintas metodologías detalladas más adelante.

Tomando como punto de partida distintos reportes donde se evidencia la interacción de fluoroquinolonas con metales como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $B^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Bi^{2+}$  [53, 54], el derivatizado de fluoroquinolonas FQB-9 ha sido diseñado y sintetizado por nuestro equipo de investigación como un compuesto de fluoroquinolona con boro. Además, se ha observado anteriormente la actividad antibiótica de estructuras como complejos metálicos, por lo que se tienen expectativas similares para el compuesto que aquí se evalúa [55].

Nuestro grupo de investigación ha sintetizado distintos derivatizados de fluoroquinolonas, donde 12 de ellos presentan unión al átomo de Boro en C-3 de la fluoroquinolona generando el éster de borato, el cual demostró ser un componente importante para la actividad anticancerígena en anteriores evaluaciones [52] y que podría comportarse como un potencial agente quimioterapéutico con actividad antimicrobiana, ya que diversas quinolonas enlazadas a metales han mostrado actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus dysenteriae* [56].

La síntesis del derivatizado FQB-9, sigue las reacciones que han sido realizadas con anterioridad, para la obtención de varios complejos 7-sustituidos-6-fluoroquinolona-boro. Se realizó condensación de Michael (entre 3,4-difluoroanilina y malonato), catalizada por ácidos de Lewis y Brønsted en un ambiente libre de solventes. La ciclación posterior se realizó a 55°C con el reactivo de Eaton ( $P_2O_5$  /  $MeSO_3H$ ), un ácido de Brønsted. Luego, la Sustitución Nucleofílica Aromática ( $SN_{Ar}$ ) en C-7 se realizó con piperazina, que se añadió a un matraz con dimetilsulfóxido, trietilamina y difluoroboranil 1-etil-6,7-difluoroquinolona-3-carboxilato en agitación. Finalmente, se usa un tratamiento con una solución básica (NaOH 2N) para generar la estructura ácido

fluoroquinolona-3-carboxílico, denominado posteriormente como FQB-9 [55]. De esta manera, la síntesis de FQB-9 ha sido realizada y de acuerdo con estudios preliminares *in silico* por nuestro grupo de investigación, el derivatizado genera expectativas positivas para su evaluación antimicrobiana.

#### 4. Planteamiento del problema

El uso desmedido de fármacos antibacterianos, así como la utilización de medicamentos genéricos (con una farmacocinética menos favorable), han generado la aparición y diseminación de nuevas cepas bacterianas, siendo poseedoras de características que les permiten resistir a los compuestos actualmente utilizados en la clínica para el tratamiento de infecciones.

Desde hace varias décadas, los reportes de farmacorresistencia bacteriana a distintos antibióticos han sido de enorme importancia para la comunidad científica. Este fenómeno supone una disminución en la efectividad y potencia de las estrategias de primera línea contra patologías infecciosas.

El nuevo Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la OMS, ha revelado la presencia de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países que presentaban infecciones bacterianas. Las bacterias resistentes más frecuentes son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* [57].

De acuerdo con la OMS, las enfermedades farmacorresistentes ya causan al menos 700 000 muertes al año en todo el mundo, y si no se toman medidas, en el escenario más alarmante, la cifra podría aumentar a 10 millones de muertes al año para 2050 si no hay un esfuerzo sostenido por contener la resistencia a los antimicrobianos y al mismo tiempo obtener nuevos compuestos activos [58].

En México, las enfermedades respiratorias agudas son de alta prioridad en la clínica, representando la principal causa de morbilidad en la población y la primer mortalidad en niños menores de 5 años [6]. Además, el estado de

Zacatecas posee el primer lugar en incidencia de casos reportados de tales enfermedades, como lo comunica la INEGI en sus Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica. Sin embargo, a pesar del incremento de cepas resistentes a antibióticos en las dos últimas décadas, el desarrollo de nuevos antibióticos para uso clínico no ha aumentado en concordancia, siendo insuficiente para resolver un problema que se extiende de forma constante.

## 5. Justificación

El incremento de la farmacorresistencia bacteriana y la escasa generación de nuevos antibióticos exige la generación de fármacos efectivos ante bacterias de importancia clínica, como lo son *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, que a pesar de presentarse regularmente en la microbiota humana, son también agentes etiológicos en infecciones oportunistas de complicado tratamiento, como la neumonía.

Se ha demostrado que los derivados de fluoroquinolonas poseen amplio espectro bacteriano y alta eficacia, además se han disminuido las reacciones adversas en relación con las presentadas en anteriores generaciones.

En el presente trabajo, se realizó un cribado de derivatizados de fluoroquinolonas en complejos con boro sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación y se seleccionó el fármaco con mayor actividad, el cuál fue evaluado sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, mediante modelos *in vitro* e *in vivo*, permitiéndonos definir si el compuesto seleccionado representa un potencial fármaco de relevancia para los tratamientos de patologías por especies bacterianas que han presentado una amplia farmacorresistencia y cuya implementación supondría una nueva alternativa contra infecciones pulmonares causantes de neumonía aguda.

## 6. Hipótesis

El derivatizado de fluoroquinolonas seleccionado mediante el cribado disminuye la generación de neumonía aguda con mayor eficacia que el ciprofloxacino.

## 7. Objetivo General

Determinar el derivatizado de fluoroquinolonas más efectivo sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* y evaluarlo en modelo de neumonía aguda.

## 8. Objetivos Específicos

8.1 Realizar un cribado de los derivatizados de fluoroquinolonas por el método Kirby-Bauer y seleccionar el compuesto que posea la mayor actividad antibacteriana.

8.2 Evaluar por método Kirby-Bauer la inhibición de las UFC de *S. aureus* y *K. pneumoniae* en presencia de FQB-9 para determinar su curva dosis respuesta en comparación al control.

8.3 Determinar la CMI y CMB del compuesto FQB-9 para una suspensión estándar de *S. aureus* y *K. pneumoniae* mediante macrodilución en caldo.

8.4 Evaluar la citotoxicidad del compuesto FQB-9 sobre cultivos de la línea celular LLC por azul de tripano.

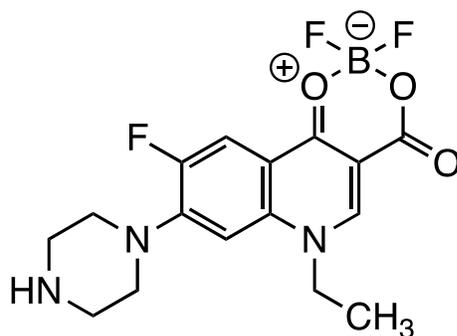
8.5 Evaluar el efecto antibacteriano del compuesto FQB-9 sobre el porcentaje de neumonía en un modelo *in vivo* de ratones BALB/c con infección intratraqueal de *S. aureus* o *K. pneumoniae*.

## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Reactivos

- Derivatizados fluoroquinolónicos borados mostrados en la **tabla 4**
- Fármaco seleccionado FQB-9 (**figura 8**)

- Suspensión de cepa bacteriana *S. aureus* obtenida de aislado clínico, caracterizada como sensible a las fluoroquinolonas (ver anexo A)
- Suspensión de cepa bacteriana *K. pneumoniae* obtenida de aislado clínico, caracterizada como BLEE+, sensible a fluoroquinolonas, (ver anexo A)
- Reactivos biológicos: ratones albinos BALB/c
- Medio de cultivo bacteriano agar Müller-Hinton (Bioxon, no. cat. 211667, México)
- Papel filtro como discos de antibiograma
- Caldo nutritivo Müller-Hinton (Bioxon, no. cat. 210300, México)
- Pentobarbital sódico como anestésico (Cheminova, no. cat. 30375-B, México)
- Medio de desarrollo DMEM suplementado con Newborn Calf Serum y penicilina/estreptomicina
- PBS
- Tripsina
- Azul de tripano



**Figura 8. Estructura del compuesto FQB-9 sintetizado por nuestro grupo de investigación.** El análogo fue evaluado *in vitro*, mediante evaluación Kirby-Bauer, se determinó su CMI, y se evaluó *in vivo* en un modelo murino de neumonía

#### 9.1.1 Control positivo

- Ciprofloxacino (Bacproin, Best, México)
- Etopósido (Tosuben, PiSA, México)

### 9.1.2 Control negativo

- DMSO
- Agua estéril

## 9.2 Evaluación Kirby Bauer

El desarrollo de la técnica Kirby-Bauer para evidenciar la actividad de un compuesto antimicrobiano sobre una determinada cepa bacteriana, requiere sensidiscos de papel filtro estériles, que son utilizados para cargar los distintos compuestos a analizar. La esterilización del material a utilizar se llevó a cabo en autoclave por calor húmedo, con una presión de 10-15 psi, durante 15 minutos, lo que corresponde a una temperatura de 240-250 °C.

En la presente metodología, se utilizaron cepas de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* (sensible a las fluoroquinolonas) y *Klebsiella pneumoniae*, (BLEE+, sensible a fluoroquinolonas) caracterizadas y desarrolladas en agar EMB en los laboratorios de microbiología de la Universidad Autónoma de Zacatecas. A partir de estos medios, se realizan resiembras para asegurar que las cepas estén aisladas de otras contaminantes. Se tomaron 2-3 UFC del desarrollo en los medios mencionados, y se inocularon tubos con caldo nutritivo, que fueron posteriormente incubados a 37 °C durante 24 horas.

Las pruebas Kirby-Bauer requieren la utilización de una suspensión bacteriana estándar de 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), fueron preparadas mediante un espectrofotómetro UV-Vis, con una absorbancia de 0.074-0.09, a longitud de onda de 625 nm.

Con un aplicador estéril de algodón, se realizó un estriado masivo con la suspensión bacteriana 0.5 McFarland sobre placas con medio de cultivo MH. Los sensidiscos estériles son cargados con distintas concentraciones de derivatizados de fluoroquinolonas (0.1 µg, 1 µg, 5 µg o 10 µg).

Las placas inoculadas fueron divididas de la siguiente forma: 1. DMSO (5 µL); 2. Control positivo de ciprofloxacino (5 µg); 3. Control de desarrollo (nada se

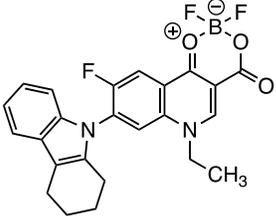
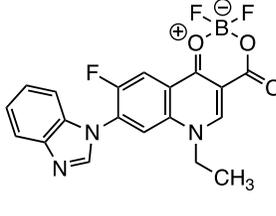
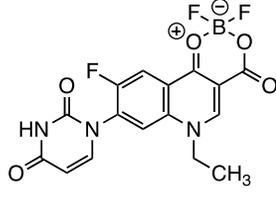
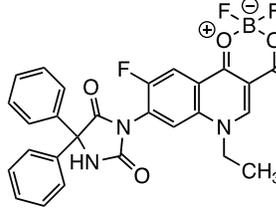
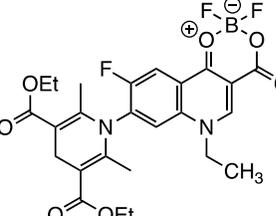
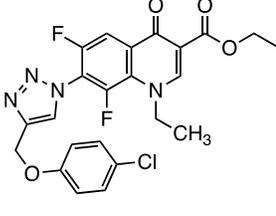
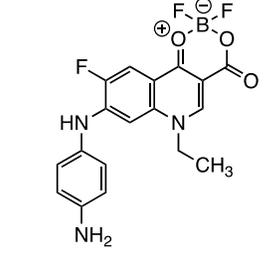
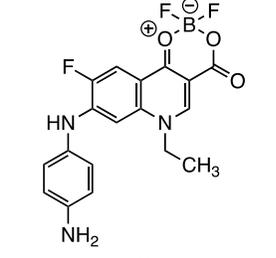
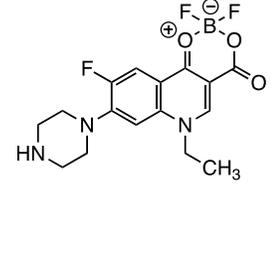
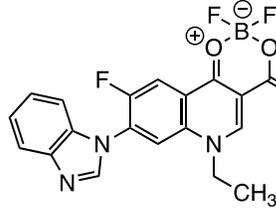
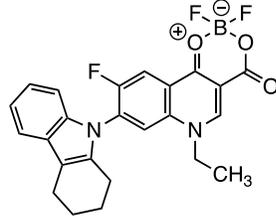
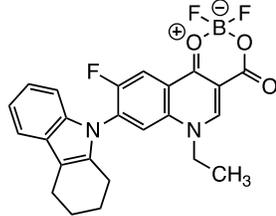
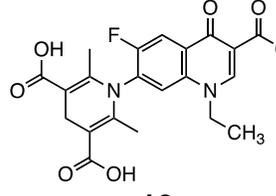
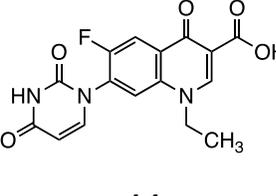
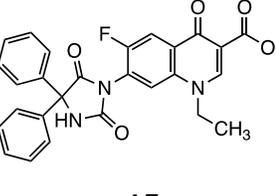
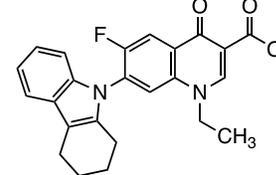
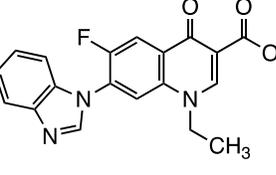
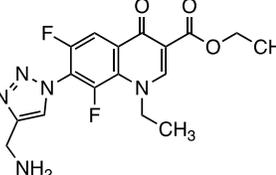
añade en esta parte de la placa); 4, 5 y 6 corresponden a distintas concentraciones del compuesto experimental. Cabe recordar que este procedimiento es realizado en *S. aureus* y *K. pneumoniae*, ambos por triplicado.

Por otro lado, para la evaluación de los compuestos derivados de fluoroquinolona, se etiquetaron con un número y se identificaron por el heterociclo amínico unido en C-7 del anillo de la quinolona-boro o quinolona-ácido carboxílico (hidrolizado) como se muestra en la **tabla 4**. Estos compuestos repiten su estructura en algunos casos, pero se evalúan por separado al haber sido sintetizados en distintas locaciones. Adicionalmente, se utilizaron dos fluoroquinolonas con triazoles y un flúor en C-8, las cuales se denominaron como **FQT**, como se observa en la **tabla 5**. Sin embargo, sólo el FQT-5 fue evaluado por Kirby-Bauer al ser una quinolona difluorada sin actividad reportada, identificando distintas concentraciones y etiquetándolo como 18, 19 y 20.

**Tabla 4. Identificación de compuestos evaluados en el cribado por Kirby-Bauer**

Etiqueta	Sustituyente en C-7 de la FQ o DFQ	Etiqueta	Sustituyente en C-7 de la FQ o DFQ
<b>Preparación de vial a 1 mg/mL en DMSO</b>			
<b>1</b>	tetrahydrocarbazolil (Boro)	<b>7</b>	Tetrahydrocarbazolil
<b>2</b>	benzimidazolil (Boro)	<b>8</b>	( <i>p</i> -aminofenil) amino
<b>3</b>	uracil (Boro)	<b>9</b>	Piperazinil
<b>4</b>	hidantoinil (Boro)	<b>10</b>	Benzimidazolil
<b>5</b>	1,4-dihidropiridinil (Boro)	<b>11</b>	Tetrahydrocarbazolil
<b>6</b>	1 <i>H</i> -1,2,3-triazolil	<b>12</b>	Tetrahydrocarbazolil
<b>Preparación de vial a 1 mg/mL en agua estéril, utilizando NaOH para favorecer la disolución</b>			
<b>13</b>	1,4-dihidropiridinil (hidrolizado)	<b>16</b>	tetrahydrocarbazolil (hidrolizado)
<b>14</b>	uracil (hidrolizado)	<b>17</b>	benzimidazolil (hidrolizado)
<b>15</b>	hidantoinil (hidrolizado)		
<b>Preparación de vial a 1 mg/mL en DMSO</b>			
<b>18</b>	FQT-5 (1 µL)	<b>20</b>	FQT-5 (20 µL)
<b>19</b>	FQT-5 (10 µL)		

Tabla 5. Estructuras de compuestos evaluados en cribado por Kirby-Bauer

 <p><b>Etiqueta</b> <b>1</b></p>	 <p><b>2</b></p>	 <p><b>3</b></p>
 <p><b>Etiqueta</b> <b>4</b></p>	 <p><b>5</b></p>	 <p><b>6</b></p>
 <p><b>Etiqueta</b> <b>7</b></p>	 <p><b>8</b></p>	 <p><b>9</b></p>
 <p><b>Etiqueta</b> <b>10</b></p>	 <p><b>11</b></p>	 <p><b>12</b></p>
 <p><b>Etiqueta</b> <b>13</b></p>	 <p><b>14</b></p>	 <p><b>15</b></p>
 <p><b>Etiqueta</b> <b>16</b></p>	 <p><b>17</b></p>	 <p><b>18</b>   <b>19</b>   <b>20</b></p>

Por otro lado, los compuestos 13-17 fueron disueltos en medios alcalino (adición de NaOH), obteniendo la disolución final en el rango de pH de 8 a 12, como se presentan en la **tabla 6**. El empleo de una solución alcalina hacia el cultivo bacteriano podría influir en los resultados finales, sin embargo, el mayor halo de inhibición observado se presentó con el compuesto 17, el cual presenta un pH de 8 denotando que el efecto antibacteriano se debe a los compuestos y no a la solución alcalina.

**Tabla 6. Valores de pH en las disoluciones acuosas de los compuestos 13-17**

Etiqueta del compuesto	Sustituyente en C-7 de la FQ	pH
13	Dihidropiridinil (hidrolizado)	11
14	Uracil (hidrolizado)	10
15	Hidantoinil (hidrolizado)	12
16	Carbazolil (hidrolizado)	11
17	Benzimidazolil (hidrolizado)	8

Los valores de pH en las disoluciones, solo se determinaron para los compuestos 13-17, ya que son los únicos utilizados con el ácido carboxílico en C-3 del anillo quinolónico (hidrolizada) y, por tanto, se empleó NaOH para favorecer la solubilidad en medio acuoso, variando los rangos de pH.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó en cepas almacenadas por la Universidad Autónoma de Zacatecas procedentes de aislados clínicos. Las cepas se seleccionaron por su sensibilidad ante el control positivo de ciprofloxacino y su buen desarrollo en los medios Müller-Hinton, denominándolas cepa 0 *Staphylococcus aureus* y cepa 0 *Klebsiella pneumoniae*.

En cada división de las placas de cultivo, se colocó el sensidisco con su contenido correspondiente y las placas son ingresadas a incubadora durante 24 horas a 37 °C. Tras el desarrollo de UFC y halos de inhibición, se tomaron

imágenes digitales, utilizando una escala métrica como referencia, colocada sobre la misma placa. Haciendo uso del software ImageJ, se estableció la relación pixeles/cm y se obtuvo el resultado correspondiente al área de los halos de inhibición en cm<sup>2</sup>.

### 9.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante macrodilución en caldo

La técnica realizada para evaluar CMI, fue mediante el uso de macrodiluciones, para lo cual fueron preparadas suspensiones bacterianas estandarizadas de  $5 \times 10^4$  UFC/mL de las cepas seleccionadas, y se utilizó caldo nutritivo para diluir el compuesto experimental.

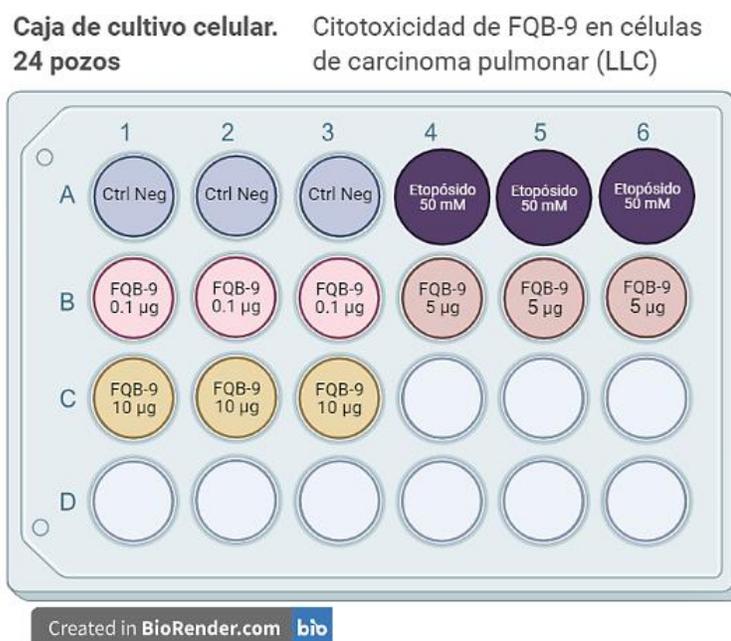
Se realizaron 8 diluciones seriadas en caldo nutritivo de nuestro derivatizado experimental (para cada cepa bacteriana), utilizando como control positivo ciprofloxacino. Las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* fueron inoculadas en los tubos con las diluciones, y se incubaron por 24 h a 37 °C. Tras este tiempo, se verifica la menor dilución que no presentó turbidez, siendo tal concentración la menor capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Esta concentración representa la CMI.

A partir de los últimos tubos sin desarrollo bacteriano, se realizó un estriado en placa de agar, y tras incubación por 24 h a 37 °C, se verificó cuáles son capaces de generar UFC. El tubo con menor concentración de compuesto, que no permita el desarrollo posterior de UFC, es considerado que posee la concentración mínima bactericida (CMB).

### 9.4 Evaluación de citotoxicidad de FQB-9 en cultivo celular

Se realizó el cultivo de la línea celular LLC al interior de una campana de flujo laminar en placas de 24 pozos en medio DMEM suplementado con New Born Serum al 12 % y con penicilina/estreptomicina. En la placa de 24 pozos cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se administraron los estímulos control positivo (etopósido 50 mM), así como, dosis crecientes del compuesto FQB-9 (0.1,

5 y 10  $\mu\text{g}$ ) y posteriormente se incubó a 37 °C con 5 %  $\text{CO}_2$ . Dicho cultivo celular se llevó a cabo en 2 experimentos independientes por triplicado (ver **figura 9**). Posterior a la incubación se retiró el medio de cultivo DMEM y se realizó un lavado con PBS para posteriormente agregar tripsina y disgregar las células de los pozos y teñirlas con azul de tripano. Las células teñidas fueron cuantificadas y reportadas en porcentaje de mortalidad, siendo las células teñidas en azul no viables (debido a la interrupción de su membrana celular y carencia de activación de bombas de expulsión del colorante), mientras que las células refringentes son células viables. La cuantificación se llevó a cabo en la cámara de Neubauer con un microscopio óptico con objetivo de 40x, contabilizando los 4 cuadrantes exteriores de la cuadrícula en la cámara. Este procedimiento se repitió para cada pozo de la placa de cultivo celular.



**Figura 9. Diseño experimental para determinar la citotoxicidad de los derivados de fluoroquinolonas sobre células microcíticas de cáncer de pulmón.** Relación de las concentraciones de los reactivos utilizados en el ensayo. Línea A: pozos del 1 al 3 como control negativo, poseen el cultivo celular pero ningún tratamiento; pozos 4 al 6 se utiliza etopósido como el control positivo (50 mM); Líneas B y C: el compuesto FQB-9 en 3 concentraciones distintas, 0.1, 5 y 10  $\mu\text{g}$ . Todos los tratamientos se realizaron por triplicado

## 9.5 Modelo *in vivo* de neumonía aguda

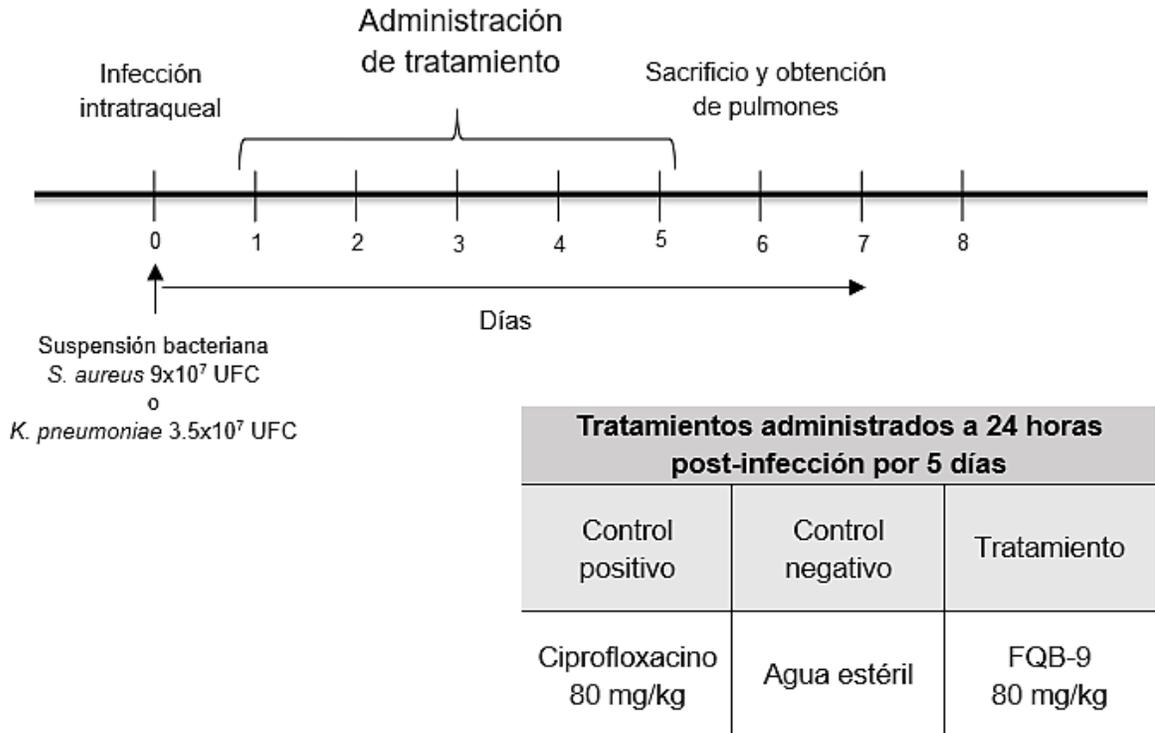
Se utilizaron 32 ratones albinos BALB/c machos y hembras disponibles en el bioterio con edades entre las 10 a 12 semanas. Este rango de edades no modifica los resultados de acuerdo con los valores reportados en otros modelos de neumonía [59, 60]. Los ratones fueron divididos en 4 grupos experimentales por cepa bacteriana con 4 ratones por grupo, nombrados como: grupo control sin infección; grupo con infección de sin tratamiento; grupo con infección y administración de ciprofloxacino; grupo con infección de y administración de FQB-9. Fueron alojados en un ambiente libre de patógenos con periodos de luz/oscuridad de 12 horas, y recibieron alimento estéril y agua *ad libitum*.

Para generar la infección, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (1.5 mL/Kg) y entonces se inocularon con 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de *S. aureus* con  $9 \times 10^7$  UFC resuspendidas en agua destilada a través de una cánula de calibre 22 por vía intratraqueal. Para llevar a cabo la intubación, se colocó al animal anestesiado apoyado sobre el esternón con la mandíbula inferior sujeta por detrás de los incisivos y la mandíbula superior elevada con una banda, permitiendo que se mantenga la boca abierta [61]. Este procedimiento se repitió para los grupos experimentales infectados con *K. pneumoniae* a una concentración de  $3.5 \times 10^7$  UFC.

El efecto antimicrobiano de FQB-9 se administró intraperitonealmente 24 horas post-infección, con dosis diarias de 80 mg/kg durante 5 días consecutivos (ver **figura 10**), seleccionando esta vía, al ser apropiada para la administración de volúmenes relativamente grandes en pequeños roedores, y que permite una rápida absorción [61]. También se realizó la administración del ciprofloxacino a la dosis de 80 mg/kg, el cual fue utilizado como control positivo, bajo el mismo esquema de tratamiento que FQB-9. Esta dosis fue seleccionada para los tratamientos administrados al ser la reportada en la bibliografía para el ciprofloxacino y otras fluoroquinolonas en modelos murinos de neumonía aguda [62, 63]. Los ratones se observaron diariamente, y además de verificar cambios físicos (de presentarse), se monitoreó su peso corporal, buscando que se permita

la sobrevivencia de los ratones, y la disminución en el desarrollo de neumonía respecto a los grupos infectados que no reciben tratamiento [35, 60, 64]. Al sexto día los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital sódico. Se realizó disección para obtener el pulmón derecho de cada ratón sacrificado, los pulmones fueron perfundidos con formol por inoculación intratraqueal, lo cual permite una mejor preservación de su morfología [65]. Después se conservaron en formalina a pH 7,0 durante 24 a 48 horas, y fueron embebidos en parafina, se cortó en secciones de 2  $\mu\text{m}$ , y después del desparafinado en xileno y rehidratación en concentraciones decrecientes de etanol, se realizaron tinciones con H y E, con posteriores deshidratación, aclarado, y montaje, para finalmente realizar un análisis histopatológico microscópico observado en laminilla a 10x y 40x [59, 60, 64]. Esta metodología histológica fue realizada en el laboratorio de patología del HGZ 1 IMSS.

Se tomaron fotografías digitales con un microscopio invertido Olympus® con objetivo de 10x y posteriormente se analizaron las imágenes con el software Image J, el cual permite establecer de forma digital el tejido sano y el patológico para determinar el porcentaje de neumonía. Las áreas neumónicas se identificaron como aquellas donde sea notable la disminución de espacios alveolares y la infiltración de células inmunes [66, 67].



**Figura 10. Diseño de tratamiento experimental.** La infección se realizó al día cero, con 9x10<sup>7</sup> UFC de *S. aureus* o 3.5x10<sup>7</sup> UFC de *K. pneumoniae*. Los tratamientos fueron administrados 24 horas post-infección, durante 5 días consecutivos, sacrificando los ratones y extrayendo los pulmones al sexto día

## 9.6 Comité de bioética

Los animales fueron manejados de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; siendo sometidos los estudios y posteriormente aprobados por el Comité de Ética Institucional de acuerdo con las pautas de las Regulaciones Nacionales Mexicanas sobre Cuidado y Experimentación Animal, con la clave de aceptación SACS/UAZ/308/2020.

## 9.7 Análisis estadístico

Mediante el análisis estadístico, se determinó la normalidad de los datos recolectados, haciendo uso de la prueba Shapiro-Wilk en las evaluaciones *in vitro*, y la prueba Kolmogórov-Smirnov en la evaluación *in vivo* de áreas neumónicas.

Los datos obtenidos presentaron distribución normal, y fueron analizados con ANOVA de una vía, y post-test de Tukey, los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Estas pruebas y las gráficas representativas fueron realizadas en el software GraphPad Prism 8.0.2.

## 10. Resultados

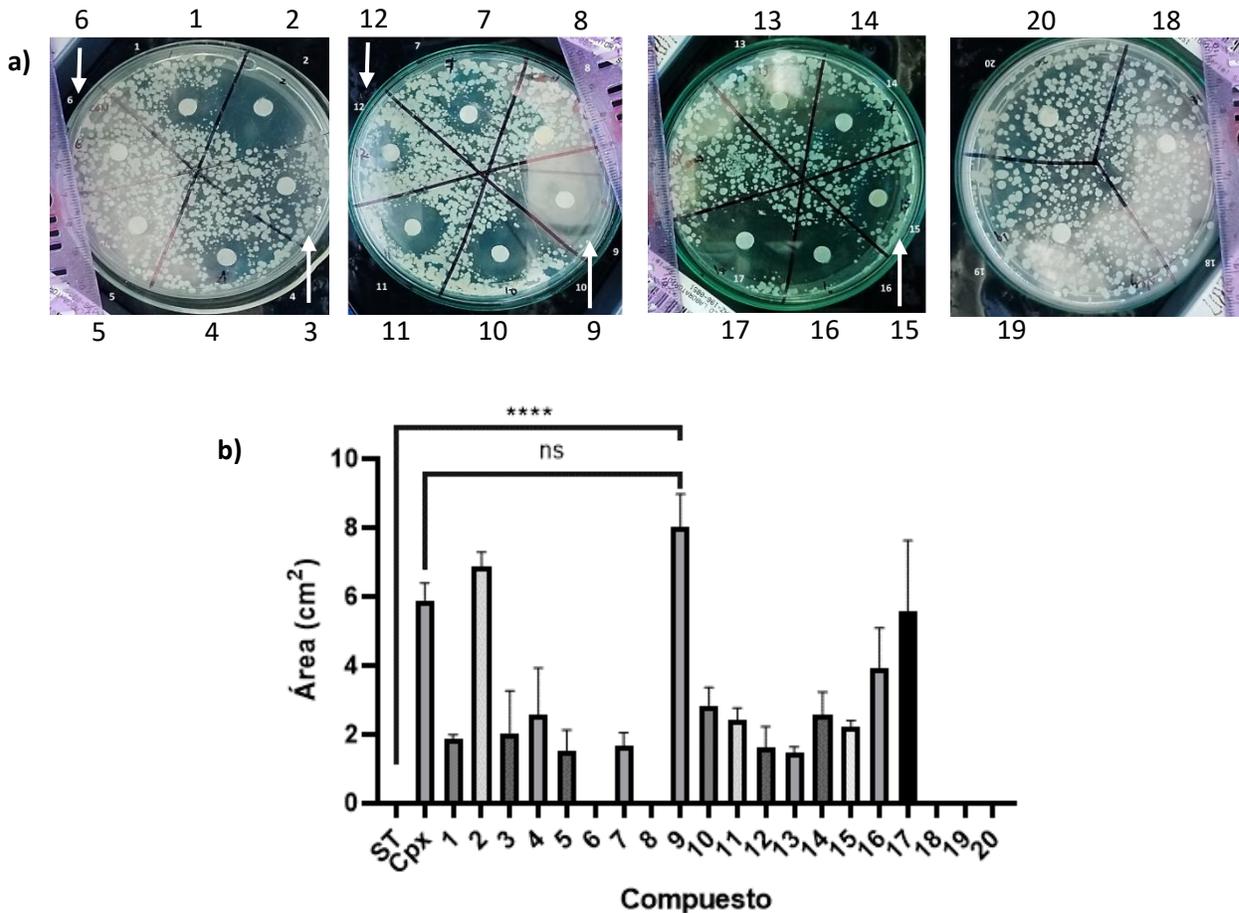
### 10.1 Evaluación Antimicrobiana de los compuestos derivatizados de fluoroquinolonas

Como punto de partida, se realizó un cribado a los 18 compuestos ya sintetizados por nuestro grupo de trabajo, con el objetivo de seleccionar el derivado de fluoroquinolona con la mejor actividad antimicrobiana. Para ello, se apoyó en los procedimientos protocolarios del Clinical Laboratory Standards Institute, mediante la evaluación de Kirby-Bauer [68].

La **figura 11a** muestra el área promedio de inhibición de los compuestos 1 al 20, obtenidas en el cribado (realizado contra *Klebsiella pneumoniae* cepa 0), se añaden imágenes representativas donde se observa una inhibición mayor a 4 cm<sup>2</sup> en los compuestos 2, 9, 16 y 17. Mientras que los compuestos 6, 8, 18, 19 y 20 no muestran efecto inhibitorio, por lo que fueron descartados del estudio. El resto de los compuestos obtuvieron al menos 1.45 cm<sup>2</sup> de inhibición.

Los resultados obtenidos en esta técnica de cribado fueron graficados en la **figura 11b**, donde se muestra la media y la desviación estándar del porcentaje de áreas de inhibición, mostrando resultados congruentes entre grupos en experimentos repetidos. Tras el análisis estadístico, se resalta que los compuestos 2, 9 y 17 no tienen diferencia significativa en comparación a los resultados obtenidos por el control positivo ciprofloxacino. Esto indica que el efecto antibacteriano del compuesto comercial ciprofloxacino es equivalente al efecto mostrado por FQB-2, FQB-9, FQB-16 y FQB-17. Sin embargo, el compuesto FQB-9, correspondiente al grupo funcional 7-piperazinil, obtuvo más de 8 cm<sup>2</sup> de inhibición, representando el compuesto con mayor efecto inhibitorio de los

derivatizados evaluados. Debido a la alta actividad mostrada por el FQB-9, este derivatizado fue seleccionado para continuar con las evaluaciones de efectividad.



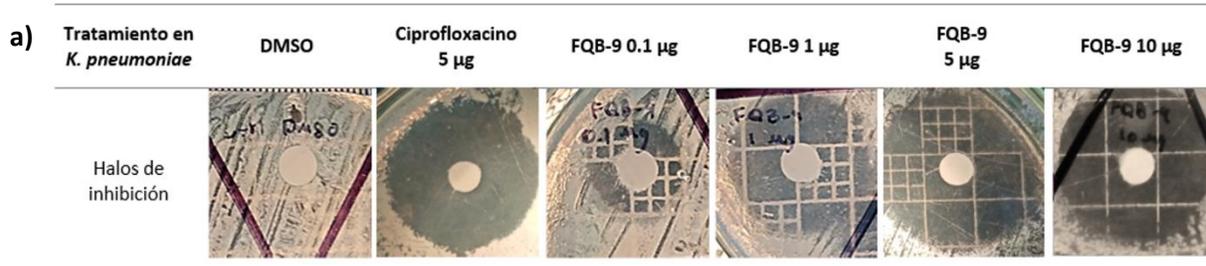
**Figura 11. Áreas de inhibición obtenidas por compuestos evaluados en *K. pneumoniae*.**  
a) Imágenes representativas de los halos de inhibición generados por los derivatizados fluoroquinolónicos contra *K. pneumoniae* en agar MH, realizados por triplicado a concentración única de 5µg. b) Se graficó la media y la desviación estándar del área de inhibición en evaluación Kirby-Bauer por triplicado de los derivatizados de fluoroquinolonas en cultivo de *K. pneumoniae*. Sin tratamiento (ST) fue utilizado como control negativo, mientras que el ciprofloxacino (Cpx) como control positivo antibacteriano. Análisis estadístico de ANOVA de una vía, post-test de Tukey, ns: no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

Una vez seleccionado el derivatizado, se realizó una curva dosis respuesta para determinar la concentración óptima antibacteriana. Además, debido a la alta eficacia mostrada en una bacteria Gram negativa, como lo es *K. pneumoniae*, se decidió evaluar FQB-9 ante una cepa Gram positiva como es *S. aureus*, que

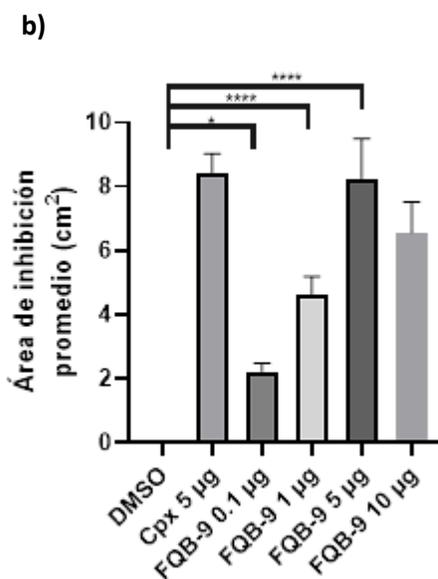
comúnmente genera infecciones en vías respiratorias. A continuación, se presentan los resultados de la evaluación Kirby-Bauer al FQB-9 a distintas concentraciones y comparado con el ciprofloxacino como control positivo, así como el DMSO (que fue utilizado como vehículo para disolver el derivatizado) como control negativo.

Los halos de inhibición formados fueron fotografiados, algunas imágenes representativas se organizaron en las **figuras 12a y 13a**, donde se observa que el incremento en el halo de inhibición es dependiente de la concentración del FBQ-9. El efecto mostrado en 5 $\mu$ g no tuvo diferencias significativas con respecto a 10  $\mu$ g, por lo que se seleccionó la concentración de 5  $\mu$ g para las siguientes evaluaciones.

Los resultados de las áreas de los halos de inhibición fueron nuevamente medidos por medio del software Image J, y fueron posteriormente graficados en las **figuras 12b** en *K. pneumoniae* y **13b** en *S. aureus*, donde podemos observar la equivalencia entre el uso de ciprofloxacino y el FQB-9 en ambas cepas, siendo esto buen indicio para continuar con el resto de las evaluaciones utilizando este derivado quinolónico, al haberse obtenido más de 8 cm<sup>2</sup> en los halos para ambas cepas bacterianas (8.244 cm<sup>2</sup> promedio en *K. pneumoniae* y 8.549 cm<sup>2</sup> promedio en *S. aureus*).



*K. pneumoniae*

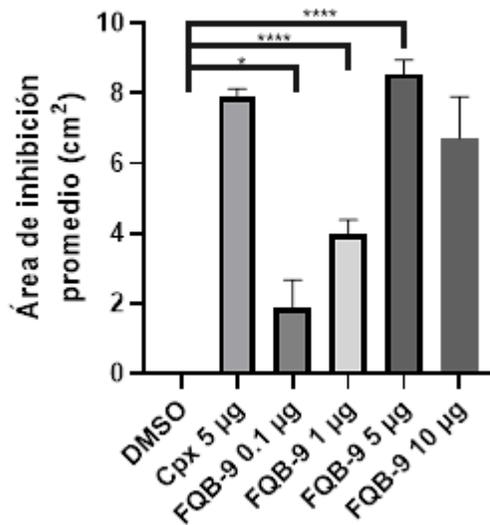


**Figura 12. Área de inhibición promedio de FQB-9 contra *K. pneumoniae*, evaluación Kirby-Bauer.** a) Imágenes representativas de los halos de inhibición generados por FQB-9 en cultivo de *K. pneumoniae* en agar MH, realizados por triplicado en las concentraciones 0.1µg, 1µg, 5µg y 10µg. b) Se graficó la media y la desviación estándar del área de inhibición de 3 experimentos por triplicado del compuesto FQB-9 en cultivo de *K. pneumoniae*. DMSO (vehículo) y ciprofloxacino (Cpx) como control positivo antibacteriano. Análisis estadístico ANOVA de una vía, post-test de Tukey, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$



*S. aureus*

b)



**Figura 13. Área de inhibición promedio de FQB-9 contra *S. aureus*, evaluación Kirby-Bauer.** a) Imágenes representativas de los halos de inhibición generados por FQB-9 en cultivo de *S. aureus* en agar MH, realizados por triplicado en las concentraciones 0.1µg, 1µg, 5µg y 10µg. b) Se graficó la media y la desviación estándar del área de inhibición de 3 experimentos por triplicado del compuesto FQB-9 en cultivo de *S. aureus*. DMSO (vehículo) y ciprofloxacino (Cpx) como control positivo antibacteriano. Análisis estadístico ANOVA de una vía, post-test de Tukey, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$

El DMSO, que es utilizado como vehículo para diluir el compuesto derivatizado, no es capaz de generar halos de inhibición bacteriana en la cepa de *S. aureus*, ni en *K. pneumoniae*, por lo cual, el efecto antibacteriano generado corresponde al compuesto FQB-9.

La evidencia obtenida en las evaluaciones Kirby-Bauer muestran la capacidad del compuesto FQB-9 por inhibir las cepas bacterianas utilizadas, por lo tanto, se prosiguió con la obtención de las CMI, con la finalidad de obtener la

potencia de estos compuestos comparadas con el fármaco de referencia ciprofloxacino.

## 10.2 Evaluación de CMI por macrodilución y CMB en agar MH

El procedimiento de macrodiluciones fue iniciado con una muestra de ciprofloxacino, buscando evidenciar su potencia antibacteriana con la cepa de *S. aureus* utilizada en esta experimentación. La dilución seriada revela que la concentración de 0.25 µg/mL, es la menor en inhibir el desarrollo. Se realizó una resiembra a partir de la concentración 0.25 µg/mL, para evidenciar si eran capaces de desarrollar UFC en medio MH, aún tras la presencia del ciprofloxacino. Se observó desarrollo de colonias, por lo que al realizar un incremento en la concentración del ciprofloxacino a 0.5 µg/mL, se encuentra su CMB.

Se realizó el mismo procedimiento para el compuesto FQB-9, el cual nos permitió observar la inhibición del desarrollo bacteriano de *S. aureus*, de igual forma observando la inhibición del desarrollo de turbidez en algunas diluciones del compuesto. Se observa la inhibición en la dilución correspondiente a 0.25 µg/mL, comparable con la CMI del ciprofloxacino. Al inocularse placas de medio MH con los últimos caldos que muestran inhibición, no se presentó desarrollo de *S. aureus*, por lo que se considera que su CMB es de 0.25 µg/mL de FQB-9, mostrando mayor potencia que el control con ciprofloxacino.

La evaluación por macrodiluciones también fue realizada en *K. pneumoniae* con ciprofloxacino, lo que resultó en la inhibición del desarrollo de esta bacteria en la concentración de 1 µg/mL, y al realizar su resiembra para verificar la actividad bactericida, hubo desarrollo de UFC en la placa correspondiente a tal concentración, por lo que al aumentar la concentración de ciprofloxacino a 2 µg/mL, no hubo crecimiento bacteriano, determinando entonces que la CMB es de 2 µg/mL.

Se utilizó también esta cepa de *K. pneumoniae* para evaluar la CMI del FQB-9, y tras realizar los procedimientos para las macrodiluciones, se observó

una CMI de 1 µg/mL. La resiembra a esta concentración no generó desarrollo de UFC en agar MH; por lo que su CMB es considerada también como 1 µg/mL para el FQB-9 en *K. pneumoniae*.

Las determinaciones de CMI en el derivatizado FQB-9 permitieron observar la potencia de este, pudiendo correlacionarlo y compararlo con la encontrada en el ciprofloxacino, mostrando que el FQB-9 tiene la misma CMI que el ciprofloxacino en *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, la CMB de FQB-9 es menor que la determinada con el ciprofloxacino en ambas cepas, lo que deja en evidencia una mayor potencia bactericida de nuestro compuesto en comparación al fármaco de referencia ciprofloxacino. Ver **tabla 7**.

**Tabla 7. Resultados de CMI y CMB para FQB-9**

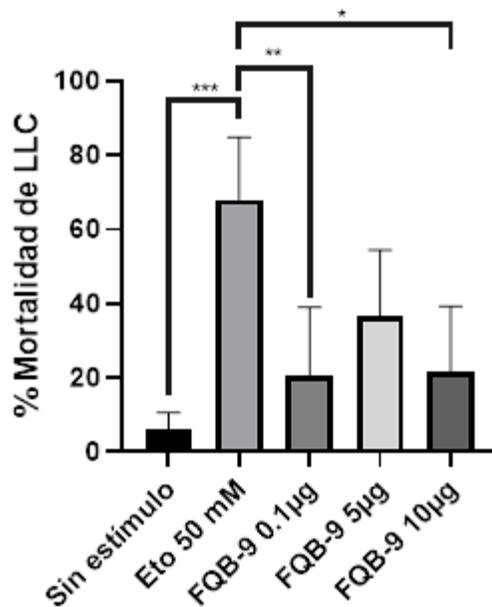
Cepa bacteriana	Compuesto	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	Ciprofloxacino	0.25	0.5
	FQB-9	0.25	0.25
<i>K. pneumoniae</i>	Ciprofloxacino	1	2
	FQB-9	1	1

Debido a los favorables resultados obtenidos con las evaluaciones *in vitro* de FQB-9, mostrando su alta eficacia y potencia sobre las cepas bacterianas seleccionadas, se procedió a evaluar la seguridad del compuesto FQB-9 sobre células eucariotas para conocer su especificidad.

### 10.3 Evaluación del compuesto FQB-9 en la citotoxicidad en cultivo de células LLC

Como ya se ha mencionado, nuestro compuesto FQB-9 tiene afinidad por las topoisomerasas bacterianas, por lo tanto, para evaluar la seguridad y selectividad de nuestro compuesto en bacterias, utilizamos un cultivo de células LLC que sobreexpresan topoisomerasas eucariotas. Se contabilizaron las células vivas y muertas (teñidas con azul de tripano), y se obtuvieron los porcentajes de células muertas ante el estímulo de etopósido como control positivo (inductor de apoptosis con afinidad a topoisomerasas eucariotas), y ante el estímulo del compuesto FQB-9, con 0.1 µg, 5 µg y 10 µg.

Los resultados del etopósido muestran una mortalidad promedio de 75%, lo cual tiene diferencias significativas con el 25% de mortalidad que induce nuestro compuesto FQB-9 a las concentraciones utilizadas en los ensayos de efectividad antimicrobiana. A pesar de la tendencia en la generación de mortalidad de las células LLC con el compuesto FQB-9, no representa una diferencia significativa respecto al grupo sin estímulo, que posee un 15% de mortalidad promedio. Estos resultados indican que el compuesto FQB-9 no induce efecto citotóxico relevante en células eucariotas con una expresión aumentada de topoisomerasas (**gráfica 1**).



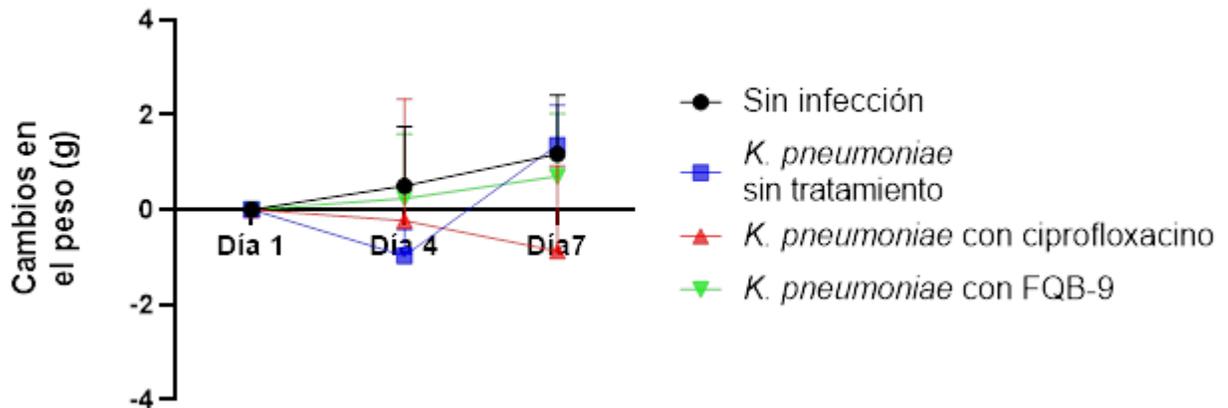
**Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad en células LLC.** Cultivo de células LLC en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se graficó la media y la desviación estándar representante de dos experimentos independientes por triplicado. Se utilizaron: grupo sin estímulo; Eto 50 mM (etopósido) como control positivo de mortalidad; FQB-9 0.1µg, 5 µg, 10 µg. Todos los estímulos fueron durante 24 h. Se realizó ANOVA de una vía con post-test Tukey, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

## 10.4 Evaluación de FQB-9 en modelo *in vivo* de neumonía aguda

### 10.4.1 Neumonía inducida con *K. pneumoniae*

Se graficó el cambio de los pesos en gramos de los ratones en los distintos grupos, antes de la infección, durante el tratamiento y el día del sacrificio, como se muestra en la **gráfica 2**. Para observar pequeños cambios en el peso, se normalizó y se estableció el valor de 0 como punto de corte para analizar el nivel de cambio asociado al proceso de neumonía. Los ratones de grupo control sin infección al término del experimento ganan en promedio 1 g de peso, mientras que el grupo infectado con *K. pneumoniae* presenta a la mitad del experimento (día 4) una caída en el peso, que se revierte al final del estudio. Los ratones infectados y tratados con ciprofloxacino muestran una tendencia a la disminución del peso hasta el final del estudio. Por otro lado, los ratones infectados y tratados con el compuesto FQB-9 muestran una cinética comparable con los ratones carentes de

infección, sin embargo, a pesar de las tendencias antes descritas, entre los grupos no se observan diferencias significativas.

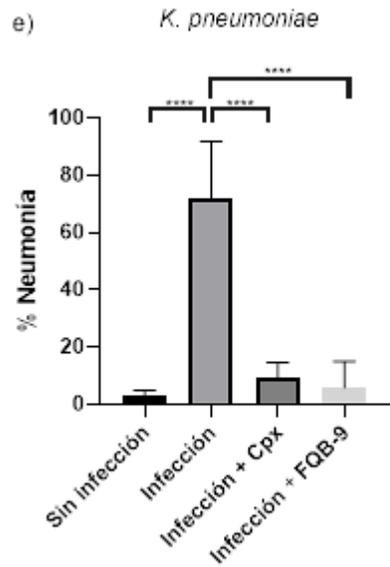
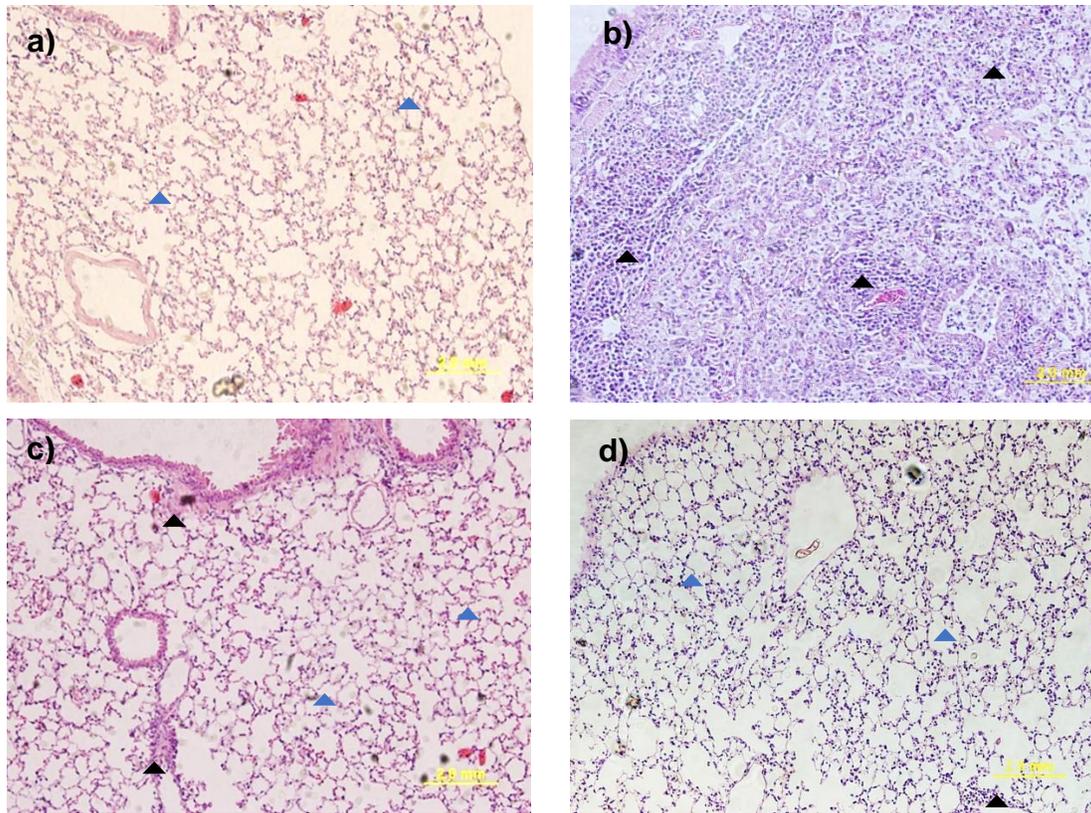


**Gráfica 2. Diferencia de gramos en el peso diario de grupos infectados por *K. pneumoniae*.** Se graficó la media y la desviación estándar del cambio promedio en el peso en los grupos experimentales especificados, a partir de su medición cada 24 h, desde el día 1 antes de la infección, el día 4 (mitad del experimento), hasta el día 7 post-infección. Se normalizó y se estableció el valor de 0 como punto de corte para analizar el nivel de cambio asociado al proceso de neumonía. Se realizó ANOVA de dos vías, post-test de Sidak,  $*p < 0.05$ , sin diferencias significativas.

Se analizaron 8 campos de imágenes digitales, que representan la totalidad del pulmón analizado por ratón, cuyos valores fueron promediados por grupo experimental, con una  $n=4$  ratones por grupo, y se seleccionó una imagen representativa de cada grupo, que se presentan en las **figuras 14a al 14d**. En la figura **14a** se observa una imagen representativa del tejido pulmonar sano de ratones sin infección, las puntas de flecha azules muestran el tejido alveolar sin infiltraciones de células inmunes. En la figura **14b** se observa una imagen representativa de los ratones infectados con *K. pneumoniae* sin tratamiento, donde las puntas de flecha negras precisan la infiltración de células inmunes en el parénquima pulmonar, observándose así disminución de tamaño en alveolos. En la figura **14c** se observa la imagen representativa de ratones infectados con tratamiento de ciprofloxacino, donde se muestra con la cabeza de flecha negra algunos focos de neumonía, mientras que con las cabezas de flecha azules se representa el tejido alveolar sano. En la figura **14d** se observa la imagen representativa de ratones infectados con administración de FQB-9, evidenciando

nuevamente con ayuda de las puntas de flecha negras y azules, las áreas de tejido neumónico o sano, respectivamente.

Los ratones sin infección presentaron muy pocas áreas neumónicas en el tejido pulmonar, siendo significativamente menor respecto al grupo con *K. pneumoniae* sin tratamiento, que presentó un 71.7% de área neumónica promedio. Es notorio el descenso significativo en el porcentaje de neumonía en el grupo infectados con *K. pneumoniae* y tratados con ciprofloxacino, respecto al grupo infectado sin tratamiento. Igualmente, al analizar distintas áreas del tejido pulmonar en ratones que fueron infectados con *K. pneumoniae* y tratados con el compuesto FQB-9, obtuvimos un 5.96% en promedio de zonas neumónicas, significativamente menor respecto al grupo infectado con *K. pneumoniae* sin tratamiento, observando también una tendencia a menor generación de neumonía en los ratones que recibieron FQB-9, respecto a los tratados con ciprofloxacino, como se puede observar en la **figura 14e**.



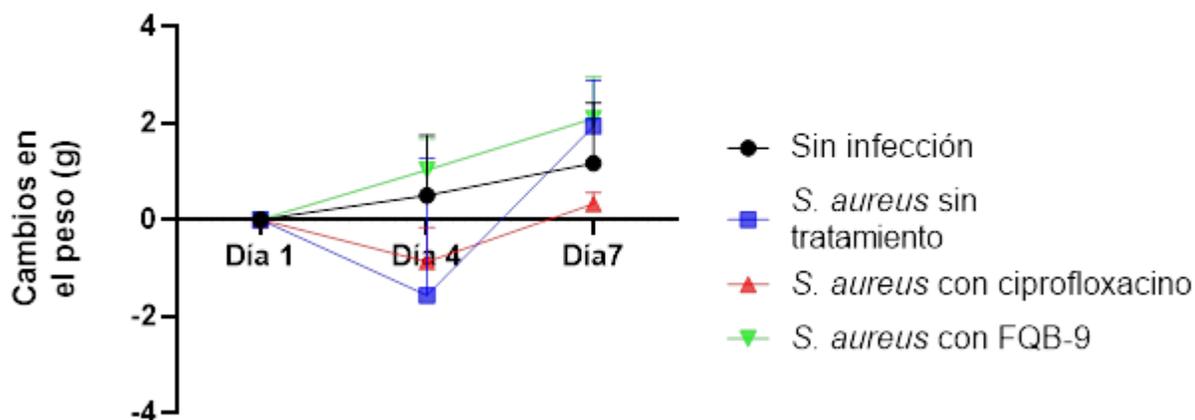
**Figura 14. Áreas neumónicas en cortes histológicos de pulmón tras infección con *K. pneumoniae*.** Imágenes representativas de tejido pulmonar con tinción H y E de ratones Balb/c n=4 por grupo experimental. a) Ratones control sin infección; b) Infección de *K. pneumoniae* sin tratamiento; c) Infección de *K. pneumoniae* con tratamiento de ciprofloxacino; d) Infección de *K. pneumoniae* con administración de FQB-9; e) Se graficó la media y la desviación estándar del porcentaje de área de neumonía determinado en grupos experimentales, el cual se estableció mediante la cuantificación de las áreas con características neumónicas, respecto al total observado en imágenes digitales del tejido pulmonar mediante el software Image J. Las cabezas de flecha

azules señalan tejido alveolar sano, mientras que las cabezas de flecha negras apuntan a zonas de lesión neumónica. Análisis estadístico de ANOVA de una vía, post-test de Tukey, donde las diferencias significativas se expresan de la siguiente forma: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

Los resultados obtenidos tras la infección de *K. pneumoniae* y la administración de los tratamientos, indican la eficacia del FQB-9 por disminuir el porcentaje de neumonía en el grupo experimental de forma equivalente al ciprofloxacino. Una vez evidenciado el efecto del FQB-9 contra esta cepa Gram negativa, se presentan los resultados obtenidos contra una cepa Gram positiva, *S. aureus*.

#### 10.4.2 Neumonía inducida con *S. aureus*

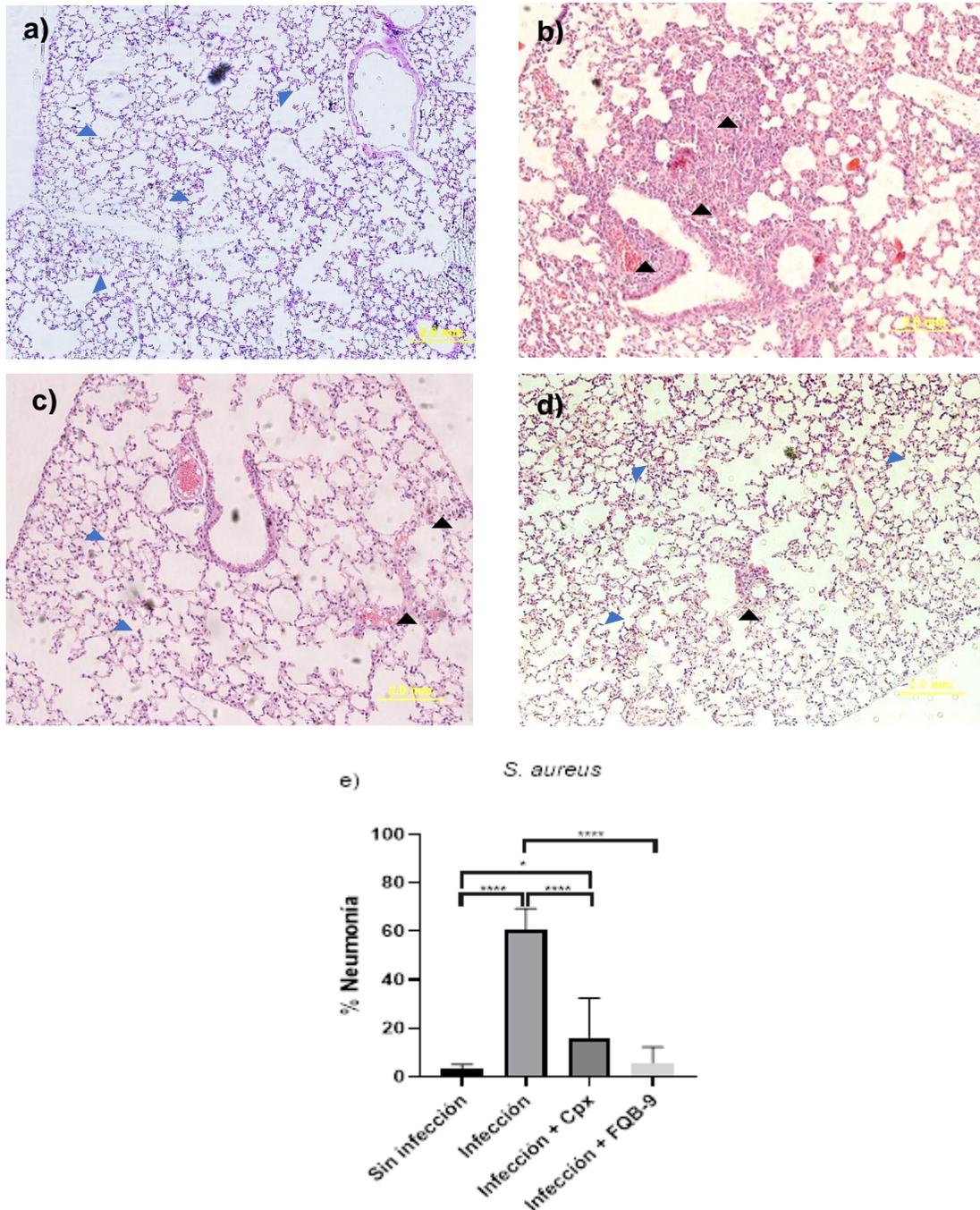
El modelo experimental realizado siguió las mismas pautas establecidas en el modelo *in vivo* ya descrito, esta vez mediante la administración intratraqueal de  $9 \times 10^7$  UFC de *S. aureus* en los ratones. Tras registrarse el peso diario de los grupos durante el experimento, no se observó un cambio significativo. El grupo sin infección registró aumentos de 0.5 g en el día 4, y 1.16 g para el día 7 de la experimentación. En el grupo infectado con *S. aureus* sin tratamiento, se registró un descenso de 1.56 g en promedio para el día 4, y un aumento de 1.93 g el día 7. El grupo con infección de *S. aureus* y tratamiento de ciprofloxacino, desciende en promedio 0.86 g para el día cuatro, y recupera 0.33 g respecto al peso original en el día 7. En cambio, el grupo infectado con *S. aureus* y administrado con FQB-9, muestra un aumento de peso promedio de 1.03 g ya en el día 4, y al final de la experimentación, un aumento de 2.1 g. Para ilustrar los cambios en el peso, se normalizó y se estableció el valor de 0 como punto de corte para analizar el nivel de cambio asociado al proceso de neumonía. Tal comparativa se observa en la **gráfica 3**.



**Gráfica 3. Diferencia de gramos en el peso diario de grupos infectados por *S. aureus*.** Se graficó la media y la desviación estándar del cambio promedio de peso en los grupos experimentales especificados, a partir de su medición cada 24 h, desde el día 1 (antes de la infección), hasta el día 7 post-infección. Se normalizó y se estableció el valor de 0 como punto de corte para analizar el nivel de cambio asociado al proceso de neumonía. Se realizó ANOVA de dos vías, post-test de Sidak, \* $p < 0.05$ , sin diferencias significativas.

A continuación, se muestran imágenes representativas del tejido pulmonar tras el análisis de las áreas neumónicas promedio. En la figura **15a**, se observa una imagen representativa del tejido pulmonar sano de ratones sin infección, las puntas de flecha azules muestran el tejido alveolar sin infiltraciones de células inmunes. En la figura **15b**, correspondiente al grupo infectado con *S. aureus* sin tratamiento, es evidente la presencia extendida de zonas neumónicas, determinadas en un promedio de 60.51% de las áreas contabilizadas, donde las puntas de flecha negras precisan la infiltración de células inmunes en el parénquima pulmonar. En la figura **15c**, representativa del grupo infectado con *S. aureus* y administración de ciprofloxacino, se observa un promedio de 16.11% de áreas neumónicas, menor de forma significativa respecto al grupo sin tratamiento, y de forma equivalente, en la figura **15d**, se observa el grupo infectado con *S. aureus* y administración del FQB-9, donde se mostró una disminución en el porcentaje de neumonía, siendo establecido en un promedio de 5.84%. En ambos casos, se muestra con la cabeza de flecha negra algunos focos de neumonía, mientras que con las cabezas de flecha azules se representa el tejido alveolar sano. Se observa una tendencia menor en la generación de neumonía en el grupo

administrado con FQB-9, respecto al grupo con ciprofloxacino. El análisis de los resultados promediados de las imágenes por grupos se presenta en la figura 15e.



**Figura 15. Áreas neumónicas en cortes histológicos de pulmón tras infección con *S. aureus*.** Imágenes representativas de tejido pulmonar con tinción H y E de ratones Balb/c n=4 por grupo experimental. a) Ratones control sin infección; b) Infección de *S. aureus* sin tratamiento; c) Infección de *S. aureus* con tratamiento de ciprofloxacino. d) Infección de *S. aureus* con administración de FQB-9; e) Se graficó la media y la desviación estándar del porcentaje de área de

neumonía determinado en grupos experimentales, el cual se estableció mediante la cuantificación de las áreas con características neumónicas, respecto al total observado en imágenes digitales del tejido pulmonar mediante el software Image J. Las cabezas de flecha azules señalan tejido alveolar sano, mientras que las cabezas de flecha negras apuntan a zonas de lesión neumónica. Análisis estadístico de ANOVA de una vía, post-test de Tukey, donde las diferencias significativas se expresan de la siguiente forma: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

Mediante el desarrollo de las metodologías destinadas a la evaluación del derivatizado FQB-9 en modelo *in vivo*, fue posible observar la capacidad que tiene la técnica de infección intratraqueal para generar la infección aguda en los ratones, utilizando las concentraciones anteriormente mencionadas. De igual forma se observó la disminución del porcentaje de área neumónica en cortes histológicos de pulmón, cuando se administraron los tratamientos. Al administrar el compuesto FQB-9 se observó que el porcentaje del área con neumonía en tejido pulmonar es equivalente respecto al porcentaje obtenido en los grupos administrados con ciprofloxacino, con tendencia a un menor porcentaje al administrar el FQB-9 en el grupo infectado con *S. aureus*.

## 11. Discusión

En la actualidad, la obtención de nuevos compuestos antibióticos se ha vuelto una prioridad en la investigación, como ya lo ha hecho saber la OMS [58], la farmacorresistencia seguirá aumentando y se espera que para el 2050, sea la principal causante de defunciones. En este trabajo, se evaluó el compuesto FQB-9 como agente antimicrobiano potencial proveniente de derivatizados de fluoroquinolonas. Este compuesto, al poseer un complejo con boro, mejora la actividad biológica, como lo ha reportado Hernández-López, *et al.* [69], aumentando las expectativas por la actividad antibiótica.

El compuesto FQB-9 muestra una notoria actividad antibacteriana al evaluarse en las cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae*, al realizar la técnica de Kirby-Bauer descrita por el CLSI [68]. A partir de los lineamientos del CLSI, se consideran sensibles los halos de inhibición en *S. aureus*  $>21\text{mm}$ , y en *K. pneumoniae*  $>26\text{ mm}$  [70]. De acuerdo con estos lineamientos, el FQB-9 muestra

efectividad sobre ambas cepas a concentraciones de 5 µg y 10 µg, el cual es comparable con el ciprofloxacino con 5 µg [71]. Entre estas dos concentraciones no hay diferencias significativas, sin embargo, a 5 µg de FQB-9 hay una tendencia a incrementar el halo de inhibición en comparación a la concentración de 10 µg, esto puede deberse a una disminución en la difusión del compuesto en el agar debido a tener mayor concentración en el disco [72].

A partir de la determinación de la actividad antibacteriana obtenida en las evaluaciones *in vitro*, se prosiguió a determinar la potencia del compuesto FQB-9 mediante la técnica de macrodilución, lo que nos permitió establecer la CMI. El compuesto FQB-9 presenta una CMI menor (0.5 µg/mL para *S. aureus*), a la sugerida en los lineamientos del CLSI para considerar a las cepas como sensibles ( $\leq 1$  µg/mL) [70]. Estudios realizados en cepas silvestres de *S. aureus* donde evaluó el efecto del norfloxacino, se obtuvieron hasta 49.87 µg/mL de CMI [73], mientras que nuestro compuesto FQB-9 tiene una menor CMI, probablemente a la adición del complejo con boro.

Corso *et al.* [74] reportaron la CMI de ciprofloxacino en 64 µg/mL para cepas silvestres de *K. pneumoniae*, a diferencia de la CMI de 1 µg/mL obtenida por FQB-9 para *K. pneumoniae* sensible a fluoroquinolonas, utilizada en nuestra investigación (como se muestra en el anexo A). La CMI de FQB-9 es comparable con la que encontramos en nuestro control positivo de ciprofloxacino, lo que da clara evidencia de la efectividad del compuesto FQB-9.

Por otro lado, la CMB del FQB-9 contra *S. aureus* (0.25 µg/mL) fue menor a la del ciprofloxacino (0.5 µg/mL); así como la CMB de derivados de fluoroquinolonas reportados Watanabe *et al.* CMB de 37.5 µg/mL contra *S. aureus* [75]. E incluso, son resultados similares al delafloxacino, fármaco utilizado en la práctica clínica y evaluado por Thabit *et al.* [76], quienes reportan una CMI para *K. pneumoniae* de 0.5 µg/mL, y para *S. aureus* de 0.25 µg/mL. Estos hallazgos nos indican una efectividad prometedora del FQB-9.

McCurdy *et al.* [77] evaluó el delafloxacino en bacterias aisladas de pacientes adultos con neumonía, donde observó el desarrollo de resistencia del

aislado de *K. pneumoniae* presentando una CMI de >256 µg/mL. Estos datos indican que, a pesar del desarrollo de nuevos compuestos con actividad antibiótica, las bacterias desarrollan mecanismos de resistencia que pudieran limitar la actividad de estos compuestos.

Estudios realizados por Norouzbahari *et al.* [78] sintetizó compuestos híbridos de ciprofloxacino y sarafloxacino, añadiendo distintos sustituyentes alrededor del anillo quinolónico, mostrando alta actividad contra Gram positivas, pero baja actividad contra bacterias Gram negativas, por ejemplo, *K. pneumoniae* con una CMI >64 µg/mL. Estos resultados proveen evidencia de que no todos los compuestos fluoroquinolónicos, o híbridos de fluoroquinolonas tendrán un efecto bactericida o inhibitorio en el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Por otro lado, es observable la tendencia del FQB-9 a incrementar la citotoxicidad en las células tumorales, sin observarse diferencias significativas. Nuestro compuesto no genera toxicidad importante como lo reportado por Bezwada *et al* [79], el cual observan que el ciprofloxacino en células corneales induce una citotoxicidad mayor al 90%. Por su parte, Ptaszyńska *et al* [80] reportan que el ciprofloxacino no generó hemólisis en sus evaluaciones, a diferencia de los nuevos híbridos de quinolonas que evaluaron, y que obtuvieron mortalidad mayor a un 50%, a partir de 6 µM. Por su parte, Lavorgna *et al* [81] reportan la actividad citotóxica del ácido pipemídico (de estructura fluoroquinolónica) ante células tumorales de las líneas MCF-7 (78.08%) y HepG-2 (94.27%).

La suspensión utilizada por nuestro modelo de neumonía aguda fue de  $3.5 \times 10^7$  UFC de *K. pneumoniae*, concentración superior a la reportada por Dietert *et al* ( $3.5 \times 10^5$  UFC) [59], pero similar a la de Esposito *et al*, de  $2.3 \times 10^8$  UFC [82]. Mientras que, las suspensiones utilizadas para la infección de *S. aureus* fueron de  $9 \times 10^7$  UFC, concentración cercana a la reportada por Esposito *et al* ( $3 \times 10^8$  UFC) [82], y por Kim y Missiakas (de 2 a  $4 \times 10^8$  UFC) [83]. Estas suspensiones utilizadas en el modelo de neumonía aguda tanto para *S. aureus* como para *K. pneumoniae*, fueron óptimas para el desarrollo experimental, y además permiten la

sobrevivencia de los reactivos biológicos, como lo indica Hraiech *et al* [67]. Nuestro modelo *in vivo* de neumonía no requirió de la administración de un tratamiento inmunosupresor para generar la infección en ratones sanos, debido a que se suministró la concentración necesaria de UFC por vía intratraqueal, superior a algunas concentraciones encontradas en la literatura. En cambio, otros autores como Sheppard *et al* y Ku *et al* [84, 85] utilizaron 100-250 mg de ciclofosfamida para establecer un modelo de neumonía.

Durante la infección en el modelo de neumonía, los ratones pierden peso debido al montaje de la respuesta inmunológica, como se ha mencionado en la literatura [86]. Los grupos de animales tratados con ciprofloxacino no logran recuperar adecuadamente su peso, debido probablemente a las reacciones adversas reportadas por este compuesto, de las cuales son: náuseas vómito, diarrea, dolor abdominal, anemia hemolítica, entre otros [87-89]. Zhu *et al* [90] han reportado la pérdida de peso en modelos murinos tratados con ciprofloxacino, sugiriendo que se debe a la anorexia inducida por este fármaco. Este fenómeno de pérdida de peso en los ratones no se observa al administrar el FQB-9, lo cual puede reflejar la capacidad bactericida del compuesto sobre la infección, y es probable que no induzca anorexia como la reportada con el ciprofloxacino. Estas observaciones son independientes del tipo de infección realizado en el modelo experimental, por lo tanto, es necesario que en estudios futuros se evalúe a detalle el fenómeno de cambios en el peso durante el proceso de neumonía.

Otros compuestos con potencial actividad antibiótica, han sido evaluados mediante modelos de neumonía, como los denominados “ziracin” o el “KBP-7072” [91, 92]. En el caso del “ziracin”, reportado por Wang *et al.* [91], las fotografías muestran mayor porcentaje de neumonía que las mostradas por nuestro compuesto FQB-9. De la misma manera, los resultados del compuesto “KBP-7072” [92] no representan una disminución en el desarrollo de la neumonía proporcional a la ejercida por el FQB-9.

Otros antibióticos de nueva generación como la antofloxacina [93] y delafloxacino [94], se evaluaron respectivamente en *S. aureus* obteniendo CMI de

$\leq 0.25$   $\mu\text{g/mL}$ ; y en *K. pneumoniae* obteniendo CMI de  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$ . Estos compuestos además se evaluaron en un modelo murino de neumonía, donde se reportó que para lograr la eliminación de *K. pneumoniae* en 1-Log respecto a la carga inicial, se requirió de una media de 235 mg/kg/día de delafloxacino. Para obtener resultados bactericidas con antofloxacina para *S. aureus* se requirió  $>10$  mg/kg/12h. En estos resultados, a comparación con los obtenidos por nuestro grupo de investigación, administramos para FQB-9 80mg/kg/día, independientemente del tipo de cepa bacteriana. El delafloxacino se administró a dosis mayores inhibir *K. pneumoniae*, mientras que antofloxacina se administra cada 12 horas para obtener efectos significativos en *S. aureus*. Esto indica que nuestro compuesto FQB-9 podría tener un perfil de amplio espectro, sin variar la dosificación dependiente de patógenos.

El mecanismo por el que el compuesto FQB-9 tiene actividad antibiótica ante *S. aureus* y *K. pneumoniae* no ha sido dilucidado aún, pero se han realizado evaluaciones de docking en el grupo de investigación. Estas simulaciones muestran la posible concordancia con lo reportado en la literatura para otros complejos de fluoroquinolona-ion metal, los cuales evidencian afinidad y unión a la girasa bacteriana y al ADN conformando un complejo ternario [95]. También se reporta la interacción de este tipo de compuestos, con la topoisomerasa IV conduciendo a bacteriostasis, roturas de la doble hélice de ADN, fragmentación cromosómica, formación de especies reactivas de oxígeno, y apoptosis [96, 97].

La evidencia obtenida muestra que el compuesto FQB-9 es capaz de inhibir la infección respiratoria grave provocada en el modelo murino de neumonía aguda, por ende, se tienen expectativas positivas respecto a su posible utilización futura para conformar una alternativa terapéutica.

## 12. Conclusiones

El compuesto FQB-9 es una fluoroquinolona borada con un potente efecto bactericida en cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Además, es efectivo para disminuir el desarrollo de las neumonías agudas inducidas por *S. aureus* o *K. pneumoniae* en el modelo murino de infección intratraqueal.

A pesar de que FQB-9 mostró una mejor CMB y una disminución en la neumonía comparada con el efecto del ciprofloxacino, nuestra hipótesis es rechazada, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos.

## 13. Perspectivas

Derivado de los resultados y conclusiones obtenidas en esta investigación, es de suma importancia evaluar en un futuro inmediato los efectos toxicológicos que pudiera ocasionar la administración del compuesto FQB-9 (tanto a nivel renal como hepático), siendo también prioritario, el estudio de sus aspectos farmacocinéticos, que se pueden conformar por la determinación de concentración en plasma, y determinación de las vías de eliminación.

La investigación se complementaría mediante la evaluación *in silico* de simulaciones que representen la interacción del sitio blanco con el compuesto FQB-9, evidenciando su afinidad. Adicionalmente, realizar la evaluación transduccional del compuesto y la realización de pruebas inmunohistoquímicas, permitirían la caracterización del mecanismo de acción del FQB-9.

De igual forma, los resultados obtenidos permiten ampliar las posibilidades de síntesis de otros derivatizados, de similar estructura y propiedades químicas, conformando nuevas alternativas experimentales.

## 14. Referencias

1. Mohr, K.I., *History of Antibiotics Research*. Curr Top Microbiol Immunol, 2016. **398**: p. 237-272.
2. Perry, J., N. Waglechner, and G. Wright, *The Prehistory of Antibiotic Resistance*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2016. **6**(6): p. a025197.
3. Sand, M., *Did Alexander Fleming Deserve the Nobel Prize?* Science and engineering ethics, 2019: p. 1-21.
4. Rather, I.A., et al., *Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention*. Saudi J Biol Sci, 2017. **24**(4): p. 808-812.
5. OMS. *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan emergentemente nuevos antibióticos*. 2017 24 de enero del 2020].
6. Diego-Rodríguez, M., et al., *Infecciones respiratorias agudas y caracterización de bacterias potencialmente patógenas en comunidades de la Huasteca Potosina*. Revista Salud Pública y Nutrición, 2020. **18**(4): p. 1-8.
7. Hakansson, A.P., C.J. Orihuela, and D. Bogaert, *Bacterial-Host Interactions: Physiology and Pathophysiology of Respiratory Infection*. Physiological reviews, 2018. **98**(2): p. 781-811.
8. Lanaspá, M., et al., *Respiratory microbiota and lower respiratory tract disease*. Expert review of anti-infective therapy, 2017. **15**(7): p. 703-711.
9. Pahal, P. and s. Sharma. *Typical Bacterial Pneumonia*. StatPearls [Internet] 2020 [cited 2020 25 Apr]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534295/>.
10. Aryee, A. and J.D. Edgeworth, *Carriage, Clinical Microbiology and Transmission of Staphylococcus aureus*. Current topics in microbiology and immunology, 2017. **409**: p. 1-19.
11. Berga, A.P., *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. 2009: Marge Books. 15-27.
12. Cervantes-García, E., R. García-González, and P.M. Salazar-Schettino, *Características generales del Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 2014. **61**(1): p. 28-40.
13. Buckley, D.H., et al., *Brock, biología de los microorganismos*. 14 ed. 2015: Pearson.
14. Han, J., et al., *Glycerol uptake is important for L-form formation and persistence in Staphylococcus aureus*. PloS one, 2014. **9**(9).
15. Ondusko, D.S. and D. Nolt, *Staphylococcus aureus*. PloS one, 2018.
16. David, M.Z. and R.S. Daum, *Treatment of Staphylococcus aureus Infections*. Current topics in microbiology and immunology, 2017. **409**: p. 325-383.
17. Ocheretyaner, E.R. and T.E. Park, *Delafoxacin: a novel fluoroquinolone with activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Pseudomonas aeruginosa*. Expert review of anti-infective therapy, 2018. **16**(7): p. 523-530.
18. Opoku-Temeng, C., S.D. Kobayashi, and F.R. DeLeo, *Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines*. Comput Struct Biotechnol J, 2019. **17**: p. 1360-1366.
19. Baban, S., *Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae isolated from Urinary Tract Infection*. 2017.
20. Martin, R.M. and M.A. Bachman, *Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 4.
21. Clegg, S. and C.N. Murphy, *Epidemiology and Virulence of Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(1).

22. Lee, C.R., et al., *Antimicrobial Resistance of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 483.
23. Paczosa, M.K. and J. Meccas, *Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(3): p. 629-61.
24. Ashurst JV, D.A. *Klebsiella Pneumonia*. StatPearls [Internet] 2020; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>.
25. Wohlleben, W., et al., *Antibiotic drug discovery*. Microbial Biotechnology, 2016. **9**(5): p. 541-548.
26. Ochoa, G., et al., *Multi-objective evolutionary design of antibiotic treatments*. Artif Intell Med, 2020. **102**: p. 101759.
27. Grossman, S., Mattson C., *Porth Fisiopatología*. 9a ed. 2014, Barcelona: Wolters Kluwer.
28. Neuman, H., et al., *Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done*. FEMS Microbiol Rev, 2018. **42**(4): p. 489-499.
29. Serra Valdés, M.Á., *La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana*. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 2017. **16**(3): p. 402-419.
30. Reyes-Lamothe, R. and D.J. Sherratt, *The bacterial cell cycle, chromosome inheritance and cell growth*. Nat Rev Microbiol, 2019. **17**(8): p. 467-478.
31. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. Microbiology spectrum, 2016. **4**(2): p. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
32. Giono-Cerezo, S., et al., *Estrategia nacional de acción contra la resistencia antimicrobiana, las redes de laboratorios, el grupo ESKAPE en México y el manejo de la resistencia antimicrobiana en el tratamiento en infecciones causadas por Helicobacter pylori*. Gac Med Mex, 2020. **156**: p. 1-9.
33. Saleem, M., et al., *Antibiotics Overuse and Bacterial Resistance*. Annals of Microbiology and Research, 2019. **3**(1): p. 93.
34. OMS. *La escasez mundial de antibióticos innovadores favorece la aparición y propagación de la farmacoresistencia*. Comunicados de prensa 2021 [cited 2021 05 Nov]; Available from: <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>.
35. Martínez, S.E.R., et al., *Perfil de resistencia bacteriana en hemocultivos realizados en población mexicana en los años del 2009 al 2011*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 2014. **61**(2): p. 108-114.
36. Giono-Cerezo, S., et al., *Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla*. Gaceta médica de México, 2020. **156**(2): p. 172-180.
37. Morales-Espinosa, R., et al., *Patrones de susceptibilidad antimicrobiana in vitro de bacterias Gram negativas aisladas de infección de vías urinarias en pacientes ambulatorios de una clínica del sur de la Ciudad de México*. Revista Clínica de Medicina de Familia, 2020. **13**: p. 131-138.
38. Muñoz, J.G., et al., *Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México*. 2017. **30**(2): p. 68-75.
39. Medina-García, D. and F.S. García-Carranza, *Patrones de resistencia bacteriana en urocultivos de un hospital de Chihuahua, México*. Medicina Interna de México, 2021. **37**(4): p. 494-505.
40. Stephens, L.J., et al., *Antimicrobial innovation: a current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline*. Future Med Chem, 2020. **12**(22): p. 2035-2065.

41. Effah, C.Y., et al., *Klebsiella pneumoniae: an increasing threat to public health*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2020. **19**(1): p. 1.
42. Correia, S., et al., *Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?* Journal of medical microbiology, 2017. **66**(5): p. 551-559.
43. Yang, J.J., et al., *Selected Mutations by Nemonoxacin and Fluoroquinolone Exposure Among Relevant Gram-Positive Bacterial Strains in Taiwan*. Microb Drug Resist, 2020. **26**(2): p. 110-117.
44. Bhagwat, S.S., et al., *Levonadifloxacin, a Novel Broad-Spectrum Anti-MRSA Benzoquinolizine Quinolone Agent: Review of Current Evidence*. Drug Des Devel Ther, 2019. **13**: p. 4351-4365.
45. Leyva-Ramos, S. and H. Hernández-López, *Fluoroquinolonas: perspectivas no antibacterianas*. Revista Española de Quimioterapia, 2017. **30**(1): p. 1-8.
46. Carrillo-Alduenda, J., F. Flores-Murrieta, and A. Rodríguez-Alcocer, *Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas*. Medicina interna de México, 2018. **34**(1): p. 89-105.
47. Hooper, D.C. and G.A. Jacoby, *Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2016. **6**(9): p. 1-21.
48. Gao, F., et al., *Quinolone hybrids and their anti-cancer activities: An overview*. Eur J Med Chem, 2019. **165**: p. 59-79.
49. Cho, J.C., et al., *What Is Old Is New Again: Delafloxacin, a Modern Fluoroquinolone*. Pharmacotherapy, 2018. **38**(1): p. 108-121.
50. Ezelarab, H.A.A., et al., *Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents*. Arch Pharm (Weinheim), 2018. **351**(9): p. e1800141.
51. Pham, T.D.M., Z.M. Ziora, and M.A.T. Blaskovich, *Quinolone antibiotics*. MedChemComm, 2019. **10**(10): p. 1719-1739.
52. Hernández-López, H., et al., *Synthesis of hybrid fluoroquinolone-boron complexes and their evaluation in cervical cancer cell lines*. 2019.
53. Chen, Z.-F., et al., *X-Ray crystal structures of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> dimers of the antibacterial drug norfloxacin*. Journal of the Chemical Society, 2000(22): p. 4013-4014.
54. Turel, I., *The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **232**(1): p. 27-47.
55. Leyva, S. and H. Hernández, *Synthesis of norfloxacin analogues catalyzed by Lewis and Brønsted acids: An alternative pathway*. Journal of Fluorine Chemistry, 2010. **131**(10): p. 982-988.
56. Chohan, Z.H., C.T. Supuran, and A. Scozzafava, *Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes*. Journal of Enzyme Inhibition 2005. **20**(3): p. 303-307.
57. OMS. *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo*. Comunicado de prensa 2018 [cited 2020 23 May]; Available from: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>.
58. OMS. *No podemos esperar: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes*. Informe para el Secretario General de las Naciones Unidas 2019 [cited 2020 23 May]; Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/es/>.
59. Dietert, K., et al., *Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188251.
60. Draxler, D.F., et al., *Tranexamic Acid Influences the Immune Response, but not Bacterial Clearance in a Model of Post-Traumatic Brain Injury Pneumonia*. J Neurotrauma, 2019. **36**(23): p. 3297-3308.

61. Morton, D.B., et al., *Refining procedures for the administration of substances*. Laboratory Animals, 2001. **35**(1): p. 1-41.
62. Rodríguez-Martínez, J.M., et al., *Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by Klebsiella pneumoniae deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1*. Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**(7): p. 691-697.
63. Thadepalli, H., et al., *Ciprofloxacin: in vitro, experimental, and clinical evaluation*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(3): p. 505-15.
64. Yamashita, Y., et al., *Efficacy of Azithromycin in a Mouse Pneumonia Model against Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2019. **63**(9): p. e00149-19.
65. Aeffner, F., B. Bolon, and I.C. Davis, *Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review of Analytical Approaches, Pathologic Features, and Common Measurements*. Toxicologic Pathology, 2015. **43**(8): p. 1074-1092.
66. Mizgerd, J.P. and S.J. Skerrett, *Animal models of human pneumonia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(3): p. L387-98.
67. Hraiech, S., et al., *Animal models of polymicrobial pneumonia*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 3279.
68. CLSI, W.L., *M02-A11: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard*. 2018, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), vol32 (1).
69. Hernández-López, H., et al., *Synthesis of Hybrid Fluoroquinolone-Boron Complexes and Their Evaluation in Cervical Cancer Cell Lines*. Journal of Chemistry, 2019. **2019**: p. 5608652.
70. CLSI, *CLSI M100-ED30:2020 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition*. 2020.
71. Grillon, A., et al., *Comparative Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin against Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia Assessed by Minimum Inhibitory Concentrations and Time-Kill Studies*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156690.
72. Taroco, R., V. Seija, and R. Vignoli, *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. Temas de Bacteriología y Virología Médica, Oficina del libro FEFMUR, Uruguay, 2006. **36**(1): p. 665-668.
73. Leyva-Ramos, S., D. de Loera, and J. Cardoso-Ortiz, *In vitro Antibacterial Activity of 7-Substituted-6-Fluoroquinolone and 7-Substituted-6,8-Difluoroquinolone Derivatives*. Chemotherapy, 2017. **62**(3): p. 194-198.
74. Corso, A., et al., *[Capability of national reference laboratories in Latin America to detect emerging resistance mechanisms]*. Rev Panam Salud Publica, 2011. **30**(6): p. 619-26.
75. Watanabe, T., et al., *Systematic Analysis of Selective Bactericidal Activity of Fatty Acids against Staphylococcus aureus with Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration*. J Oleo Sci, 2019. **68**(3): p. 291-296.
76. Thabit, A.K., J.L. Crandon, and D.P. Nicolau, *Pharmacodynamic and pharmacokinetic profiling of delafloxacin in a murine lung model against community-acquired respiratory tract pathogens*. Int J Antimicrob Agents, 2016. **48**(5): p. 535-541.
77. McCurdy, S., et al., *Efficacy of Delafloxacin versus Moxifloxacin against Bacterial Respiratory Pathogens in Adults with Community-Acquired Bacterial Pneumonia (CABP): Microbiology Results from the Delafloxacin Phase 3 CABP Trial*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(3).

78. Norouzbahari, M., et al., *Design, synthesis, molecular docking study, and antibacterial evaluation of some new fluoroquinolone analogues bearing a quinazolinone moiety*. Daru, 2020. **28**(2): p. 661-672.
79. Bezwada, P., L.A. Clark, and S. Schneider, *Intrinsic cytotoxic effects of fluoroquinolones on human corneal keratocytes and endothelial cells*. Current Medical Research and Opinion, 2008. **24**(2): p. 419-424.
80. Ptaszyńska, N., et al., *Conjugates of Ciprofloxacin and Levofloxacin with Cell-Penetrating Peptide Exhibit Antifungal Activity and Mammalian Cytotoxicity*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(13).
81. Lavorgna, M., et al., *A New Approach for Improving the Antibacterial and Tumor Cytotoxic Activities of Pipemidic Acid by Including It in Trimethyl- $\beta$ -cyclodextrin*. 2019. **20**(2): p. 416.
82. Esposito, A.L. and J.E. Pennington, *Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(4): p. 662-7.
83. Kim, H.K., D. Missiakas, and O. Schneewind, *Mouse models for infectious diseases caused by Staphylococcus aureus*. Journal of Immunological Methods, 2014. **410**: p. 88-99.
84. Sheppard, D.C., et al., *Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis*. Clinical Microbiology and Infection, 2006. **12**(4): p. 376-380.
85. Ku, N.S., et al., *In vivo efficacy of combination of colistin with fosfomycin or minocycline in a mouse model of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii pneumonia*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17127.
86. Altamirano-Lagos, M.J., et al., *Current Animal Models for Understanding the Pathology Caused by the Respiratory Syncytial Virus*. 2019. **10**(873).
87. Martínez, A.H., et al., *Anemia hemolítica asociada a fármacos antimicrobianos*. Enfermedades infecciosas y microbiología, 2019. **38**(3): p. 81-85.
88. Blondeau, J.M., *Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review*. Clin Ther, 1999. **21**(1): p. 3-40; discussion 1-2.
89. Zhanel, G.G., et al., *The new fluoroquinolones: A critical review*. Can J Infect Dis, 1999. **10**(3): p. 207-38.
90. Zhu, S., et al., *Assessment of oral ciprofloxacin impaired gut barrier integrity on gut bacteria in mice*. Int Immunopharmacol, 2020. **83**: p. 106460.
91. Wang, E., et al., *In vivo activity and pharmacokinetics of ziracin (SCH27899), a new long-acting everninomicin antibiotic, in a murine model of penicillin-susceptible or penicillin-resistant pneumococcal pneumonia*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(4): p. 1010-8.
92. Lepak, A.J., et al., *Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Evaluation of a Novel Aminomethylcycline Antibiotic, KBP-7072, in the Neutropenic Murine Pneumonia Model against Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(3).
93. Zhou, Y.F., et al., *In Vivo Pharmacodynamic Target Assessment of Antofloxacin against Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in a Neutropenic Murine Pneumonia Model*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(12).
94. Zhao, M., et al., *In Vivo Pharmacodynamic Target Determination for Delafloxacin against Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa in the Neutropenic Murine Pneumonia Model*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(10).
95. Uivarosi, V., *Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update*. 2013. **18**(9): p. 11153-11197.

96. Maciucă, A.M., et al., *Rare-Earth Metal Complexes of the Antibacterial Drug Oxolinic Acid: Synthesis, Characterization, DNA/Protein Binding and Cytotoxicity Studies*. *Molecules*, 2020. **25**(22).
97. Nedeljković, N.V., et al., *Interaction of bioessential metal ions with quinolone antibiotics: structural features and biological evaluation*. 2021: p. 120585.

## Anexos

- Anexo A: Caracterizaciones de las cepas utilizadas

HOSPITAL GENERAL DE ZACATECAS

Ciente de bioMérieux:

Informe clínico

Editado 09-jul-2021 08:09 VET

Nombre del paciente:

Nº paciente:

Localización:

Médico:

Nº de examen: 1-KP

Nº de aislamiento: 1

Cantidad de organismo:

Organismo seleccionado: *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*

Origen:

Recogida:

Comentarios:	

Información de identificación	Tiempo de análisis:	3,83 horas	Estado:	Final
Organismo seleccionado	99% Probabilidad	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>		
	Bionúmero:	2605734673164010		
Mensajes de análisis de ID				

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis:	7,73 horas	Estado:	Final	
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
BLEE	POS	+	Cefepima	<= 1	*R
Ampicilina	>= 32	R	Ertapenem	<= 0,5	S
Ampicilina/Sulbactam	>= 32	R	Meropenem	<= 0,25	S
Cefalotina	>= 64	R	Amicacina	<= 2	S
Cefuroxima			Gentamicina	8	I
Oral	>= 64	R	Ciprofloxacino	<= 0,25	S
Otra	>= 64	R	Norfloxacino	2	S
Cefuroxima Axetil	>= 64	R	Fosfomicina	>= 256	R
Cefotaxima	2	*R	Nitrofurantoína	128	R
Ceftazidima	16	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 20	S
Ceftriaxona	8	R			

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

Conclusiones de AES		
Nivel de confianza:	Coherente	
Fenotipos marcados para revisión:	BETA-LACTÁMICOS	BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO, BLEE + IMPERMEABILIDAD (CEFAMICINAS)

HOSPITAL GENERAL DE ZACATECAS  
Informe clínico

Editado 09-jul-2021 08:09 VET

Cliente de bioMérieux:

Nombre del paciente:  
Localización:  
Nº de examen: 1-SA

Nº paciente:  
Médico:  
Nº de aislamiento: 1

Cantidad de organismo:  
**Organismo seleccionado: Staphylococcus aureus**

Origen:

Recogida:

Comentarios:	

Información de identificación	Tiempo de análisis:	4,80 horas	Estado:	Final
Organismo seleccionado	96% Probabilidad	<b>Staphylococcus aureus</b>		
Mensajes de análisis de ID	Bionúmero:	050402072763231		

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis:			Estado:	
	13,35 horas			Final	
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina	NEG	-	Clindamicina	0,25	S
Ampicilina			Linezolid	2	S
Oxacilina	<= 0,25	S	Daptomicina	>= 8	
Gentamicina de nivel alto (sinergia)			Vancomicina	4	I
Estreptomina de nivel alto (sinergia)			Doxiciclina	<= 0,5	S
Gentamicina	4	S	Tetraciclina	<= 1	S
Ciprofloxacino	<= 0,5	S	Tigeciclina	<= 0,12	S
Levofloxacino	<= 0,12	S	Nitrofurantoína	<= 16	S
Moxifloxacino	<= 0,25	S	Rifampicina	<= 0,5	S
Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 10	S
Eritromicina	<= 0,25	S			

+= Antibiótico deducido \*= AES modificado \*\*= Usuario modificado

Conclusiones de AES		
Nivel de confianza:	Coherente	
Fenotipos marcados para revisión:	MACRÓLIDOS/LINCOSAMINAS/ESTREPTOGRAMINAS	RESISTENTE A ESTREPTOGRAMINAS (SGA-SGB)
	GLICOPÉPTIDOS	VISA

- Anexo B: Publicación de artículo



Memorias del Congreso Internacional  
de Investigación Academia Journals  
Morelia 2021

© Academia Journals 2021

Morelia, Michoacán, México  
12 al 14 de mayo, 2021

## Revisión Sistémica de Nuevas Fluoroquinolonas: Una Alternativa Terapéutica a la Farmacorresistencia

Q.F.B. Luis Angel Veyna Hurtado<sup>1</sup>, M. Mitzzy Medellín Luna<sup>2</sup>, Dr. Hiram Hernández López<sup>3</sup>, Dra. Irma Elizabeth González Curiel<sup>4</sup>, Dra. Fuensanta del Rocio Reyes Escobedo<sup>5</sup>, Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana<sup>6</sup>.

**Resumen**— En recientes años, debido a la acelerada farmacorresistencia bacteriana, ha sido indispensable la obtención de nuevas moléculas potencialmente relevantes en la clínica, siendo las fluoroquinolonas un grupo importante en cuanto a la síntesis de nuevos derivados, por lo que se realizó una revisión bibliográfica en la base de datos PubMed, donde se analiza la aparición de resistencia en nuevas quinolonas, como el moxifloxacino, compuesto ya establecido como fármaco, pero que presenta inconvenientes de efectos adversos y resistencia. Otros compuestos con resultados de resistencia publicados y mencionados en esta revisión son: ozenoxacin, norfloxacin, nemonoxacin, zabofoxacina, delafloxacina, nemonoxacin, finafloxacina, avarofloxacina, gatifloxacina, ofloxacina, entre otros. Cabe destacar que, compuestos como moxifloxacino, delafloxacina, levonadifloxacina o finafloxacina, presentan resultados favorables en experimentación, con adecuada actividad antibacteriana, por lo tanto, es recomendable la continua experimentación con estas moléculas, y otros derivados relevantes que puedan ser una alternativa eficaz contra la farmacorresistencia en continuo incremento.

- Anexo C: Comprobantes de asistencia a congresos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
**ZACATECAS**  
*Francisco García Salinas*

generado el: 21/Mayo/2021

LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Y LA COORDINACIÓN DEL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD

**OTORGAN LA PRESENTE**

**CONSTANCIA**

**A:** Luis Angel Veyna Hurtado

Por su valiosa ASISTENCIA a las XIII Jornadas de Ciencias Químicas  
"M. en C. Manuel de Jesús Macías Patiño",  
en el marco del Año Internacional de las Frutas y las Verduras,  
del 19 al 21 de Mayo a través de la plataforma virtual de la  
Unidad Académica de Ciencias Químicas,  
con un valor curricular de 25 horas crédito.

Zacatecas, Zac., 21 de Mayo de 2021



**Dra. Argelia López Luna**  
Directora de la Unidad Académica de  
Ciencias Químicas



**Dr. Juan Armándo Flores de la Torre**  
Coordinador del Área de  
Ciencias de la Salud

**"Año Internacional de las Frutas y las Verduras"**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
**ZACATECAS**  
*Francisco García Salinas*

LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Y LA COORDINACIÓN DEL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD

**OTORGAN LA PRESENTE**

**CONSTANCIA**

**A:** LUIS ÁNGEL VEYNA HURTADO, HIRAM HERNÁNDEZ LÓPEZ, MITZZY MEDELLÍN LUNA, FUENSANTA DEL ROCÍO REYES ESCOBEDO, ALBERTO RAFAEL CERVANTES VILLAGRANA

Por su valiosa participación en la presentación del trabajo en modalidad Cartel:  
"Evaluación antimicrobiana del compuesto FQB-9 derivatizado de fluoroquinolonas en  
S. aureus y K. pneumoniae in vitro e in vivo mediante modelo murino de neumonía"  
durante las XIII Jornadas de Ciencias Químicas  
"M. en C. Manuel de Jesús Macías Patiño",  
en el marco del Año Internacional de las Frutas y las Verduras,  
del 19 al 21 de Mayo de 2021, con un valor curricular de 10 horas crédito  
Zacatecas, Zac., 21 de Mayo de 2021



**Dra. Argelia López Luna**  
Directora de la Unidad Académica de  
Ciencias Químicas



**Dr. Juan Armándo Flores de la Torre**  
Coordinador del Área de  
Ciencias de la Salud

**"Año Internacional de las Frutas y las Verduras"**

**8vo CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
19, 20 y 21 de Octubre 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"

CONSEJO ZACATECANO DE CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN  
Otorgan

**RECONOCIMIENTO A:**  
Luis Angel Veyna Hurtado; Hiram Hernández López; Mitszy Medellín Luna;  
Puesanta del Rocío Reyes Escobedo; Alberto Rafael Cervantes Villagrana

**Por su presentación del cartel titulado:**  
Evaluación antimicrobiana del compuesto PQT-5 derivatizado de fluorquinolonas en *S. aureus* y *K. pneumoniae* in vitro e in vivo

Dentro del  
8vo CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
19 al 21 de octubre de 2020

Dra. en C. Argelia López Luna      Dra. en C. Rosalinda Gutiérrez Hernández  
Dra. en C. Marisol Galván Valencia      Dr. en C. Sergio Miguel Durrón Torres



**8vo CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
19, 20 y 21 de Octubre 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"

CONSEJO ZACATECANO DE CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN  
Otorgan

**CONSTANCIA A:**  
**Luis Angel Veyna Hurtado**

Por su asistencia al

8vo CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
19 al 21 de octubre de 2020  
Valor curricular 25 Hrs

Dra. en C. Argelia López Luna      Dra. en C. Rosalinda Gutiérrez Hernández  
Dra. en C. Marisol Galván Valencia      Dr. en C. Sergio Miguel Durrón Torres





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"

LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Y LA COORDINACIÓN DEL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD

OTORGAN LA PRESENTE

**CONSTANCIA**

A: **LUIS ANGEL VEYNA HURTADO**

Por su valiosa asistencia al Curso-Taller-Concurso:  
"Reposicionamiento de Fármacos Y Tecnología Aplicada"  
llevada a cabo a través de plataforma virtual  
del 24 al 25 de Junio del 2021.  
Valor Curricular 10 horas crédito

Zacatecas, Zac., 25 de Junio de 2021

Dra. Argelia López Luna  
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químicas

Dr. Juan Armándo Flores de la Torre  
Coordinador del Área de Ciencias de la Salud

- Anexo D: Aprobación del Comité de Bioética institucional para el desarrollo de la investigación



Universidad Autónoma de Zacatecas  
"Francisco García Salinas"  
Área de Ciencias de la Salud

Odontología - Enfermería - Químico Farmacéutico Biólogo - Medicina Humana - Nutrición



OT. No. SACI/UAZ/302/2020

**Dr. en C. Alberto Rafael Cervantes Villagrana**  
Docente-Investigador en Ciencias Biomédicas  
Presente.

A través de la presente enviándole un cordial saludo y dando respuesta a su oficio relativo a solicitar el aval del Comité de Bioética del proyecto *"Evaluación farmacodinámica antimicrobiana de derivados sintéticos de fluoroquinolonas en bacterias patógenas"*, el Comité de Bioética del Área de Ciencias de la Salud concluye, después de revisar el protocolo bajo el cual se rige dicha investigación, se tiene a bien aprobarlo para su desarrollo y aprobación.

ATENTAMENTE

**Dr. en C. Juan Armando Flores De la Torre**  
Secretario Académico del Área de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma de Zacatecas

Zacatecas, Zac., 17 de Septiembre de 2020

c.c.p. Archivo.



Carretera Zacatecas-Guadalajara, Km.6,  
Ejido la Escondida C.P. 08160 Zacatecas, Zac. México.  
Tel y Fax. 01 (492) 92-5-66-90 Ext. 4450  
Edificio 1 Campus UAZ Siglo XXI

- Anexo E: Formación de recursos humanos académicos

Participaciones como sinodal en seminarios de investigación de alumnos por egresar de la licenciatura Q.F.B., en la Universidad Autónoma de Zacatecas.


 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
*Francisco García Salinas*  
 UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO    INGENIERÍA QUÍMICA    BIOTECNOLOGÍA    INGENIERÍA BIOQUÍMICA    QUÍMICO EN ALIMENTOS  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

---

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

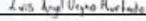
El día 28 del mes de Mayo del año del 2021 se procedió a evaluar a el (la) alumno(a) **Fátima Raygoza Arteaga**

Evaluación correspondiente al 1er Seminario de Investigación con el tema: **EFFECTO PROTECTOR DEL ÁCIDO FÓLICO SOBRE LA GENOTOXICIDAD DEL PARACETAMOL MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

El asesor de la parte teórica de dicho trabajo estuvo a cargo de: **Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana**

Quien otorga la calificación de: 7 Número    Siete Letra

El jurado de la exposición estuvo integrado por:

Nombre	Firma
<b>Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana</b>	
<b>Dra. María Luisa Ramos Ibarra</b>	
<b>Q.F.B. Luis Angel Veyna Hurtado</b>	

Quienes otorgan la siguiente calificación: 3 Número    Tres Letra

Ambas calificaciones suman: 10 Número    Diez Letra

**ATENTAMENTE**

M. en C. Ma. del Socorro Martínez Becerra  
Responsable del Programa de Químico Farmacéutico Biológico

CLAVE: 33101000077  
 Campus IIAZ Siglo XXI, Carretera Zacatecas - Guadalupe Km. 6  
 Cielo La Esperanza CP 98600, Zacatecas, Zac. Tel: (492) 925 6690 Ext. 4050

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

El día 18 del mes de Junio del año del 2021, se procedió a evaluar a el (la) alumno(a)

Quiroz Núñez Anahid

Evaluación correspondiente al 1er Seminario de Investigación con el tema:

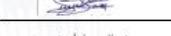
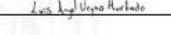
**"Evaluación del Efecto Citotóxico de Extractos de *Anredera cordifolia* y *Plumbago pulchella* Boiss en Células de Carcinoma Pulmonar de Lewis"**

El asesor de la parte teórica de dicho trabajo estuvo a cargo de:

**Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana**

Quien otorga la calificación de:    7    Siete  
Número    Letra

El jurado de la exposición estuvo integrado por:

Nombre	Firma
Dr. en C. Alberto Rafael Cervantes Villagrana	
M. En C. Salvador García Cruz	
Q.F.B. Luis Ángel Veyna Hurtado	

Quienes otorgan la siguiente calificación:    3    Tres  
Número    Letra

Ambas calificaciones suman:    10    Diez  
Número    Letra

**A T E N T A M E N T E**

M. en C. Ma. del Socorro Martínez Becerra  
 Responsable del Programa de Químico Farmacéutico Biólogo

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

El día 18 del mes de Junio del año del 2021, se procedió a evaluar a él (la) alumno(a)

Alondra Bocanegra Zapata

Evaluación correspondiente al 1er Seminario de Investigación con el tema:

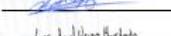
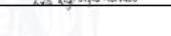
**"Evaluación del efecto Citotóxico de los compuestos derivatizados hidrolizados de fluoroquinolonas en un modelo de carcinoma pulmonar de Lewis in vitro".**

El asesor de la parte teórica de dicho trabajo estuvo a cargo de:

**Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana**

Quien otorga la calificación de:    7    Siete  
Número    Letra

El jurado de la exposición estuvo integrado por:

Nombre	Firma
Dr. en C. Alberto Rafael Cervantes Villagrana	
Dr. En C. Hiram Hernández López	
Q.F.B. Luis Ángel Veyna Hurtado	

Quienes otorgan la siguiente calificación:    3    Tres  
Número    Letra

Ambas calificaciones suman:    10    Diez  
Número    Letra

**A T E N T A M E N T E**

M. en C. Ma. del Socorro Martínez Becerra  
 Responsable del Programa de Químico Farmacéutico Biólogo

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

El día 26 del mes de Junio del año del 2021, se procedió a evaluar a el (la) alumno(s)

Jonathan Iván Vargas Núñez

Evaluación correspondiente al 1er Seminario de Investigación con el tema:

"Nuevas estrategias para el tratamiento de Esclerosis Lateral Amiotrófica"

El asesor de la parte teórica de dicho trabajo estuvo a cargo de:

Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana

Quien otorga la calificación de: 5 Cinco  
Número Letra

El jurado de la exposición estuvo integrado por:

Nombre Firma

Dr. Alberto Rafael Cervantes Villagrana \_\_\_\_\_

QFB. Luis Ángel Veyna Hurtado Luis Ángel Veyna Hurtado

LBT. Alma Sarahí Cuellar González \_\_\_\_\_

Quienes otorgan la siguiente calificación: 2 Dos  
Número Letra

Ambas calificaciones suman: 7 Siete  
Número Letra

**A T E N T A M E N T E**

M. en C. Ma. del Socorro Martínez Becerra  
Responsable del Programa de Químico Farmacéutico Biólogo