

Alonso, Lourdes
Comba Ruetsch, Camila

**Determinación de la
actividad anti Quorum
Sensing de extractos de
plantas del centro de
Argentina**

**Tesis para la obtención del título de
grado de Farmacéutica**

Directora: Lujan, Adela

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



[Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.](#)

Universidad Católica de Córdoba
Facultad de Ciencia de la Salud



Determinación de la actividad anti *Quorum Sensing* de extractos de plantas del centro de Argentina

**Trabajo final de la Facultad de Ciencias de la Salud de la
Universidad Católica de Córdoba conforme a los requisitos
para obtener el título de Farmacéutica**

Autoras: Alonso, Lourdes y Comba Ruetsch, Camila

Directora: Dra. Luján, Adela María

Codirector: Dra. Carpinella, María Cecilia

Córdoba-Argentina

2025

Trabajo Final
Dra. Cecilia Carpinella | Dr. Mariano Zaragoza.

Directora de Trabajo Final: Dra. Luján, Adela

CIDIE-CONICET

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Católica de Córdoba

Codirectora de Trabajo Final:

Dra. Carpinella, Maria Cecilia

CIDIE-CONICET

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Católica de Córdoba

Cátedra de Trabajo Final:

Dra. Carpinella, Maria Cecilia

Dr. Zaragoza, Mariano Hugo

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Católica de Córdoba

AGRADECIMIENTOS:

Lourdes.

Quisiera agradecer primeramente a mi directora Adela Lujan y a mi codirectora Cecilia Carpinella que nos apoyaron y transmitieron esa curiosidad por seguir frente a un problema y confiar en uno mismo.

A mis profesores, Mariano y Cecilia que nos brindaron su tiempo y saberes para poder realizar este trabajo.

Agradecer y mucho, a la facultad y a la vida, que puso a mi compañera Cami Comba en mi camino más de una vez para aprender de ella. Cada gracias queda corto, me sostuvo enseñándome en cada situación personal y profesional, que siempre se puede. Confía en vos. Como un profe nos dijo Thelma & Louis, te dedico esta frase "Siempre has estado loca, ésta es sólo la primera oportunidad que has tenido para expresarte"

A mis papás, quienes apostaron nuevamente por mí para regalarme esta nueva aventura, siempre rodeada de amor.

A mis hermanos, mis miradas más profundas. Los que más me enseñaron en esta vida.

A mis abuelos, pilares de mi vida, los abrazos más fuerte y cariñoso lo tengo de ellos.

A toda mi familia, que está frente a lo feo y lo lindo, siguiéndome los pasos, siempre con humor e hinchada.

A mis amigas Camila, Gina, Perla y Sofía que me guiaron frente a todo. Fueron mis tutoras por elección, desde el cariño siempre apoyando y enseñándome. Nada hubiese sido igual sin ustedes, viviría mil aventuras más y siempre junto a la pequeña Delfi y mi otra pulguita.

A mis amigos, gracias por acompañarme en esta nueva profesión que me costó tanto ¡Gracias!

Por último, pero no menos importante a mi mejor dupla...Mi gran compañero de camino, Bautista. Esta carrera tuvo sus baches personales y también profesionales, pero él estuvo ahí para decirme si podes. Su confianza en mi mueve montañas, sin su amor y vianditas nada de esto hubiera sido posible.

Gracias a todos, porque de una u otra manera, cada uno hizo que este logro fuera posible.

¡Un pedacito de este gran logro es parte de ustedes!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
• Cepas bacterianas a utilizar	5
• Colección de extractos obtenidos a través de plantas de Argentina	5
• Evaluar la curva de crecimiento de la PAO1 con y sin extractos	5
• Validar la actividad anti-quorum sensing de los cinco extractos seleccionados	5
RESULTADOS	7
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIÓN	13
BIBLIOGRAFÍA	14
ANEXO	17

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DMSO dimetilsulfóxido

HSL homoserinlactonas

LB Luria-Bertani

OMS Organización Mundial de la Salud

QS *quorum sensing*

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> : Curva de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, en presencia y ausencia de los extractos vegetales.	Pág 7
<u>Figura 2</u> : Cuantificación del efecto de los extractos vegetales sobre la motilidad tipo <i>swarming</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	Pág 8
<u>Figura 3</u> : Efecto de concentraciones crecientes de DMSO sobre el ensayo de motilidad por <i>swarming</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	Pág 9
<u>Figura 4</u> : Cuantificación de la actividad de exoproteasas en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	Pág 10
<u>Figura 5</u> : Ensayo cualitativo de actividad de exoproteasas en agar leche descremada.	Pág 10

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos representa una de las mayores amenazas para la salud pública global, siendo *Pseudomonas aeruginosa* un patógeno crítico debido a sus múltiples factores de virulencia, su patogenicidad y el poder de generar multirresistencia. Ante la inminencia de una era post-antibiótica, las terapias antivirulentas surgen como una estrategia prometedora: buscan desarmar al patógeno atenuando su virulencia sin afectar su viabilidad, reduciendo así la presión de selección. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial inhibitorio del sistema de *Quorum Sensing* (QS) de extractos derivados de la flora nativa de la región central de Argentina sobre la cepa *P. aeruginosa*.

Se realizaron ensayos de curvas de crecimiento para descartar actividad bactericida, cuantificación de exoproteasas y ensayos de movilidad tipo *swarming* con el objetivo de encontrar cómo interferir en el sistema QS con los extractos, evaluando así su poder antivirulento.

Los resultados demostraron que los extractos no alteraron la cinética de crecimiento bacteriano, cumpliendo con el requisito fundamental de una terapia antivirulenta. Si bien la inhibición de exoproteasas y *swarming* presentó variabilidad y desafíos asociados a la interacción del solvente, se identificó que si hay dependencia de algunos factores a cierta vía de señalización dentro del gran sistema QS.

Este estudio aporta evidencia preliminar sobre el valor de la flora local como fuente de inhibidores del QS, proponiendo una base para el desarrollo de coadyuvantes que permitan restituir la sensibilidad a los antibióticos convencionales.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance represents one of the greatest threats to global public health, with *Pseudomonas aeruginosa* being a critical pathogen due to its multiple virulence factors, pathogenicity, and power to generate multidrug resistance. Given the imminence of a post-antibiotic era, anti-virulence therapies emerge as a promising strategy: they seek to disarm the pathogen by attenuating its virulence without affecting its viability, thereby reducing selection pressure. The present study aimed to evaluate the inhibitory potential of extracts derived from the native flora of the central region of Argentina on the Quorum Sensing (QS) system of the *P. aeruginosa* strain.

Growth curve assays were performed to rule out bactericidal activity, along with exoprotease quantification and swarming motility assays, with the goal of finding how the extracts interfere with the QS system, thus evaluating their anti-virulence power.

The results demonstrated that the extracts did not alter the bacterial growth kinetics, fulfilling the fundamental requirement of an anti-virulence therapy. Although the inhibition of exoproteases and swarming presented variability and challenges associated with solvent interaction, it was identified that there is a dependence of some factors on a specific signaling pathway within the broad QS system.

This study provides preliminary evidence on the value of local flora as a source of QS inhibitors, proposing a foundation for the development of adjuvants that could allow the restoration of sensitivity to conventional antibiotics.

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana representa actualmente uno de los desafíos más importantes para la salud pública mundial, donde los microorganismos evaden el efecto de los fármacos. La resistencia antibacteriana es especialmente preocupante por su rápida propagación impulsada por el uso excesivo de antibióticos, tanto en humanos (pacientes/médicos) como en animales, y el manejo inadecuado de los desechos (Vázquez-Cabrera et al., 2023). Adicionalmente, la falta de inversión de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos fármacos contra esta problemática agrava la situación. Según datos recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones por bacterias resistentes fueron responsables de al menos 1,27 millones de muertes en 2019 y se proyecta un aumento drástico en el número de muertes hasta alcanzar los 10 millones para el año 2050. La OMS advierte sobre la posible llegada de una era post antibiótica, en donde infecciones comunes podrían ser mortales (Vanegas Múnera & Jiménez Quiceno, 2020). Por lo anterior, es crucial buscar nuevos antibióticos, ya que, si la situación actual continúa, podríamos tener consecuencias irreversibles. Sólo en los últimos años se ha comenzado a abordar este problema con seriedad.

La mayoría de los antibióticos actuales provienen de metabolitos secundarios de microorganismos, principalmente Actinobacterias. Estos antibióticos detienen el crecimiento bacteriano al inhibir la síntesis y el ensamblaje de componentes esenciales, como la síntesis de la pared celular, replicación del ADN y síntesis de proteínas. Aunque este enfoque ha generado antibióticos altamente efectivos que transformaron la medicina moderna, también implica una fuerte presión selectiva sobre las bacterias objetivo, lo que favorece la selección de subpoblaciones resistentes (Dickey et al., 2017).

Ante esta problemática, se exploran terapias alternativas para controlar infecciones sin promover la aparición de cepas resistentes. Una estrategia prometedora, atractiva e intensamente investigada para combatir las infecciones multirresistentes es inhibir los factores de virulencia (antivirulentos) (Dickey et al., 2017). El principio detrás de este enfoque se basa en desarmar a la bacteria de sus factores de virulencia, haciéndolas menos patógenas para el hospedador, sin afectar la viabilidad bacteriana, y por lo tanto, si generar presión selectiva para la resistencia. Inhabilitar la virulencia impide la colonización del huésped, facilitando la eliminación bacteriana por el sistema inmune. Si bien la respuesta inmunitaria podría resolver infecciones residuales tras el tratamiento antivirulento, estas terapias podrían combinarse con antibióticos tradicionales para aumentar su eficacia y reducir el riesgo de resistencia a estos últimos (Dickey et al., 2017)

El *Quorum Sensing* (QS) es un sistema clave que permite a las bacterias censar el ambiente que las rodea y regular la expresión de los factores de virulencia. Este mecanismo de comunicación intercelular, mediado por pequeñas moléculas señalizadoras, informa sobre la densidad poblacional y coordina la expresión de genes relacionados con virulencia, formación de biofilms y a demandas metabólicas (Turkina & Vikström, 2019). Esta cooperación permite a las bacterias actuar como una poderosa comunidad multicelular, realizando tareas complejas que serían imposibles individualmente.

Las estrategias de antivirulencia pueden interferir con la capacidad bacteriana para reconocer señales del huésped que indican infección y/o activan rasgos de virulencia necesarios para establecer la infección. Al inhibir la expresión o actividad de estos rasgos, se reduce la capacidad de las bacterias para colonizar al huésped.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa oportunista no fermentativa adaptable que habita en diversos ambientes. Su capacidad invasiva, toxigénica y de colonización la convierte en causa de brotes nosocomiales graves e infecciones locales y sistémicas en pacientes con problemas de salud subyacentes, como neumonía asociada a ventilación mecánica, quemaduras, heridas, fibrosis quística y septicemia. Como miembro del grupo ESKAPE, *P. aeruginosa* es capaz de evadir múltiples fármacos y representa un paradigma de "superbacteria" en patogenia, transmisión y resistencia antibiótica. Por lo tanto, las opciones terapéuticas tradicionales para *P. aeruginosa* se han vuelto limitadas y encontrar nuevas estrategias alternativas de prevención y tratamiento es una prioridad urgente (Turkina & Vikström, 2019).

El éxito de la *P. aeruginosa* como patógeno se basa en su capacidad de sintetizar y secretar gran variedad de factores de virulencia, como piocianina, exotoxina A, fosfolipasas, sideróforos y proteasas que degradan componentes del hospedador como elastina, colágeno, transferrina e inmunoglobulinas. Estos exoproductos no se producen constitutivamente, sino que son regulados de manera dependiente a la densidad celular por el sistema de comunicación intercelular de QS (Turkina & Vikström, 2019). *P. aeruginosa*, utiliza dos sistemas de QS principales: *las* y *rhl*. Ambos sistemas se componen por una molécula señal específica, las homoserinlactonas (HSL) 3-oxo-c12-HSL y C4-HSL, respectivamente; un gen "I", que codifica la sintetasa de la HSL (*LasI* y *RhlI*) y un gen "R" que codifica el regulador transcripcional, el cual es capaz de unirse a la HSL (*LasR* y *RhlR*). Durante el crecimiento de las bacterias, *LasI* y *RhlI* producen sus respectivas HSL. Al alcanzar una densidad celular umbral, las HSL se unen a *LasR* y *RhlR*, formando complejos activos que regulan genes de virulencia (Turkina & Vikström, 2019).

En los últimos años, se han investigado numerosos compuestos capaces de interferir o inhibir el QS. Un ejemplo de ellos son las furanonas, son una familia de moléculas estructuralmente relacionadas, que se caracterizan por poseer un anillo de pirano heterocíclico de cinco miembros, son comunes en la naturaleza y se encuentran en una gran variedad de plantas marinas (como la macroalga roja *Delisea pulchra*) y terrestres (fresas, café). Se ha demostrado que las furanonas reducen significativamente la producción de factores de virulencia y la formación de biofilms en diversos patógenos ambientales y clínicos (Proctor et al., 2020). Otra investigación demostró que inhibir *LasR* es un objetivo clave para limitar la capacidad de *P. aeruginosa* de exacerbar el daño de la barrera intestinal. Este patógeno coloniza el tracto intestinal y agrava la disfunción de la barrera en pacientes críticos con integridad intestinal comprometida por su condición primaria (Singh et al., 2022).

Si bien existen numerosos estudios sobre la inhibición del QS en *P. aeruginosa*, aún queda mucho por investigar. Es importante continuar explorando otras fuentes de inhibidores de QS. Las plantas han sido ampliamente documentadas por sus usos medicinales durante

miles de años. A lo largo de millones de años de evolución y adaptación para resistir bacterias, insectos, hongos y el clima, han desarrollado metabolitos secundarios únicos y estructuralmente diversos. En los últimos años, el interés por los compuestos naturales como fuente de sustancias químicas para utilizarlos en la industria farmacéutica retomó su auge. Sus propiedades etnofarmacológicas han sido una fuente principal para el descubrimiento temprano de fármacos (Dias et al., 2012). En este sentido, las plantas son una fuente versátil de compuestos naturales para la obtención de drogas. Los compuestos obtenidos de plantas, presentan una gran diversidad en su estructura química, superando a las de los compuestos sintéticos y a los obtenidos por química combinatorial, con la presencia de diferentes farmacóforos y un alto grado de estereoquímica, por lo cual son considerados aptos para constituirse en drogas. Sin embargo, un pequeño porcentaje (6%) de las plantas existentes, han sido investigadas con profundidad desde el punto de vista farmacológico (Wu, 2004) (Shariati et al., 2024) (Chen et al., 2024).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo es identificar extractos de plantas, principalmente nativas de la región centro de Argentina, que inhiban la actividad del *Quorum Sensing* en *P. aeruginosa*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del agregado de extractos de plantas en la curva de crecimiento de *P. aeruginosa*
2. Validar la actividad anti-*quorum sensing* de cinco extractos seleccionados a partir del cribado de 40 plantas nativas, a través de la determinación de la actividad de exoproteasa y la motilidad por *swarming*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cepas bacterianas a utilizar

Para llevar a cabo los ensayos propuestos, se utilizó la cepa de laboratorio *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1955). Las bacterias fueron crecidas rutinariamente en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Wu, 2004) a 37°C, con agitación constante. Para establecer el control de la inhibición del Quorum Sensing (QS), se emplearon dos cepas mutantes de *P. aeruginosa*: una con el gen *rhIR* delecionado ($\Delta rhIR$) y otra con el gen *lasR* delecionado ($\Delta lasR$) (Holloway, 1955)

- Colección de extractos obtenidos a través de plantas de Argentina

Tal como se mencionó anteriormente, el laboratorio de Química Fina dirigido por la Dra. Carpinella, en la cual se dispone de una colección de 160 extractos etanólicos, los cuales han sido obtenidos en el laboratorio para el aislamiento bioguiado de compuestos químicos con diferentes actividades biológicas (Crespo et al., 2019) (Funes Chabán et al., 2021) (Joray et al., 2013) (Chabán et al., 2019) (Gil et al., 2022) (Joray et al., 2015) (Chiari et al., 2011) (González et al., 2018). Los mismos se encuentran actualmente disponibles en el laboratorio y fueron utilizados para realizar el screening inicial de la actividad antivirulenta y los ensayos propuestos. Utilizamos primeramente 40 extractos del total de la colección y luego para este trabajo seleccionamos cinco extractos correspondientes a las especies *Lantana grisebachii*, *Mandevilla pentlandiana*, *Trichocline reptans*, *Acalypha communis*, *Lippia turbinata*. Para todas las mediciones, se preparó una solución madre del extracto a una concentración 10 mg/mL en etanol 96%.

- Evaluar la curva de crecimiento de la PAO1 con y sin extractos

Se prepararon placas de 96 pocillos conteniendo 100 μ L de medio de cultivo LB por pocillo. A cada pocillo se le adicionaron 10 μ L de los extractos seleccionados, alcanzando una concentración final de 100 μ g/mL. Los controles negativos consistieron en pocillos que contenían únicamente medio LB y el solvente utilizado para la dilución de los extractos, etanol al 1% v/v.

Posteriormente, cada pocillo fue inoculado con 10 μ L de un cultivo overnight de *P. aeruginosa* PAO1. El crecimiento bacteriano se monitoreó midiendo la absorbancia a 600 nm a intervalos de tiempo predeterminados durante un periodo de 24 horas, utilizando un lector de microplacas (Biotek, Sinergy)

- Validar la actividad anti-*quorum sensing* de los cinco extractos seleccionados

Para validar la actividad anti-*quorum sensing* de los cinco extractos seleccionados, se determinó fenotípicamente la inhibición de la producción de exoproteasas y la motilidad por swarming. (Luján et al., 2007a)

- Producción de exoproteasa: Se prepararon placas de agar suplementadas con leche descremada (10% p/v) como sustrato para detectar la actividad proteolítica extracelular. Se inocularon 10 μ L de los filtrados estériles de cultivos *overnight* de *P. aeruginosa* PAO1 con y sin extractos y la cepa control $\Delta RhIR$ como control negativo.

Tras la incubación a 37 °C durante 24 horas, se midió el diámetro del halo de aclaramiento transparente alrededor de cada punto de inoculación. Este halo indica la degradación de la caseína (proteína principal de la leche) por las exoproteasas secretadas por las bacterias (Luján et al., 2007a) .

- Swarming: El ensayo de swarming se realizó en agar LB al 0.5% con o sin extractos de plantas (100 µg/mL final). Se inocularon 3 µL de cultivos *overnight* de *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo), *P. aeruginosa* $\Delta RhlR$ (control negativo) y *P. aeruginosa* PAO1 con los diferentes extractos, previamente diluidos 100 veces, en el centro de las placas. Tras la incubación a 37 °C durante 24 horas, se midió el diámetro de la zona de migración para cuantificar la motilidad swarming y calcular el porcentaje de inhibición en presencia de los extractos, utilizando el control positivo como referencia (Luján et al., 2007b).

RESULTADOS

1. Evaluación de la curva de crecimiento bacteriano frente a los cinco extractos

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos seleccionados, se monitoreó la cinética de crecimiento de las células bacterianas. La evaluación de la viabilidad bacteriana resulta fundamental para evidenciar si los extractos ejercen un efecto bactericida o bacteriostático; es de importancia ya que si genera un efecto bactericida se inhabilita la posibilidad de su uso en cambio si se confirma que no afectan la supervivencia celular permite, así interpretar adecuadamente los efectos observados en ensayos posteriores.

Las bacterias fueron cultivadas en medio Caldo LB a 37°C con agitación constante y en presencia de los extractos vegetales a una concentración de 100 µg/mL. La curva de crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica a 600 nm durante 24 horas. Los resultados indican que los extractos evaluados no alteran la cinética de crecimiento de la cepa PAO1 en comparación con el control (sin extracto). Por lo tanto no tienen actividad antibacteriana a la concentración ensayada. Este es una condición imprescindible para la búsqueda de antivirulentos.

Curva crecimiento

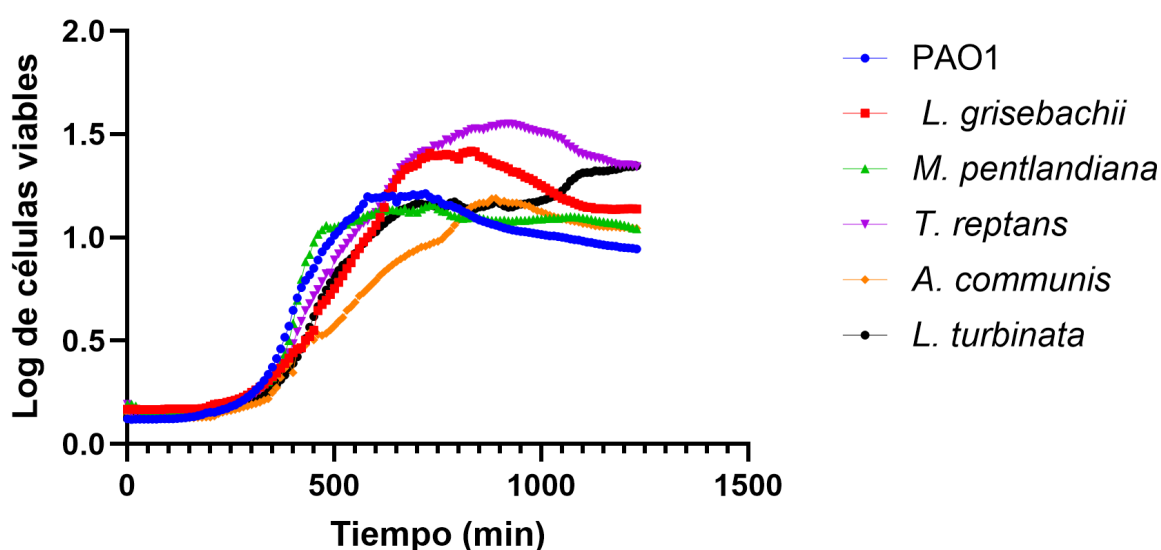


Figura 1: Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1, en presencia y ausencia de los extractos vegetales.

2. Prueba de motilidad por swarming con extractos seleccionados

2.a Evaluación del Desplazamiento por Swarming

El ensayo de motilidad por *swarming* arrojó resultados inesperados en la movilidad bacteriana. El análisis cuantitativo de la motilidad, detallado en la Figura 2, reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,0001$).

La cepa control *P. aeruginosa* PAO1 (sin tratamiento) validó la funcionalidad del ensayo exhibiendo una amplia cobertura de la placa, con un radio de desplazamiento promedio cercano a los 7.5 cm. Por el contrario, la incorporación del vehículo (Control PAO1/DMSO 1%) provocó una disminución abrupta de la motilidad en comparación con el control sin tratar ($p < 0,0001$), registrando valores de aproximadamente 2.2 cm. Este comportamiento fue comparable al de los controles negativos ($\Delta RhIR$ y $\Delta LasR$), sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

Al evaluar los tratamientos vegetales, se observó una tendencia generalizada hacia la inhibición. Los extractos de *L. turbinata*, *M. pentlandiana*, *T. reptans* y *L. grisebachii* mostraron una motilidad restringida en un rango de 2.0 a 3.0 cm, sin diferencias estadísticas respecto al control con solvente ($p > 0.05$). No obstante, el extracto de *A. communis* constituyó una clara excepción a este patrón, induciendo una respuesta de swarming masiva que alcanzó valores cercanos a los 8.0 cm ($p < 0,0001$ vs. Control DMSO). Este resultado no solo revirtió el efecto inhibitorio del vehículo, sino que igualó los niveles de desplazamiento de la cepa salvaje en ausencia de solvente ($p = 0.8162$ vs. Control PAO1). Se observó una reducción significativa en el área de desplazamiento no solo en las placas tratadas con los extractos, sino también en el control de solvente (Figura 2). Esta disminución atípica, que se manifestó consistentemente en los triplicados, impidió una conclusión directa sobre la actividad anti-swarming de los extractos vegetales.

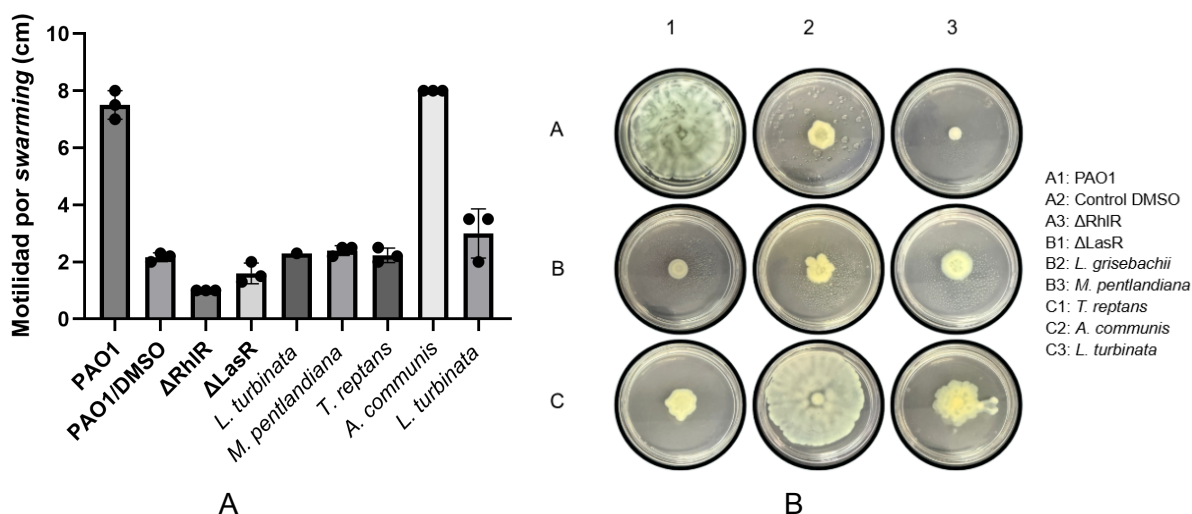


Figura 2: Cuantificación del efecto de los extractos vegetales sobre la motilidad tipo swarming en *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan el diámetro medio de desplazamiento (cm) $\pm$ desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (Figura 2A). Se comparó la respuesta de la cepa salvaje (PAO1) y el control de vehículo (DMSO 1%) frente a los extractos y las mutantes deficientes en QS ($\Delta LasR$ y $\Delta RhIR$).

Análisis de Discrepancias: Evaluación de la sensibilidad al vehículo (DMSO) en el ensayo de swarming

La reducción de la motilidad observada en el control de vehículo planteó una discrepancia con la literatura consultada. Estudios previos han reportado que el DMSO no altera los fenotipos relacionados con el QS en concentraciones de hasta el 2% (Guo et al., 2016). Basándonos en estos antecedentes, se empleó una concentración inicial del 1%,

considerándola inocua. Sin embargo, dada la inhibición evidente en nuestros controles, se procedió a reevaluar experimentalmente el impacto de este solvente sobre la motilidad de la cepa *P. aeruginosa* PAO1.

Para ello, se realizó un ensayo de dosis-respuesta exponiendo a la bacteria a un gradiente de concentraciones de DMSO (0%, 0.25%, 0.5% y 1%). Los resultados, ilustrados en la Figura 3, contrastaron con los reportes bibliográficos, revelando una inhibición dosis-dependiente a concentraciones inferiores a las esperadas. Mientras que la condición libre de solvente (0%) mostró un fenotipo de *swarming* normal, la presencia de DMSO al 1% suprimió drásticamente el desplazamiento y alteró el patrón de migración. Incluso a concentraciones del 0.5%, se observaron efectos inhibitorios visibles. Este hallazgo demuestra que, para esta cepa y bajo estas condiciones experimentales, la tolerancia al vehículo es menor a la reportada por otros autores, estableciéndose el límite de seguridad operativa en 0.25% para evitar falsos negativos en la evaluación de extractos

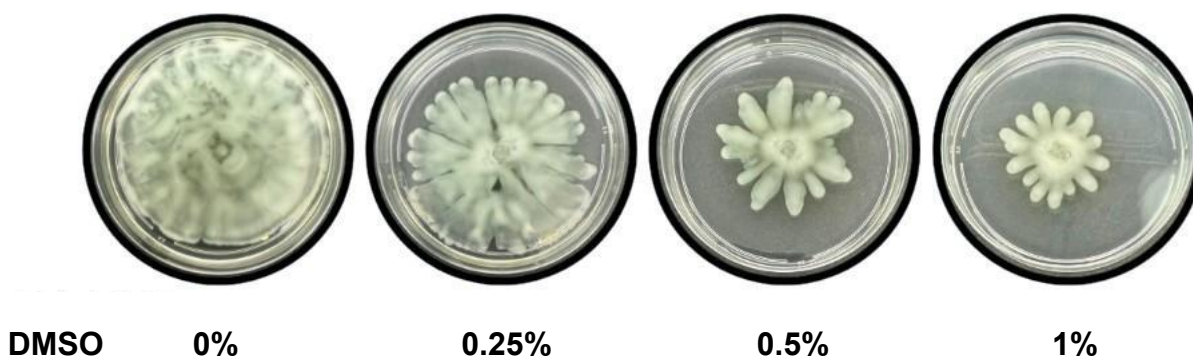


Figura 3: Efecto de concentraciones crecientes de DMSO sobre el ensayo de motilidad por *swarming* en *P. aeruginosa* PAO1. Imágenes representativas de las colonias bacterianas desarrolladas en placas de agar blando tras 24 horas de incubación a 37 °C. Se muestran los fenotipos obtenidos al suplementar el medio de cultivo con diferentes concentraciones finales del solvente: 0% (control sin vehículo), 0.25%, 0.5% y 1% v/v.

3. Prueba de actividad de exoproteasas con extractos seleccionados

La capacidad de los extractos para interferir con la secreción de factores de virulencia se evaluó mediante la cuantificación de la actividad proteolítica extracelular (Figura 4). La cepa control *P. aeruginosa* PAO1 exhibió una robusta hidrólisis de la caseína, generando halos de clarificación con un diámetro promedio de 1.8 cm. A diferencia de lo observado en los ensayos de movilidad, la presencia del vehículo (DMSO) no alteró significativamente la producción de proteasas ($p > 0,9999$), registrando valores comparables a la condición sin tratamiento.

La validación funcional del ensayo mediante las cepas mutantes reveló diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p < 0,0001$). La cepa $\Delta lasR$ mostró una ausencia total de halos de hidrólisis ($p < 0,0001$ vs. PAO1), confirmando que la actividad caseino-lítica es estrictamente dependiente del regulador $\Delta LasR$. Por su parte, la mutante $\Delta RhIR$

presentó una reducción parcial de la actividad, con halos significativamente menores (~0.8 cm, $p < 0,0001$) y de bordes difusos, lo que sugiere una actividad residual basal independiente del sistema Rhl pero subordinada al sistema Las.

Al analizar el efecto de los tratamientos vegetales, los extractos de *L. grisebachii*, *M. pentlandiana*, *T. reptans*, *A. communis* y *L. turbinata* mostraron halos de hidrólisis en el rango de 1.5 a 1.8 cm. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control con vehículo ($p > 0.05$). Esto se corrobora cualitativamente en la Figura 5, donde se observa que la morfología y el tamaño de los halos en las placas tratadas con extractos son visualmente indistinguibles del control con DMSO, contrastando con la ausencia de halo en $\Delta lasR$ y la morfología alterada de $\Delta RhlR$.

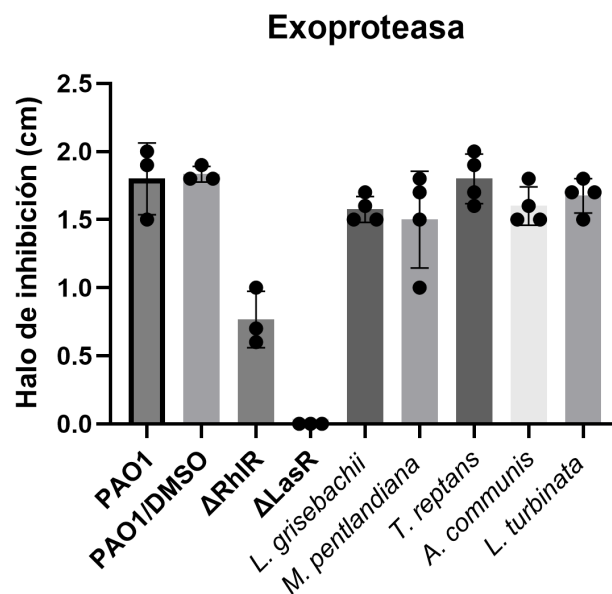


Figura 4: Cuantificación de la actividad de exoproteasas en *P. aeruginosa* PAO1. Medición del diámetro de los halos de hidrólisis de caseína (cm) obtenidos tras 24 horas de incubación. El gráfico detalla los valores medios $\pm$ desviación estándar correspondientes a los controles (cepa salvaje, vehículo DMSO (1%), mutantes $\Delta LasR$ y $\Delta RhlR$) y a los tratamientos con los cinco extractos vegetales seleccionados.

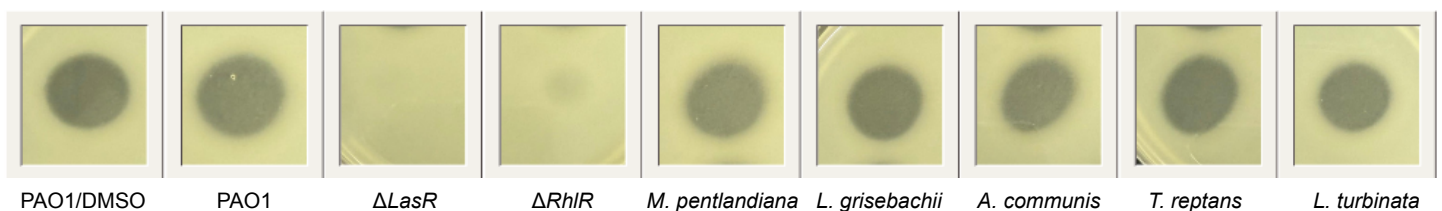


Figura 5: Ensayo cualitativo de actividad de exoproteasas en medio agar leche descremada. Imágenes representativas de los halos de hidrólisis generados por *P. aeruginosa* PAO1 tras 24 horas de incubación a 37°C. Se muestran los fenotipos correspondientes a la cepa salvaje, los controles de inhibición ($\Delta LasR$ y $\Delta RhlR$), el control de vehículo (DMSO 1%) y los tratamientos con los extractos vegetales evaluados

Perspectivas para el futuro

A partir de los hallazgos preliminares y las limitaciones identificadas en este estudio, se proponen las siguientes etapas para profundizar en la caracterización de los extractos con potencial antivirulento:

1. Optimización metodológica y del vehículo de entrega

Dada la interferencia observada con el DMSO en los ensayos de movilidad, resulta prioritario evaluar sistemas de solventes alternativos o estrategias de emulsificación que permitan aumentar la solubilidad de los extractos sin comprometer la fisiología bacteriana. Se propone explorar el uso de ciclodextrinas o emulsiones no tóxicas para garantizar que los efectos observados sean exclusivamente atribuibles a los fitoquímicos.

2. Elucidación del blanco molecular mediante plásmidos reporteros

Para determinar la especificidad del mecanismo de inhibición dentro de la compleja red del Quorum Sensing, se incorporará el uso de plásmidos de fusión transcripcional. Se empleará el plásmido pME3853 (*lasI::lacZ*) para evaluar la interferencia sobre el sistema Las (regulador maestro) y el plásmido pME3846 (*rhII::lacZ*) para el sistema Rhl. La medición de la actividad beta-galactosidasa permitirá discernir si los extractos activos actúan bloqueando la síntesis de autoinductores o la activación de los receptores transcripcionales.

3. Fraccionamiento bioguiado e identificación de metabolitos activos

Considerando el perfil prometedor del extracto de *A. communis* en el ensayo de swarming y la actividad de los otros extractos, se proyecta realizar un fraccionamiento bioguiado mediante cromatografía. El objetivo es aislar e identificar, mediante técnicas espectroscópicas (RMN, HPLC-MS), los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica, pasando de un extracto crudo complejo a moléculas puras con potencial farmacológico.

4. Evaluación sobre la formación de Biofilm y Sinergismo

Dado que el QS regula la formación de biopelículas (biofilms), una estructura clave en la resistencia antibiótica, se propone evaluar la capacidad de los extractos para inhibir la adhesión y maduración del biofilm. Asimismo, se realizarán ensayos de combinación (tipo checkerboard) para determinar si los extractos actúan como coadyuvantes capaces de restaurar la sensibilidad de *P. aeruginosa* a antibióticos convencionales, cumpliendo así con el objetivo último de la terapia antivirulenta.

DISCUSIÓN

El presente trabajo se centró en la búsqueda de estrategias antivirulentas a partir de la flora nativa de Argentina, una alternativa prometedora frente a la crisis de resistencia antimicrobiana. Los resultados obtenidos permiten realizar un análisis integral sobre la bioactividad de los extractos y, fundamentalmente, sobre las condiciones experimentales necesarias para evaluarlos correctamente.

En primer lugar, se confirmó que ninguno de los cinco extractos seleccionados afectó la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1. Este hallazgo es crucial, ya que valida que los compuestos no actúan como antibióticos tradicionales (bactericidas o bacteriostáticos), sino que cumplen con el requisito primario de una terapia antivirulenta: desarmar al patógeno sin ejercer la presión selectiva que conduce a la resistencia.

Respecto a los factores de virulencia, el ensayo de exoproteasas mostró que, si bien la técnica fue validada correctamente mediante el uso de cepas mutantes ($\Delta RhlR$ y $\Delta LasR$), los extractos no lograron inhibir significativamente la actividad proteolítica regulada por el sistema Las. Esto sugiere que los metabolitos presentes en estas especies vegetales, a las concentraciones ensayadas, no interfieren con la vía de señalización *LasI/LasR*.

Sin embargo, el aspecto más relevante de esta discusión surge del análisis del ensayo de swarming. A diferencia de lo reportado en la literatura, donde se describe al DMSO como un vehículo inerte en concentraciones de hasta el 2%, nuestros ensayos revelaron que la cepa PAO1 utilizada en nuestro grupo de estudio presenta una alta sensibilidad a este solvente. La inhibición dosis-dependiente observada en los controles demostró que concentraciones del 1% son suficientes para anular la motilidad, lo que representa un hallazgo metodológico de gran valor para el laboratorio. Haber identificado que el límite de tolerancia es del 0.25% permite redefinir los protocolos de trabajo del grupo, evitando falsos positivos en futuras investigaciones que utilicen esta cepa.

Es destacable que, en este contexto de alta sensibilidad al vehículo, el extracto de *Acalypha communis* mostró un comportamiento excepcional. A pesar de estar disuelto en DMSO, este tratamiento logró restablecer e impulsar la motilidad bacteriana a niveles comparables al control sin solvente. Esto plantea una interesante incógnita biológica: es posible que *A. communis* contenga compuestos que actúen sobre la regulación del sistema *Rhl* o sobre la producción de biosurfactantes (ramnolípidos), contrarrestando el efecto físico-químico o biológico del solvente.

CONCLUSIÓN

El desarrollo de este Trabajo Final permitió arribar a conclusiones que abarcan tanto la actividad biológica de las plantas nativas como la optimización de los procesos experimentales en el laboratorio:

1. Potencial antivirulento (Selectividad): Se demostró que los extractos de *L. grisebachii*, *M. pentlandiana*, *T. reptans*, *A. communis* y *L. turbinata* no afectan la viabilidad de *P. aeruginosa*. Esto confirma su potencial como fuente de moléculas que no generan presión de selección para la resistencia antibiótica.
2. Aporte metodológico para el grupo de estudio: Se determinó que el DMSO, solvente estándar para la extracción de metabolitos, interfiere significativamente con la motilidad tipo *swarming* de la cepa PAO1 a concentraciones superiores al 0.25%. Este hallazgo refuta parcialmente antecedentes bibliográficos para esta cepa específica y establece un nuevo parámetro de control de calidad interno, fundamental para asegurar la validez de futuros ensayos en el laboratorio.
3. Actividad biológica diferencial: Si bien la mayoría de los extractos no mostraron inhibición de los factores de virulencia evaluados (exoproteasas y *swarming*), el extracto de *A. communis* se destacó por inducir una fuerte respuesta de motilidad, superando la inhibición del vehículo. Esto señala a dicha especie como un candidato interesante para investigar mecanismos de regulación positiva o producción de surfactantes.
4. Validación de herramientas genéticas: El uso de las cepas mutantes $\Delta LasR$ y $\Delta RhIR$ resultó efectivo para validar los ensayos fenotípicos, confirmando la dependencia genética de la producción de exoproteasa y la motilidad, sentando las bases para su uso combinado con plásmidos reporteros en etapas futuras.
5. Desarrollo del pensamiento científico y resolución de problemas: En el plano de nuestra formación académica, la realización de esta tesina constituyó una instancia decisiva para la apropiación del método científico como herramienta de trabajo. La experiencia práctica de diseñar protocolos experimentales y validar resultados mediante análisis estadísticos rigurosos nos brindó una perspectiva analítica indispensable para nuestra profesión. Particularmente, el desafío de identificar y resolver las interferencias técnicas surgidas durante la verificación de nuestras hipótesis (como la problemática del solvente) fortaleció nuestra capacidad de resolución de problemas. Esta aptitud para indagar, cuestionar y validar evidencia es, sin duda, el mayor aporte que llevamos a nuestra futura práctica farmacéutica, donde la toma de decisiones basada en datos confiables es imperativa.
6. Impacto en la formación y práctica farmacéutica: Finalmente, la realización de este trabajo ha trascendido el ámbito experimental, consolidando nuestro criterio profesional frente a una de las mayores problemáticas de la salud pública actual: la resistencia antimicrobiana. Comprender la complejidad de los mecanismos de virulencia bacteriana y las limitaciones de las terapias actuales nos posiciona con una mayor responsabilidad en nuestra futura práctica. Este recorrido reafirma nuestro compromiso no solo con la investigación, sino con el rol del farmacéutico como educador sanitario y garante del uso racional de los antibióticos, pieza clave para preservar las herramientas terapéuticas disponibles para las generaciones futuras.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABOBAKR, H. M.; ABBAS, S. M. Z. E. Relationship Quorum Sensing genes RhIR and LasI to Production of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *NeuroQuantology*, 2022, vol. 20, no 10, p. 7318-7323.
2. CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.-C. [et al.] Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 1998. vol. 11, no 11, p. 1119-1129.
3. CHABÁN, M. F. [et al.]. Antibacterial effects of extracts obtained from plants of Argentina: Bioguided isolation of compounds from the anti-infectious medicinal plant *Lepechinia meyenii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, vol. 239.
4. CHEN, P.; QIN, J.; SU, H. K. [et al.]. Harmine acts as a quorum sensing inhibitor decreasing the virulence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infectious Diseases*, 2024, vol. 24, no 1, p. 760.
5. CHIARI, M. E. [et al.]. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, vol. 19, no 11, p. 3474-3482.
6. CHILTON, M. D. [et al.]. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 Bacteriophage DNA Not Detected in Crown Gall Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1974, vol. 71, no 9, p. 3672-3676.
7. CRESPO, M. I. [et al.]. Inhibitory effects of compounds isolated from *Lepechinia meyenii* on tyrosinase. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, vol. 125, p. 383-391.
8. DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2012, vol. 2, no 2, p. 303-336.
9. DICKEY, S. W.; CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, vol. 16, no 7, p. 457-471.
10. FEATHERS, S. K. et al. The PqsE-RhIR Interaction Regulates RhIR DNA Binding to Control Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 2022, vol. 13, no 1, p. e03565-21.
11. FUNES CHABÁN, M [et al.]. Inhibition of MurA Enzyme from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Diterpenes from *Lepechinia meyenii* and Their Synthetic Analogs. *Antibiotics*, 2021, vol. 10, no 12, p. 1535.
12. GIL, F [et al.]. Extracts from Argentinian native plants reverse fluconazole resistance in *Candida* species by inhibiting the efflux transporters Mdr1 and Cdr1. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022, vol. 22, no 1, p. 264.

13. GONZÁLEZ, M. L. [et al.]. Cytotoxic Activity of Extracts from Plants of Central Argentina on Sensitive and Multidrug-Resistant Leukemia Cells: Isolation of an Active Principle from *Gaillardia megapotamica*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, vol. 1.
14. GUO, Q. [et al.]. Potential Use of Dimethyl Sulfoxide in Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016, 60(12), 7159-69.
15. HOLLOWAY, B. W. Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 1955, vol. 13, no 3, p. 572-581.
16. JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. *Phytomedicine*, 2013, vol. 20, no 3-4, p. 258-261.
17. JORAY, M. B. [et al.]. Antibacterial and Cytotoxic Activity of Compounds Isolated from *Flourensia oolepis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, p. 1-11.
18. LI, X. et al. Potential Use of Dimethyl Sulfoxide in Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, vol. 60, no 12, p. 7538-7541.
19. LUJÁN, A. M. [et al.]. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain. *Microbiology*, 2007, vol. 153, no 1, p. 225-237.
20. PROCTOR, C. R.; MCCARRON, P. A.; TERNAN, N. G. Furanone quorum-sensing inhibitors with potential as novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, vol. 69, no 2, p. 195-206.
21. SHARIATI, A. [et al.]. Inhibitory effect of natural compounds on quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*: A helpful promise for managing biofilm community. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, vol.15.
22. SINGH, V. K.; ALMPANI, M.; MAURA, D. [et al.]. Tackling Recalcitrant *Pseudomonas aeruginosa* Infections In Critical Illness via Anti-virulence Monotherapy. *Microbiology*, 2022.
23. TURKINA, M. V.; VIKSTRÖM, E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Innate Immunity*, 2019, vol. 11, no 3, p. 263-279.
24. VANEGAS MÚNERA, J. M.; JIMÉNEZ QUICENO, J. N. Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿hacia una era postantibiótica? *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 2020, vol. 38, no 1), p. 1-6.
25. VÁZQUEZ-CABRERA, N.; ESPINOSA-MÁRQUEZ, A.; CEDILLO-RAMÍREZ, M. L. Evolución histórica de la Organización Mundial de la Salud y la resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2023, vol 47, no 1.
26. XIAO, Q. et al. The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Molecules*, 2022, vol. 27, no 14, p. 4488.

27. WU, H. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, vol. 53, no 6, p. 1054-1061.

ANEXO

Planta	Usos medicinales	
<i>Lantana grisebachii</i>	Laxante, diurético, antipirética, antibacteriana	
<i>Mandevilla pentlandiana</i>	No se conocen	
<i>Trichocline reptans</i>	Digestivo, diaforético	
<i>Acalypha communis</i>	No se conocen	
<i>Lippia turbinata</i>	Digestivo	

Fotografías tomadas del **Instituto de Botánica Darwinion**.