



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL**

**ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE LAS PROTEÍNAS DE LA
MIEL DE ABEJA *Melipona beecheii* CONTRA
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**

REPOSITORIO

Que presenta:

Luis Felipe Pool Yam

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable

Director de tesis:

Dr. Roberto Zamora Bustillos

Conkal, Yucatán, México

Noviembre, 2024





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Conkal
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Conkal, Yucatán, México, a 26 de noviembre de 2024

El comité de tesis del candidato a grado: Luis Felipe Pool Yam, constituido por los CC. Dr. Roberto Zamora Bustillos, Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, Dr. Jesús Manuel Ramon Sierra, Dr. Mario Alberto Martínez Núñez, Dr. Arturo Reyes Ramírez y Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Actividad antibiofilm de las proteínas de la miel de abeja *Melipona beecheii* contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Roberto Zamora Bustillos
Director de Tesis

Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez
Co-director de Tesis

Dr. Jesús Manuel Ramon Sierra
Asesor de Tesis

Dr. Mario Alberto Martínez Núñez
Asesor de Tesis

Dr. Arturo Reyes Ramírez
Asesor de Tesis

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde
Asesor de Tesis



Conkal, Yucatán, México a 26 de noviembre de 2024.

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Luis Felipe Pool Yam

ÍNDICE DE CONTENIDO

Declaratoria de propiedad	iii
Índice de contenido	iv
Índice de cuadros y figuras	v
Resumen.....	vi
Abstract	vii
I. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes	2
1.2.1 Menipolicultura	2
1.2.2 <i>Melipona beecheii</i> y su importancia	3
1.2.3 La miel de <i>Melipona beecheii</i>	4
1.2.4 Proteínas de la miel <i>Melipona beecheii</i>	5
1.2.5 Enfermedades nosocomiales.....	6
1.2.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.2.6.1 Enfermedades causadas por <i>P. aeruginosa</i>	9
1.2.6.2 Antibióticos utilizados en <i>P. aeruginosa</i>	11
1.2.7 Formación y Mecanismos del biofilm	13
1.2.16 Compuestos con actividad anti-biofilm	16
1.2.10 La miel como agente antibiofilm.....	18
Hipótesis	22
1.3 Objetivos	22
1.4.1 Objetivo general.....	22
1.4.2 Objetivos específicos	22
1.4 Procedimiento experimental.....	23
1.6 Literatura citada.....	24

II. CAPÍTULO 2. EFFECT OF conA-UNBOUND PROTEINS FROM <i>Melipona beecheii</i> HONEY ON THE FORMATION OF <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 BIOFILM	30
Resumen / Abstract	30
III. CAPITULO 3. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA MIEL DE ABEJA <i>Melipona beecheii</i> SOBRE EL PROTEOMA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	31
Resumen / Abstract	31

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. 1 Colmenas de abejas sin aguijón.....	2
Figura 1. 2 Abeja <i>Melipona beecheii</i>	3
Figura 1. 3 Sistema de secreción tipo III de <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 1. 4 Tratamientos farmacológicos para combatir a <i>P. aeruginosa</i>	12
Figura 1. 5 Diagrama de la formación de biofilm en cuatro etapas..	14
Figura 1. 6 Sistemas generales de QS bacterianos en bacterias Gram-negativas..	15
Figura 1. 7 Estrategia experimental.	23
Cuadro 1. 1 Criterio de prioridades para bacterias nosocomiales.	7

Resumen

La abeja (*Melipona beecheii*) es una abeja sin aguijón que produce una miel que tiene un alto valor económico en el mercado local, asimismo es valorada por sus propiedades medicinales y recientemente se ha reportado que las proteínas que se encuentran en la miel contribuyen con la actividad antimicrobiana. Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que puede crecer en diferentes superficies bióticas o abióticas, debido a su capacidad de formar biofilm, permitiendo a la bacteria adaptarse a los cambios de su entorno. El biofilm es una comunidad bacteriana rodeada de una matriz difícil de erradicar, por lo que representa un problema en la salud humana y animal, provocando posibles enfermedades mortales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las proteínas de la miel de *M. beecheii* en la formación del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

En la primera parte del trabajo se evaluó la actividad antibiofilm de las proteínas de la miel de su extracto crudo (ECP) así como de sus fracciones en microplacas y en láminas de vidrio, se evaluó el efecto en la morfología y expresión génica. El ECP y la fracción F1 inhibieron la formación del biofilm de *P. aeruginosa* por encima del 80 % a 4 y 1.3 µg/mL, respectivamente. Estas proteínas afectaron la estructura de la biopelícula, así como la expresión de los genes *fleQ* y *fleR* involucrados en la formación y regulación de la biopelícula de *P. aeruginosa*.

En la segunda parte del trabajo se evaluó el efecto en el proteoma del biofilm de *P. aeruginosa* en presencia de las proteínas antibiofilm de la miel de *M. beecheii* por electroforesis bidimensional y se predijo las posibles proteínas afectadas utilizando secuencias de proteínas de biofilm de esta bacteria depositadas en la base de datos UniProt. Con los resultados obtenidos se pudo inferir que las proteínas de *M. beecheii* afectan a proteínas de rutas metabólicas, involucradas en la formación de biofilm como la comunicación bacteriana, en la producción de exopolisacáridos y en el anclaje del biofilm.

Abstract

he bee (*Melipona beecheii*) is a stingless bee that produces honey with high economic value in local markets. This honey is also prized for its medicinal properties, and recent reports suggest that the proteins present in the honey contribute to its antimicrobial activity. On the other hand, *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen capable of growing on various biotic and abiotic surfaces due to its ability to form biofilms, which allow the bacteria to adapt to environmental changes. A biofilm is a bacterial community encased in a matrix that is difficult to eradicate, posing a significant threat to human and animal health by causing potentially fatal diseases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of *M. beecheii* honey proteins on the biofilm formation of *P. aeruginosa*.

In the first part of the study, the antibiofilm activity of honey proteins was assessed using the crude protein extract (CPE) and its fractions on microplates and glass slides. The effect on morphology and gene expression was also evaluated. The CPE and fraction F1 inhibited *P. aeruginosa* biofilm formation by over 80% at concentrations of 4 and 1.3 µg/mL, respectively. These proteins disrupted the biofilm structure and affected the expression of the *fleQ* and *fleR* genes, which are involved in the formation and regulation of *P. aeruginosa* biofilms.

In the second part of the study, the impact of *M. beecheii* honey antibiofilm proteins on the *P. aeruginosa* biofilm proteome was analyzed using two-dimensional electrophoresis. Potentially affected proteins were predicted by comparing the results with biofilm protein sequences of this bacterium available in the UniProt database. The findings suggest that *M. beecheii* honey proteins interfere with proteins involved in metabolic pathways related to biofilm formation, such as bacterial communication, exopolysaccharide production, and biofilm anchoring.

I. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción

La miel de la abeja (*Melipona beecheii*), es un producto natural con un alto valor ceremonial, nutricional y medicinal; utilizado desde la antigüedad por la civilización maya (Kuropatnicki *et al.* 2018). En la actualidad esta miel se sigue utilizando como alimento y medicina tradicional, debido a sus atribuciones curativas, y es utilizada para tratar alergias, bronquitis, asma, úlceras, infecciones de las vías respiratorias, quemaduras, picaduras de insectos, conjuntivitis, etc. Por tales propiedades el precio de este producto es superior en comparación con la miel de la abeja europea (*Apis mellifera*). Estas propiedades medicinales que presenta la miel, son benéficas para la salud (Israili, 2014), lo que ha generado que diversos autores realicen estudios *in vitro* sobre propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, antibiofilm, entre otras (Morroni *et al.*, 2018; Ramón-Sierra *et al.*, 2019). Estudios recientes han demostrado que la miel de *M. beecheii* presenta actividad antimicrobiana contra diversas cepas patógenas que causan enfermedades gastrointestinales. Esta actividad es atribuida a moléculas de origen proteico, entre las que se han reportado una proteasa de 95 kDa y otras dos de 25 kDa, donde una de ellas presenta una homología con una *Royal-like yellow protein* de *Melipona quadrifasciata*, las cuales inhibieron el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Ramón-Sierra *et al.* 2022). Esta inhibición ocasionada por las proteínas de la miel es importante, ya que este patógeno ha adquirido resistencia a ciertos antibióticos de uso clínico y además presenta la capacidad de formar biofilm, el cual es un mecanismo de defensa muy difícil de inhibir, ya que le ayuda a soportar grandes concentraciones de antibióticos aumentando hasta 100 veces más su resistencia que en células planctónicas (Kim y Kang, 2020). Por lo tanto, el uso de estas proteínas puede ser una alternativa para combatir las infecciones que ocasiona este patógeno, ya que en la actualidad no existe un tratamiento eficaz para combatir los biofilm bacterianos causados por la *P. aeruginosa*. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de las proteínas antibiofilm de la miel de *M. beecheii* en la formación del biofilm de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Melipolicultura

La meliponicultura, es también conocida como la apicultura sin aguijón. El cual es una actividad que involucra la crianza, manejo y el cuidado de las abejas sin aguijón, ya que estas abejas carecen de un aguijón funcional (Cortopassi-Laurino *et al.* 2006). Entre los productos principales de estas abejas se encuentra la miel, el polen y la cera. Para llevar a cabo esta actividad y obtener estos productos se construyen casas sin paredes con techo elaborado de paja (hojas de palma), estas casas son conocidas como meliponarios o colmenares, donde abejas hacen sus nidos en cajas de madera con forma de prisma rectangular o en jobones (Figura 1.1) (Guzmán *et al.* 2011; Arnold *et al.* 2018).



Figura 1. 1 Colmenas de abejas sin aguijón. A) Meliponario yucateco, B) Jobones (troncos huecos). Foto propia.

Las abejas sin aguijón pertenecen a la subfamilia Meliponinae, la cual se encuentra dividida en tres tribus: Meliponini, Trigonini y Lestrimelittini (Nordin *et al.* 2018). Estas se pueden encontrar en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, además se estima que existen más de 500 especies morfológicamente diferentes que comprenden desde las más pequeñas como las del tamaño de una mosca de fruta hasta las más grandes como las abejas que comúnmente se conocen (Leonhardt, 2017; Hrncir *et al.* 2019). En México se han registrado 46 especies de abejas sin aguijón de las cuales 13 son endémicas. En la península de Yucatán se pueden encontrar las especies: *Cephalotrigona zexmeniae*, *Lestrimelitta niitkib*, *Melipona yucatanica*, *Nannotrigona perilampoides*, *Plebeia orizabaensis*, *Plebeia frontalis*, *Plebeia moureana moureana*, *Peponapis parkeri*, *Plebeia pulchra*, *Scaptotrigona pectoralis*, *Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra*, *Trigona fulviventris*, *Trigona fuscipennis*,

Trigonisca maya, *Trigonisca pipioli* y *Melipona beecheii* (Quezada-Euán, 2005). Siendo esta última la especie de abeja que más se cultiva en el estado de Yucatán, debido que produce mayor volumen de miel y una producción constante de abejas reinas, lo que proporciona un mejor manejo para la propagación de nuevas colonias (Paris *et al.* 2020).

1.2.2 *Melipona beecheii* y su importancia

La abeja (*Melipona beecheii*) es una abeja sin aguijón, conocida en nombre maya como Xunaan-Kab, Colel-Kab y Pool-Kab. Esta especie es nativa de la península de Yucatán y pertenece a la subfamilia Meliponinae y a la tribu meliponini. Tiene características morfológicas similares a la abeja *Apis mellifera*. La abeja *M. beecheii* tiene un tamaño aproximado de 9.7 a 10.7 mm de largo, es de color negro y anaranjado en casi todo su cuerpo con franjas amarillas en su abdomen, patas de color negro y alas transparentes más pequeñas que el tamaño de su abdomen (Figura 1.2) (Guzman *et al.* 2011)



Figura 1. 2 Abeja *Melipona beecheii*. Foto propia.

Esta especie de abeja sale constantemente de su colmena a recolectar polen y néctar de las flores, por lo que se considera abejas altamente eusociales. Las abejas eusociales presentan la característica de ser excelentes polinizadores, ya que ayudan a la polinizar la flora silvestre de la península yucateca, brindando un servicio grande al ecosistema. Además, se ha reportado que las abejas sin aguijón visitan frecuentemente cultivos vegetales, estas ayudan a mejorar la producción de frutos y semillas de ciertos cultivos (aguacate, tomate, achiote, chile habanero, calabaza, café y entre otros cultivos) (Quezada-Euán, 2018).

1.2.3 La miel de la abeja (*Melipona beecheii*)

La miel es una sustancia natural, dulce y viscosa producida por las abejas obreras, que recogen del néctar de las flores y lo depositan en su panal para su maduración después de la digestión (Chua *et al.* 2014). Este proceso se lleva a cabo en varios pasos. Paso 1, las abejas recolectan el néctar con su lengua o probóscide, el cual es ingerido y depositado en su abdomen, específicamente en un saco melario denominado buche. En ese momento empieza la síntesis de la miel, ya que las enzimas secretadas por las glándulas hipofaríngeas interactúan con néctar. Entre las enzimas que se han reportado que intervienen en la producción de la miel son proteasas, catalasa, diastasa (amilasas), glucosa oxidasa, invertasa (α -glucosidasa), lipasa, peroxidasa, polifenol oxidasa, sacarasa y superóxido dismutasa (Nagai *et al.* 2012; Israili, 2014; Lichtenberg-Kraag, 2014). Paso 2, cuando la abeja ha llenado su saco melario, regresa a la colmena y el néctar recolectado es transferido varias veces a otras abejas obreras de boca en boca. Esta transferencia le proporciona más enzimas al néctar recolectado. Paso 3, las abejas obreras depositan la miel en potes hechos de cera y realizan un proceso de abaniqueo, el cual con sus alas las agitan para eliminar gran parte de la humedad del néctar. Finalmente Paso 4, los potes donde se almacena la miel son sellados con la misma cera para su maduración.

Esta miel se estima que está compuesta aproximadamente por 180 compuestos químicos diferentes. Pero se sabe que está compuesta mayormente por azúcares (fructosa y glucosa principalmente) y agua. También posee en menor cantidad una gran variedad de compuestos como vitaminas (A, C, E, K, B1, B2, B6), minerales esenciales (potasio, calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, sodio, zinc y selenio), polifenólicos (flavonoles, flavonas, flavonoides, flavanonas, antocianidinas, chalconas, isoflavonas y ácidos fenólicos), ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas y enzimas. Todos estos compuestos le proporcionan a la miel un aspecto, olor, sabor y propiedad diferente, ya que la miel de *M. beecheii* se distingue contener menor proporción de azúcares y por ser menos viscosa, más ácida y húmeda en comparación con la miel de *Apis mellifera* (abeja con aguijón) (Bocian *et al.* 2019; Cianciosi *et al.* 2018; Meo *et al.* 2017; Chua *et al.* 2014). En cuanto a la producción de miel de abeja (*Melipona beecheii*) la producción en volumen de miel es de 1 a 2 kg de miel por colmena al año, si la comparamos con la producción de las abejas *Apis mellifera* es menor, ya que estas producen en promedio 20 kg de miel por colmena al año. En relación con el precio de este producto la miel de *M. beecheii* llega a alcanzar hasta los \$100 dólares/kg de miel, un precio elevado en comparación con la miel de *A. mellifera*

que su precio llega a costar de \$20 a 40 dólares/kg de miel (Ávila *et al.* 2018; Ávila *et al.* 2019).

Los antiguos Mayas utilizaban la miel de *M. beecheei* para la elaboración de bebidas en sus rituales ceremonias así, como un medicamento altamente importante para tratar diferentes enfermedades (Rosales, 2013). En la actualidad esta miel es utilizada para tratar enfermedades gastrointestinales, como tratamiento contra enfermedades oculares e infecciones respiratorias, para la cicatrización de heridas en la piel y úlceras cutáneas (Moo-Huchin *et al.* 2015). Recientemente se ha demostrado en estudios *in vitro* que esta miel posee propiedades como antifúngicas, antiinflamatorio, antidiabético, antioxidante y antimicrobiano, siendo la actividad antimicrobiana uno de los atributos más importantes que posee este alimento (Alvarez-Suarez *et al.* 2018). En Yucatán se ha reportado que esta miel, puede inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomona aeruginosa* con concentraciones menores de 15 % (p/v) (Chan-Rodríguez *et al.* 2012; Ramón-Sierra *et al.* 2015; Ramón-Sierra *et al.* 2022). También se ha visto que disminuye el número de transcritos de genes de patogenicidad en *E. coli* O157:H7 y que además muestra una afinidad hacia ácidos nucleicos (Hau-Yama *et al.* 2020; Ramón-Sierra *et al.* 2020a). Debido a su gran variedad de compuestos que conforman este alimento, presenta un mecanismo muy complejo contra estos patógenos. Entre los compuestos y agentes antimicrobianos que se le atribuyen son: la presión osmótica, el peróxido de hidrógeno o el bajo pH (Kwakman y Zaat 2012; Ortiz-Vázquez *et al.* 2013), sin embargo recientemente se ha demostrado que los compuestos de origen fenólico y proteico presentan actividad biológica con cepas patógenas incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa* (Ortiz-Vázquez *et al.* 2013; Ramón-Sierra *et al.* 2020).

1.2.4 Proteínas de la miel de abeja (*Melipona beecheii*)

Estudios recientes han reportado que diversas proteínas encontradas en la miel contribuyen con la actividad antimicrobiana. Algunos autores señalan que las proteínas de la miel provienen del polen cuya función es de alimentación (Crailsheim, 1990). Por otra parte, otros autores reportan la presencia de proteínas nativas de la misma abeja, ya que estas sirven

como marcadores entomológicos para diferenciar las mieles de acuerdo la especie que la produce (Ramón-Sierra *et al.* 2015).

Entre las proteínas reportadas en la miel se encuentran las MRJP1, MRJP3, MRJP4 y MRJP7. Pertenecientes a la familia de proteínas de la jalea real [*Mayor Royal Jelly Protein* (MRJP)], las cuales son secretadas por las glándulas salivales de la abeja. Se ha reportado que las MRJP1, MRJP3 y MRJP4 inhiben el crecimiento de cepas patógenas y son las responsables de la actividad antimicrobiana. También se han reportado en la miel enzimas como proteasas, catalasas, amilasas y péptidos antimicrobianos como la defensina-1 (Boorn *et al.* 2010; Brudzynski y Miotto, 2011; Alves *et al.* 2013; Morroni *et al.* 2018).

Hablando específicamente de las proteínas de la miel de *M. beecheii* se ha encontrado, que esta miel contiene un promedio de 24 proteínas de las cuales 3 (dos de 25 kDa y una de 95 kDa) de ellas contribuyen con la actividad antimicrobiana de esta miel. Estas proteínas tienen un efecto contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Ramon-Sierra *et al.* 2022). Por lo que estas proteínas son excelentes candidatas como alternativa para tratar infecciones causadas por cepas patógenas productoras de biofilm, específicamente contra el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ya que esta bacteria ocasiona graves problemas en la salud pública causando infecciones y enfermedades nosocomiales. Además, esta bacteria ha adquirido resistencia a ciertos antibióticos de uso clínico y es capaz de formar biofilm (biopelículas) lo que le permite aumentar su resistencia a los antibióticos hasta 100 veces más, por lo cual es uno de los mecanismos de defensa más difícil de inhibir (WHO, 2018).

1.2.5 Enfermedades nosocomiales

Las enfermedades nosocomiales son aquellas que atacan al paciente durante su estadía en el hospital, es decir, el enfermo llega al centro de salud para atender su problema y este se complica al contraer otra enfermedad que no estaba presente al momento de su ingreso; usualmente debido a la falta de higiene, esterilización ineficaz de los materiales clínicos y al debilitamiento inmunológico del paciente (OMS, 2019; OMS, 2021).

El espectro de patógenos involucrados en una enfermedad nosocomial abarca las de tipo fúngicas, las bacterianas, las víricas y las parasitarias. De las mencionadas, las más comunes

son las de tipo bacteriana, siendo muy riesgosas para la salud debido a su capacidad multirresistente frente a los antibióticos recetados. Debido a ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una lista dividida en tres categorías (crítica, elevada y media) de acuerdo con la peligrosidad y necesidad urgente de combatir la resistencia que han generado, como se puede observar en el cuadro 1.1.

Cuadro 1. 1 Criterio de prioridades para bacterias nosocomiales.

Categorías	Bacterias	Resistencia
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenémicos
Elevada	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina y meticilina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolonas y cefalosporina
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolonas

(Maguiña Vargas, C., 2016; OMS, 2019; OMS, 2020; OMS, 2021).

La resistencia a los tratamientos antibacterianos son una problemática creciente que se acelera por el uso incorrecto del antimicrobiano, falta de vigilancia sanitaria y escasa educación al respecto. Cuando una bacteria crea resistencia, esta puede darse por origen natural, por mutaciones en su material genético o por transferencia de genes. Existen muchos mecanismos de resistencia que las bacterias suelen emplear para evadir a los antibióticos, los cuales incluyen: bombas de eflujo, secuestro del agente antimicrobiano, enzimas inactivadoras, modificación del sitio objetivo del fármaco, formación de biofilm, entre otros (Bitrus *et al.*, 2018)

Las biopelículas bacterianas también llamadas biofilm, son uno de los principales problemas en la eliminación de bacterias nosocomiales. El biofilm es una matriz exopolimérica formado por polisacáridos y otros componentes de menor porcentaje. Esta red

de donde se hayan incrustadas las bacterias les permite adherirse con mayor facilidad a diversas superficies como: vidrios, poliuretanos, poliestireno, metales, entre otros. La estructura compacta del biofilm, provee un ambiente idóneo de protección a las bacterias, por lo que aquellas que tienden a su formación en un menor tiempo de incubación son más resistentes en comparación con las que tardan más tiempo en generar esta matriz. En el mismo sentido se puede decir que gran parte de la fortaleza bacteriana depende de las características propias de sus biopelículas (Zamora *et al.*, 2017).

Dos ejemplos de bacterias formadoras de biofilm son: *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en las cuales se puede apreciar diferencias macroscópicas para sus viscosidades y resistencias. Existen reportes que indican que cuando la biopelícula de *P. aeruginosa* madura es muy difícil de erradicar, de hecho, lo ideal sería prevenir dicha formación o atacarlo en un inicio de su formación. (Lu *et al.*, 2019; Seder *et al.*, 2021).

De acuerdo con lo antes mencionado, se puede concluir que las enfermedades nosocomiales producen un aumento en la morbilidad de pacientes que han ingresado en las instituciones hospitalarias; aunado a ello se incrementan los costos en la prolongación de la estancia del enfermo, la recuperación del paciente y los cuidados continuos. La prevalencia de las enfermedades nosocomiales ocurre sobre todo en pabellones quirúrgicos, ortopédicos, oncológicos y en las unidades de cuidados intensivos; los cuales se ven agravados cuando las bacterias presentan resistencia a los antibióticos recetados y cuando sus mecanismos de defensas, como el biofilm se encuentran en fases maduras y bien adheridas a superficies en contacto con el paciente.

1.2.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, es una bacteria patógena Gram-negativa que posee una alta capacidad biosintética, lo que le permite adaptarse a ecosistemas muy variados con un mínimo requerimiento de medio para su supervivencia, abarcando consorcios marinos, pantanosos y terrestres; también se han aislado de tejidos vegetales y animales. Pese a ello es considerada una bacteria del suelo, puesto que se puede aislar fácilmente de estos ambientes, en donde regulan la acumulación de materia orgánica, así como los compuestos xenobióticos que tanto impacto ambiental ocasionan. La formación de biofilm le confiere características resistentes frente a antibióticos y desinfectantes siendo un factor preocupante

para los pacientes diagnosticados con neumonía, fibrosis quística, complicaciones del tracto urinario y quemaduras (Stover *et al.*, 2000)

Este patógeno nosocomial, que mide entre 1.5 – 4.0 µm de largo y 0.5 – 1.0 µm de ancho, posee un genoma de 6.3 Mbp con unos 5,570 marcos de lectura abiertos dentro de los cuales están codificados sus genes de virulencia (Stover *et al.*, 2000; Callicó *et al.*, 2004).

1.2.6.1 Enfermedades causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno disperso y oportunista que afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos, provocando severas enfermedades como: meningitis, otitis maligna externa, endocarditis, osteomielitis, neumonía crónica, entre muchas otras. Las enfermedades que ocasiona sobre estos pacientes son tan variadas como lo son sus factores de virulencia, los cuales se pueden clasificar en 4 grandes grupos: los de tipo celular (Flagelos, Pili tipo IV, adhesinas no-pili, lipopolisacaridos-LPS), los de tipo extracelular (elastasa B y A, exotoxina A (ETA), fosfolipasa C, proteasa IV, lipasa, exoenzimas (S, T y Y), exotoxina U, alginato/exopolisacárido, piocianina, sideroforos, cianuro de hidrogeno y ramnolipidos), el sistema de secreción tipo III y el Quorum-Sensing (Mvz *et al.*, 2017).

Existen varias maneras de contacto que se pueden dar entre las bacterias y las células blanco, una de ellas pertenece a la clasificación de tipo celular, llamado Pili tipo IV. Este apéndice, esencial para su virulencia se acopla mecánicamente a su hospedador (por lo que no se debe confundir con los flagelos) para inyectar toxinas y material extraño. Persat *et al.* (2015), lo demuestran cuando induce a mutación el pili A, que es el principal elemento estructural regulado a su vez por PilB, PilT y PilU observando que el movimiento y la potencia de los flagelos no fueron afectados.

El pili tipo IV posee amplia distribución en diferentes especies de bacterias, es considerado un importante factor de virulencia pues este apéndice externo no solo sirve para adherirse a superficies, apoyo en la motilidad y participación en procesos conjugativos del ADN exógeno, sino que también se han reportado funciones receptoras para bacteriófagos y contribución en la formación de biopelículas (Persat *et al.* 2015; Sánchez-Cárcamo, 2017; Mvz *et al.*, 2017).

Otro mecanismo de infección de *P. aeruginosa* son sus proteínas flagelares FliD, FliC involucradas en la adherencia a las mucosas de las vías respiratorias, liberación de trampas celulares y secreción de péptidos antimicrobianos; también cuenta con lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de membrana como LecA y LecB, que le permiten tener un amplio repertorio de opciones virulentas. La facilidad que tiene para autoregularse y expresar el gen que codifica para la flagelina o para su fenotipo mucoide la hacen altamente peligrosa a nivel de la parénquima (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

Dentro de los factores de virulencia de tipo extracelular se encuentran las toxinas elastasa B y A que pertenecen al tipo II de secreción presentando una actividad elastolítica, la cual destruye las células de diversos órganos humanos; de igual manera la exotoxina A y la fosfolipasa C pertenecen a este tipo de secreción II produciendo toxicidad y hemólisis respectivamente. En el mismo sentido, *P. aeruginosa* es capaz de producir dos tipos de biopelículas: una de tipo plana con la cual se adhiere a superficies tisulares, generando la formación de microcolonias y otra en agregados formando una comunidad bacteriana entrelazados entre sí por interacciones físicas como la gravedad e interacciones químicas como los exopolisacáridos, pero sin estar adheridas a una superficie; estas matrices contienen lipopolisacáridos como Pel, Psl y alginato, además varias proteínas y ADN extracelular. Dado su complejidad estructural y de composición, el biofilm de esta bacteria es uno de los factores de virulencia más difícil de erradicar (Lu *et al.*, 2019; Seder *et al.*, 2021).

El sistema de secreción tipo III, como se observa en la figura 1.3, es un mecanismo que permite a *P. aeruginosa* introducir sus toxinas de tipo III en el citosol de las células eucarióticas. Estas toxinas son: ExoS, ExoT, ExoU y ExoZ, las cuales muestran una actividad de ADP-ribosiltransferasa, ADP-ribosiltransferasa y GTPasa, fosfolipasa A2 y adenilato ciclasa respectivamente; generando efectos en la célula huésped de anti-fagocitosis, bloqueo en la cicatrización de heridas, citotoxicidad y formación de edemas (Sawa *et al.*, 2014).

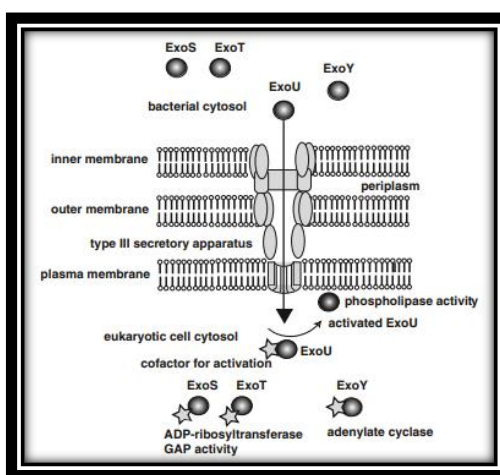


Figura 1. 3 Sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* (Sawa *et al.*, 2014)

Muchas bacterias Gram-negativas emplean un sistema de comunicación denominado Quorum-Sensing (QS) que les permite detectar la densidad crítica de población (quórum) en el huésped, cuando esto ocurre lideran la activación de genes que codifican diversos factores de virulencia y otros productos necesarios para la comunicación y el crecimiento de la colonia bacteriana. *P. aeruginosa* posee dos sistemas QS: LasR ± LasI y el RhlR ± RhlI, con las moléculas de señal afines N- (3-oxo-dodecanoil) -L-homoserina lactona (OdDHL) y N-butil-L-homoserina lactona (BHL) que desencadenan exotoxinas, sideróforos, exoproteasas, varios metabolitos secundarios y la formación de distintos tipos de biofilm según su necesidad (Hentzer *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado, la bacteria nosocomial *P. aeruginosa*, tiene un metabolismo complejo y abstracto de rutas alternas y señales que utiliza para infectar a su objetivo. Otros factores de virulencia importantes son los pigmentos que puede generar, uno de ellos es: la pioverdina, molécula compuesta de tres partes bien identificadas (un cromóforo de dihidroxiquinolina, una cadena de ácido dicarboxílico o amida y una cadena peptídica variable). Este sideróforo, es característico por proporcionar el color fluorescente a la cepa, adicional a ello juega un papel relevante en las infecciones, pues es parte de una señalización y recolección de Fe^{3+} (Sawa *et al.*, 2014; Mvz *et al.*, 2017; Paz-Zarza *et al.*, 2019).

1.2.6.2 Antibióticos utilizados en *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es considerada una bacteria multi-resistente, encontrándose cepas aisladas que contienen genes IMP-15, IMP-18 y VIM-2 codificantes para la producción de metalo- β -lactamasas, β -lactamasas de espectro extendido, con resistencia antibacteriana. También tienen la capacidad de adquirir plásmidos con genes de resistencia o mutaciones en genes cromosomales que le confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

Ya que los antibióticos utilizados para el tratamiento de *P. aeruginosa* no siempre resultan eficaces, se hace necesario encontrar otras alternativas y terapias viables que puedan favorecer la recuperación de pacientes que han adquirido esta bacteria nosocomial. Cabot *et al.* (2011), informa sobre la susceptibilidad y resistencia de *P. aeruginosa* frente a los principales antibióticos de uso común. En este estudio multicéntrico realizado en España, los ocho tratamientos recetados se enlistan en la figura 1.4, donde se pueden observar en orden decreciente el porcentaje de uso de cada antibiótico de acuerdo con la resistencia que fueron presentando las distintas cepas de *P. aeruginosa*.

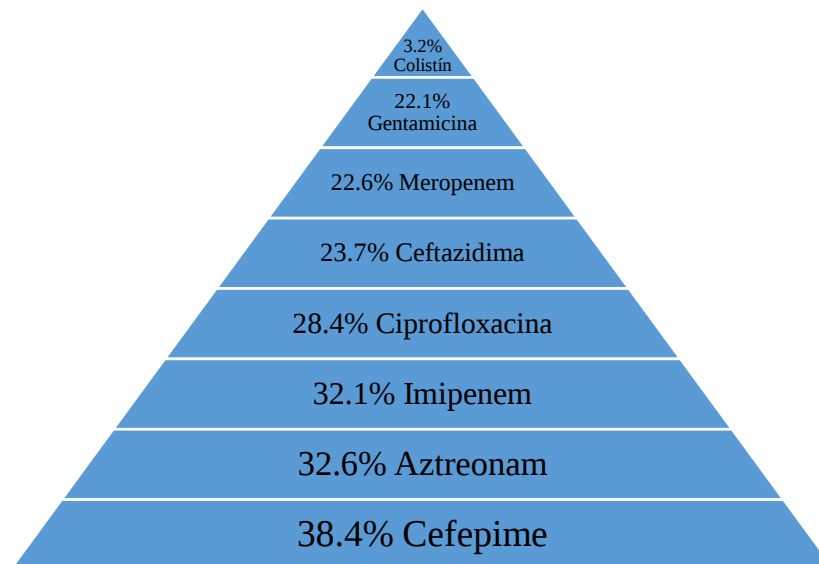


Figura 1. 4 Tratamientos farmacológicos para combatir a *P. aeruginosa* (Cabot *et al.*, 2011)

Algunas alternativas no convencionales propuestas para coadyuvar a los antibióticos más recetados son el uso de péptidos antimicrobianos, probióticos y bacteriocinas. Shokri *et al.* (2018) en sus trabajos con la actividad antibacteriana de un aislado de *Lactobacillus* de

yogurt mostró los efectos que este bacilo puede tener contra *P. aeruginosa* reportando halos de inhibición de 12–20 mm de diámetro (utilizando el método de difusión de disco), además de observar una reducción considerable en las biopelículas generadas por este patógeno.

El ser humano está en una latente carrera para combatir a las bacterias nosocomiales, en la cual nos encontramos en desventaja, puesto que la tasa promedio de multiplicación bacteriana es de 20 minutos, por lo que una generación a otra puede crear mecanismos de resistencia en cortos periodos. Sin embargo, la inteligencia humana al usar los productos que la naturaleza ofrece podría esclarecer nuevas terapias que ayuden a mantener al margen a estas bacterias patógenas.

Es importante mencionar, que los antibióticos en sinergia con la medicina natural cada vez son más aceptados en el ámbito científico. Estudios como estos pueden ayudar a comprender como las proteínas, enzimas y péptidos bioactivos de origen natural como los presentes en el polen de la abeja sin aguijón de *M. beecheii* podrían ser una alternativa viable para reducir los índices de mortandad ocasionados por las cepas resistentes como aquellas provenientes de bacterias nosocomiales.

1.2.7 Formación y Mecanismos del biofilm

Biofilm es una comunidad bacteriana, que está conformada comúnmente de diferentes especies bacterianas, pero también se pueden encontrar biofilm de una sola especie de bacterias. El biofilm genera cúmulos de bacterias vivas, que a su vez, estas se adhieren a una superficie y se encuentran rodeados de una matriz acuosa polimérica extracelular (EPS), compuesto principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos cuya composición varía entre cepas y sus condiciones externas (Gebreyohannes *et al.* 2019). Se ha reportado que las cepas patógenas de *P. aeruginosa* aumentan su virulencia cuando forman biofilm en comparación con su forma de estado libre o aislada conocido como planctónico, siendo este una forma de infección hacia el huésped y que además facilita la producción de factores de virulencia como la producción de toxinas. (Oloketuyi y Khan, 2017). Para que se lleve el inicio y formación del biofilm involucra varios mecanismos de adhesión que son factores de virulencias específicos como adhesinas, flagelos, fimbrias tipo I, fibras curli y la isla de patogenicidad (LEE). Los cuales ejercen funciones diferentes por ejemplo: los flagelos permiten la movilidad bacteriana y poseen la capacidad para superar las

fuerzas electrostáticas repulsivas que existen en las superficies bióticas y abióticas; las fibras curli, son fibras finas y enrolladas en diferentes tamaños que se desenrollan en forma de matriz en la colonización y formación del biofilm, regulados por Rpos (ARN polimerasa, sigma-S); las adhesinas (intimina) y las largas fimbrias polares (Lpf) juegan un papel importante en la colonización de las células epiteliales, este último tiene dos operones cromosómicos que contribuyen a la adhesión *in vitro* y colonización *in vivo*; LEE involucrado en formación de lesiones A/E (adhesión/borrado) compuesto de operones (LEE1 a LEE5), sistema de secreción tipo III (TTSS) y 41 marcos de lectura abiertas que codifican intimina y su receptor de translocación (Tir), que ayudan a la adhesión de en las células epiteliales (Oloketuyi y Khan, 2017).

La formación completa de biofilm se lleva a cabo en 4 pasos (Figura 1.5). A continuación se detalla cada paso: paso 1, las células planctónicas se unen a una superficie; Paso 2, las células comienzan a duplicarse, adhiriéndose irreversiblemente a la superficie para formar microcolonias; paso3, las células crecen y maduran y se multiplican en grupos de multicapa, y comienzan a sintetizar EPS, formando la matriz del biofilm; y paso 4, algunas de las bacterias dentro del biofilm se desprenden, dispersándose en células planctónicas para formar biofilm en otros entornos y el ciclo comienza de nuevo (Alav *et al.* 2018).

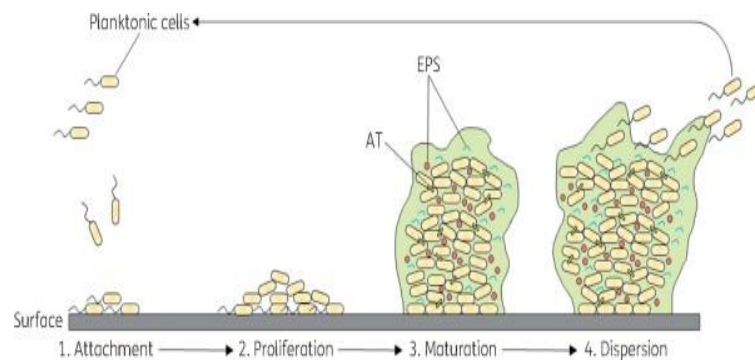


Figura 1. 5 Diagrama de la formación de biofilm en cuatro etapas. Los autotransportadores (AT) son un grupo diverso de proteínas que son importantes en la virulencia; las propiedades funcionales incluyen adhesión, autoagregación, colonización, actividad en enterotoxina y proteólisis. Las EPS incluyen lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas. Tomado de Alav *et al.* (2018).

La formación y mantenimiento del biofilm están regulados por el *Quorum Sensing* (QS), que es una comunicación intracelular bacteriana, donde las bacterias sintetizan autoinductores, Als (S-adenosilmetionina), que son moléculas de señalización extracelular, las cuales reconocen otras bacterias y responden a su vez con las mismas moléculas para

mediar la comunicación intercelular, aunque hay algunas bacterias que solo son receptoras de AIs. El QS juega un papel importante en la inducción y represión de la expresión genética, porque puede controlar y coordinar globalmente los comportamientos celulares como la bioluminiscencia, la secreción de factores virulentos, el desarrollo de biofilm y la supervivencia a los agentes antimicrobianos (Cáceres *et al.* 2020).

Todos los sistemas QS dependen de tres principios básicos: síntesis de AIs, detección de AIs por receptores y activación de genes específicos de quórum por factores de transcripción. En bacterias gram-negativas como *E. coli* comúnmente utilizan lettonas acyl-homoserina (AHLs) u otras moléculas derivadas de AIs. Los AHLs consisten en un anillo de homoserina-lactona acetilada N y una cadena de acil de carbono que puede variar en longitud y contener varias modificaciones. Una vez sintetizados los AHLs dentro de la bacteria, salen al exterior para entrar con bacterias cercanas donde unirán a sus receptores tipo-LuxR, que son factores de transcripción citoplasmático, volviéndose estable, dimeriza y se une al ADN para impulsar la transcripción de genes específicos del *Quórum* (Figura 1.6) (Alav *et al.* 2018).

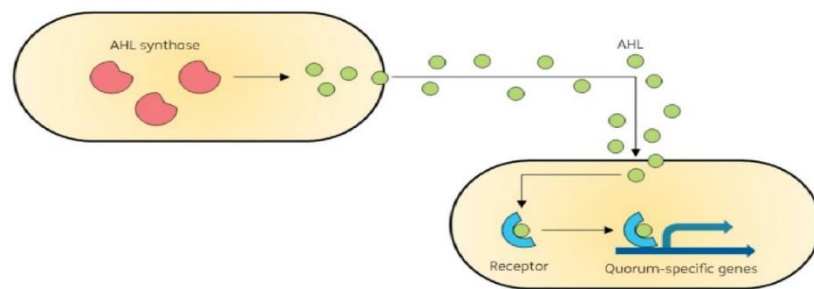


Figura 1. 6 Sistemas generales de QS bacterianos en bacterias Gram-negativas. Uno de los ejemplos más comunes de QS implica la síntesis de AHL por síntesis de AHL. Los AHL son detectados por receptores intracelulares que funcionan como factores de transcripción para impulsar la transcripción de genes específicos del quórum. Tomado y modificado de Alav *et al.* (2018).

Como podemos darnos cuenta la formación de biofilm, es el mecanismo donde se inicia la colonización e infección, que además involucra diversos factores de virulencia, en el que destaca la producción de toxina Shiga y ciertas proteínas involucradas en la adherencia, y que también el biofilm le genera una resistencia aun mayor hacia los antibióticos. Por lo que es necesario buscar nuevos agentes antimicrobianos que inhiban la formación de biofilm, que no generen resistencia hacia ellos, que reduzcan o inhiban los principales factores de virulencia y que además no sean tóxicos para los humanos, ya que esta la fecha

la formación de biofilm se ha vuelto realmente difícil de tratarlas con eficacia, además, los antibióticos de uso clínico son ineficaces para tratar infecciones relacionadas con biofilm, debido a sus altas concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y su mínima concentración bactericida (MBC), que pueden resultar ser tóxicos *in vivo* (Roy *et al.* 2018).

1.2.16 Compuestos con actividad antibiofilm

Recientemente se ha reportado que ciertos compuestos con actividad antimicrobiana pueden reducir e inhibir la formación del biofilm de cepas patógenas. Entre los estudios realizados se encuentran los de Lee *et al.* (2020) donde reportaron que la bioconversión del suero de la leche por bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus plantarum*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus brevis* y *Enterococcus faecium* redujo significativamente la formación de biofilm de *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en las primeras etapas de desarrollo, además también redujo el biofilm preformado; Ivanova *et al.* (2022), reportaron que compuestos como gentamicina inhibe la formación del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, provocando una disrupción en la membrana celular de dichas bacterias; Cáceres *et al.* (2020) reportaron actividades antimicrobianas y antibiofilm de diecisiete aceites esenciales en bacterias gram negativas y gram positivas como *E. coli* O33, *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Dos aceites provenientes de la especie *Lippia origanoides* que contenían timol-carvacrol-quimiotipo (I y II), mostraron actividad antimicrobiana y anti-biofilm contra todas las bacterias analizadas. El aceite I redujo la formación de biofilm de 75, 73 y 74%, respectivamente, usando diferentes concentraciones subletales de MIC₅₀ (concentración mínima inhibitoria para inhibir el 50% de la población bacteriana). El aceite II también mostró resultados similares. Los resultados de inhibición de biofilm concordaron con lo visualizado por microscopio electrónico de barrido (SEM), se observó una alteración de la integridad celular y estructural del biofilm. Aunque los resultados fueron positivos con tratamiento de aceites I y II, en la pruebas de viabilidad celular el aceite I mostró toxicidad hacia la células Vero (células de riñón de mono verde africano); Ortega-Ramirez *et al.* (2020) informaron que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y dos terpenos citral y geraniol, (ambos se encuentran en el mismo aceite mencionado), a concentraciones 0.5 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.25 mg/mL, respectivamente, pueden inhibir la formación del biofilm de *E. coli*

O157:H7 (ATCC 43890) en placas de acero inoxidable, siendo el geraniol que inhibió completamente. También el contenido de glucano en los tres tratamientos se redujo significativamente y la actividad de glucosiltransferasa (enzima relacionada a la síntesis y secreción de glucano) fue inhibida con los dos terpenos, según la cinética enzimática calculada, siguiendo el Modelo cinético de Michaelis-Menten. Por lo que la inhibición de la enzima se relacionó con la actividad antibiofilm; Hu *et al.* (2019) evaluaron la formación de biofilm con extractos de plantas de la familia *Brassicaceae* (rábano, rábano joven, brote de rábano, col roja y col rizada), usando un ensayo en placas teñido con violeta cristal y un ensayo de reducción de resazurina. Los extractos de plantas usados después de la etapa de adhesión, presentó actividad antibiofilm con 4 mg/mL en extractos de rábano y col rizada con 31.3% y 13.8 % de bacterias restantes respectivamente. La viabilidad de las células se redujo positivamente a 11,4%, 37,7%, 14,4%, 5,83% y 51,5 % en extractos de rábano, rábano joven, brote de rábano, col roja y col rizada, respectivamente. Por otro lado, utilizando 4 mg/mL pero con el biofilm preformado, ninguno de los extractos pudo eliminar la bacteria y la viabilidad aumentó; Prateeksha *et al.* (2019) desarrollaron nano emulsiones estables (NE) con compuestos bioactivos de eugenol (E-NE) y salicilato de metilo (MS-NE) de aceites esenciales a partir de las hojas de la especie *Gaultheria fragrantissima*. E-NE y MS-NE pudieron inhibir la formación de biofilm de *E. coli* O157:H7 en un 80% a concentraciones subletales, la prueba se realizó mediante el ensayo de placas teñidas con cristal violeta. Al realizar otras pruebas recubriendo las NE con hidrogel se obtuvieron mejores resultados de actividad anti-biofilm y se evaluaron en superficies solidadas (vidrio, plástico y carne). También E-NE y MS-NE redujeron la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de LPS (waaL, waaP, waaD y waaJ), fimbrias de adhesión (fimA y fimH), fimbrias de movilidad (flhD, fliA y motB), regulador transcripcional LEE (ler), ler y ler-toxina regulada (espD, escJ, escR y tir), genes de detección de quórum (luxS, luxR y tnaA) y toxina Shiga (stx1y stx2), que se vio relacionado en su expresión fenotípica porque disminuyó la producción LPS y la formación de fimbrias, afectando su motilidad y agrupación; Fu *et al.* (2017) reportaron biofilm formados por *E. coli* O157: H7 en cáscaras de melón a 2, 12 y 24 horas con tratamientos: 200, 400, 800, 1600, y 2000 µg/mL de etil lauroil arginato; y 200 y 2000 µg/mL de hipoclorito de sodio. Todos fueron visualizados por microscopía electrónica de barrido criogénico (Cryo-SEM). El estudio reveló una baja eficacia del etil lauroil arginato e hipoclorito de sodio en la superficie de la cáscara del melón para reducir el biofilm; Gkana *et al.* (2017) evaluaron la formación de biofilm en dos diferentes superficies (vidrio y acero

inoxidable) recubiertos con productos comerciales a base de organosilano. Los resultados indicaron que las superficies de vidrio recubiertas con productos a base de organosilanos sí afectaba negativamente la adherencia, lo que afectaba la formación de biofilm de *E. coli* O157:H7, pero no fue efectivo en superficies de acero inoxidable, mientras que en otras cepas diferentes a *E. coli* indujo la adhesión; y estudios como Lee *et al.* (2013) reportaron que el extracto de *Carex dimorpholepis* a 0.1 mg/mL redujo la formación de biofilm de *E. coli* O157:H7 mayor al 90 %, en una dosis dependiente durante 24 y 48 h, además en los análisis transcripcionales se mostró que el extracto reprimió los genes curli (csgA y csgB), varios genes de motilidad (fimA, fimH, flhD, fliA, motB, qseB, y qseC) y genes de *Quorum Sensing*, AI-2 (lsrA, luxS, and luxR), concordando con el fenotipo observado en reducción de fibras curli, su motilidad y biofilm. También mostraron que en presencia del trans-resveratrol a una baja concentración, 10 µg/mL redujo significativamente la formación de biofilm del patógeno. Aunque ambos tratamientos evaluados pudieron reducir el biofilm patógeno, no redujo la formación de biofilm de cuatro cepas comensales de *E. coli*.

Como se ha visto existen una gran variedad de compuestos naturales y algunos compuestos químicos con actividad anti-biofilm, que afectan solo uno o varios mecanismos de virulencia, afectando su genotipo o fenotipo del patógeno. Varios de ellos resultan ser ineficientes por su baja actividad, otros que parecen ser prometedores, resultan ser tóxicos por sus altas concentraciones mínimas inhibitorias. Por lo que generar compuestos bioactivos de origen natural que provengan de alimentos que se hayan usado por sus atributos medicinales, podría ser la mejor alternativa para combatir cepas patógenas y su aplicación en los tratamientos serían más prometedores. El uso de la miel para inhibir el biofilm de cepas patógenas virulentas son una nueva y mejor alternativa. Uno, por son consumida en varias partes del mundo y son muy valorada por los consumidores por su atributo nutrimental; dos, por su uso con fines terapéuticos como medicina alternativa; y tres, porque varios estudios han reportado que la miel posee una gran capacidad compuestos para combatir la virulencia de patógenos bacterianos además de hacer cambios en la estructura celular y el metabolismo de los patógenos (Meo *et al.* 2017; Ahmed y Salih, 2019).

1.2.10 La miel como agente antibiofilm

La presencia de diversidad de compuestos en la miel ha llevado a los investigadores a estudiarla y proporcionar una mejor comprensión de la actividad biológica que presenta, diversos estudios han reportado que la miel posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (Cianciosi *et al.* 2018). También se ha reportado que la miel presenta actividad anti-biofilm contra diversas cepas patógenas incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa*. Algunos estudios, donde han reportado esta actividad antibiofilm son los siguientes: Kim y Kang (2020) reportaron que la miel de manuka (miel monofloral) producidas por las abejas (*Apis mellifera*) a 0.1 y 0.2 g/mL redujo significativamente el biofilm de *E. coli* O157: H7 en los tratamientos previo a la formación y posterior a la maduración del biofilm; Lee *et al.* (2011) reportaron tres mieles: dos mieles monoflorales la de acacia y de trébol, y una miel polifloral, todas producidas por abejas *Apis mellifera*, a concentraciones de 0.5% (v/v), redujeron más del 90 % la formación de biofilm en *E. coli* O157: H7, además todas las mieles disminuyeron la colonización en las células epiteliales humanas HT-29, pero no inhibieron la formación de biofilm de *E. coli* K-12 comensales. Por otro lado, a concentraciones del 15 % (v/v) de las mieles redujeron completamente el crecimiento de *E. coli* O157: H7. También, estos autores realizaron análisis moleculares e indicaron que solo la miel de acacia a bajas concentraciones reprimieron significativamente los genes curli (csgBAC), los genes de detección de quórum (AI-2 y biosíntesis de indol) y los genes de virulencia (genes LEE), siendo la miel de monofloral de acacia la más efectiva en comparación con las mieles polifloral y de trébol; Ahmed y Salih (2019) informaron una disminución de la formación de biofilm de *P. aeruginosa* tratadas con miel proveniente de las montañas de Kurdistán, Irak a 1 % (v/v), mientras que al 3 % (v/v) inhibió completamente el crecimiento bacteriano e indicaron una reducción notable en la expresión de los genes de quórum y ETA; Sojka *et al.* (2016) reportaron que mieles de manuka y melaza, y defensina-1 (péptido derivado de las abejas) son capaces de reducir significativamente la viabilidad celular de patógenos de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa* en biofilm maduros, pero ineficaz contra *Enterococcus faecalis*, ya que fue altamente resistente a las mieles y a la defensina-1.

Aunque varios estudios brindan evidencia sobre la efectividad de la miel contra cepas patógenas, aún es necesario profundizar en la actividad antibiofilm de las mieles producidas por abejas sin aguijón. La mayoría de las investigaciones se han centrado en las propiedades

biológicas de la miel de la abeja con aguijón (*Apis mellifera*), como se mencionó anteriormente, y son pocos los estudios que reportan la actividad antibiofilm de las mieles de abejas sin aguijón. Esto resalta la importancia de estudiar estas mieles y evaluar su efectividad contra biofilm de cepas patógenas, como los formados por *P. aeruginosa*. Además, en México en los pueblos indígenas creen que las mieles de las abejas sin aguijón presentan propiedades medicinales más potentes que las mieles producidas por las abejas europeas (*Apis mellifera*) (Jimenez *et al.* 2016). Recientemente con los avances tecnológicos se pueden confirmar este conocimiento empírico, ya que efectivamente existen reportes positivos, donde indican que la mieles de abeja sin aguijón han mostrado tener propiedades terapéuticas exclusivas y además, las actividades antimicrobiana y antioxidante de estas mieles resultan más efectivas en comparación con las mieles tradicionales (Zulkhairi Amin *et al.* 2018; Ávila *et al.* 2019). Tal es el caso como lo que reporta Zamora *et al.* (2017) donde informan que las mieles de las especies *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* inhibieron la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus* al 100 %, además, estas mieles mostraron eliminar biofilm maduros 94 y 29 % respectivamente, utilizando concentraciones inhibitorias del 50 % (IC₅₀). Por otro lado, la miel de abeja (*Apis mellifera*), no presentó actividad antibiofilm contra este patógeno. Estos autores también reportaron que dicha actividad es propia de la abeja, ya que aislaron dos proteínas de la miel de *Tetragonisca angustula* (50 y 75 kDa) que presentaron actividad anti-biofilm, pero no presentaron actividad antimicrobiana; por otro lado Morroni *et al.* (2018), evaluó la actividad antimicrobiana y antibiofilm de tres mieles de abeja de *A. mellifera* de diferentes países (Nueva Zelanda, Cuba y Kenya) y una miel de abeja *Melipona beecheii* contra cepas de aislados clínicos. Los autores reportaron que la miel con mayor actividad antimicrobiana y antibiofilm fue la de *M. beecheii*.

Sin embargo, aunque existen pocos reportes de la miel de *M. beecheii* como agente antibiofilm, aún se desconoce si las proteínas antimicrobianas presentes en la miel poseen actividad antibiofilm, además tampoco se conoce el mecanismo de acción antimicrobiano completo de estas proteínas y mucho menos si estas afectan el transcriptoma relacionado la formación de biofilm. Para poder dilucidar el mecanismo de acción de las proteínas o péptidos con potencial antimicrobiano se requiere de estudios en el cual nos brinde información de las proteínas presentes en la muestra de estudio, como es el caso del análisis del proteoma. Ya que esta técnica, nos indica en su totalidad la cantidad de proteína traducida

de un organismo en un evento determinado. Por ello su análisis es importante para entender lo que ocurre en un sistema biológico (Gracia y Husi, 2019). También se pueden utilizar herramientas sofisticadas como la secuenciación de nueva generación como RNA-sequencing (RNA-Seq), donde se analizan los cambios en el transcriptoma del patógeno en presencia de estas proteínas bioactivas y dilucidar las vías metabólicas afectadas por los genes expresados diferencialmente. Además, con estos estudios se desarrollan las bases moleculares para entender el mecanismo de síntesis y disrupción del biofilm empleando las proteínas de la miel de la abeja (*Melipona beecheii*).

1.3 Hipótesis

Las proteínas con actividad antibacteriana presentes en la miel de la abeja (*Melipona beecheii*) inhiben la formación del biofilm de *P. aeruginosa* ATCC 2795, afectando la síntesis de la matriz del exopolisacarido y el *Quorum Sensing*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las proteínas de la miel de la abeja (*M. beecheii*) en el proceso de formación del biofilm *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1.4.2 Objetivos específicos

- ◆ Obtener proteínas con actividad antibiofilm provenientes de la miel de *abeja* (*M. beecheii*)
- ◆ Evaluar el efecto antibiofilm de las proteínas antibacterianas de la miel contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- ◆ Evaluar el efecto proteómico del biofilm de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en presencia de las proteínas antibiofilm de la miel de *abeja* (*M. beecheii*) por electroforesis bidimensional.

1.5 Procedimiento experimental

El estudio fue biodirigido, ya que a partir de la actividad antibiofilm de las proteínas de la miel de abeja (*M. beecheii*) del estado de Yucatán contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, se seleccionaron las proteínas con dicha actividad para conocer su mecanismo de acción. Se visualizó la inhibición del biofilm en presencia de las proteínas seleccionadas mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), se evaluó el efecto de las proteínas seleccionadas en el proteoma de la formación del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con el fin de elucidar los mecanismos de acción de estas moléculas de la miel origen proteico (Figura 1.7).

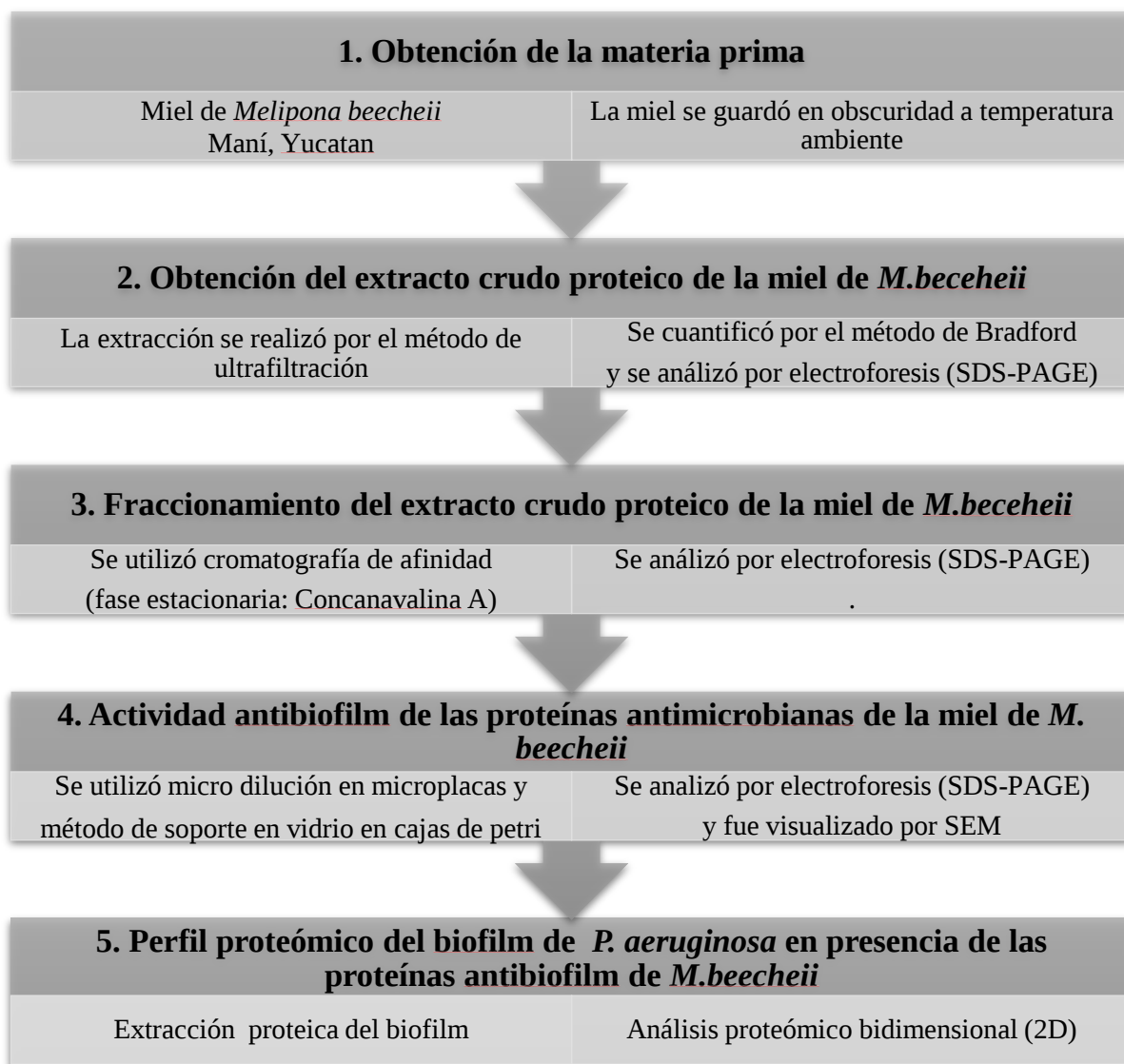


Figura 1. 7 Estrategia experimental.

1.6 Literatura citada

- Ahmed, A. A., and F. A. Salih. 2019. Low concentrations of local honey modulate ETA expression, and quorum sensing related virulence in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from infected burn wounds. *Iran J. Basic Med. Sci.* 22:568–575.
- Alav, I., J. M. Sutton, and K. M. Rahman. 2018. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* 73:2003–2020.
- Alvarez-Suarez, J. M., F. Giampieri, A. Brenciani, L. Mazzoni, M. Gasparrini, A. M. González-Paramás, C. Santos-Buelga, G. Morroni, S. Simoni, T. Y. Forbes-Hernández, S. Afrin, E. Giovanetti, and M. Battino. 2018. *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 87:272–279.
- Alves, R., A. T. L. Queiroz, M. G. Pessoa, E. F. da Silva, D. F. C. Mazo, F. J. Carrilho, R. J. Carvalho-Filho, and I. M. V. G. de Carvalho. 2013. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *J. Viral Hep.* 20:414–421.
- Arnold, N., R. Zepeda, M. Vásquez, and M. Aldasoro. 2018a. Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca , México con catálogo de especies.
- Ávila, S., M. R. Beux, R. H. Ribani, and R. C. Zambiasi. 2018. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends Food Sci. Technol.* 81:37–50.
- Ávila, S., M. Lazzarotto, P. S. Hornung, G. L. Teixeira, V. C. Ito, M. B. Bellettini, M. R. Beux, T. Beta, and R. H. Ribani. 2019. Influence of stingless bee genus (*Scaptotrigona* and *Melipona*) on the mineral content, physicochemical and microbiological properties of honey. *J. Food Sci. Technol.* 56:4742–4748.
- Bocian, A., J. Buczkowicz, M. Jaromin, K. K. Hus, and J. Legáth. 2019. An effective method of isolating honey proteins. *Molecules* 24:1–10.
- Boorn, K. L., Y. Y. Khor, E. Sweetman, F. Tan, T. A. Heard, and K. A. Hammer. 2010. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *J. Appl.*

Microbiol. 108:1534–1543.

- Brudzynski, K., and D. Miotto. 2011. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chem.* 127:1023–1030.
- Cáceres, M., W. Hidalgo, E. Stashenko, R. Torres, and C. Ortiz. 2020. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics* 9:147.
- Chan-Rodríguez, D., J. Ramón-Sierra, J. Lope-Ayora, E. Sauri-Duch, L. Cuevas-Glory, and E. Ortiz-Vázquez. 2012. Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against foodborn microorganisms. *Food Sci. Biotechnol.* 21:905–909.
- Chua, L. S., J. Y. Lee, and G. F. Chan. 2014. Characterization of the Proteins in Honey. *Anal. Lett.* 48:697–709.
- Cianciosi, D., T. Y. Forbes-Hernández, S. Afrin, M. Gasparri, P. Reboredo-Rodríguez, P. P. Manna, J. Zhang, L. B. Lamas, S. M. Flórez, P. A. Toyos, J. L. Quiles, F. Giampieri, and M. Battino. 2018. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* 23:1–20.
- Cortopassi-Laurino, M. V. L. I.-F., D. W. Roubik, A. Dollin, T. Heard, I. Aguilar, Venturieri, G. C., C. Eardley, and P. Nogueira-Neto. 2006. Global meliponiculture : challenges and opportunities. *Apidologie* 37:275–292.
- Fu, Y., A. J. Deering, A. K. Bhunia, and Y. Yao. 2017. Biofilm of *Escherichia coli* O157:H7 on cantaloupe surface is resistant to lauroyl arginate ethyl and sodium hypochlorite. *Int. J. Food Microbiol.* 260:11–16.
- Gebreyohannes, G., A. Nyerere, C. Bii, and D. B. Sbbatu. 2019. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 5:e02192.
- Gkana, E. N., A. I. Doulgeraki, N. G. Chorianopoulos, and G. J. E. Nychas. 2017. Anti-adhesion and anti-biofilm potential of organosilane nanoparticles against foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 8:1–9.

- Gracia, K. C., and H. Husi. 2019. Computational Approaches in Proteomics. Page in H. Husi, editor. Brisbane (AU).
- Guzman, M., C. Balboa, R. Vandame, M. L. Albores, y J. Gonzales-Acereto. 2011. Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México: *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*. [San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México] : El Colegio de la Frontera Sur, 2011. Primera ed. pp.19-30.
- Hau-Yama, N. E., D. Magaña-Ortiz, A. I. Oliva, and E. Ortiz-Vázquez. 2020. Antifungal activity of honey from stingless bee *Melipona beecheii* against *Candida albicans*. J. Apic. Res. 59:12–18.
- Hrnčir, M., C. Maia-Silva, V. H. da Silva Teixeira-Souza, and V. L. Imperatriz-Fonseca. 2019. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol. 205:415–426.
- Hu, W. S., D. M. Nam, J. Y. Choi, J. S. Kim, and O. K. Koo. 2019. Anti-attachment, anti-biofilm, and antioxidant properties of Brassicaceae extracts on *Escherichia coli* O157:H7. Food sci. biotechnol. 28:1881–1890.
- Ivanova, K., Ivanova, A., Hoyo, J., Pérez-Rafael, S., & Tzanov, T. (2022). Nano-formulation endows quorum quenching enzyme-antibiotic hybrids with improved antibacterial and antibiofilm activities against *Pseudomonas aeruginosa*. International journal of molecular sciences, 23(14), 7632.
- Israili, Z. H. 2014. Antimicrobial properties of honey. Am. J. Ther. 21:304–323.
- Jimenez, M., C. I. Beristain, E. Azuara, M. R. Mendoza, and L. A. Pascual. 2016. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. J. Apic. Res. 55:151–160.
- Kim, S.-Y., and S.-S. Kang. 2020. Anti-Biofilm Activities of Manuka Honey against *Escherichia coli* O157:H7. Food Sci. Anim. Resour. 40:668–674.
- Kuropatnicki, A. K., M. Klósek, and M. Kucharzewski. 2018. Honey as medicine: historical perspectives. J. Apic. Res. 57:113–118.
- Kwakman, P. H. S., and S. A. J. Zaat. 2012, January. Antibacterial components of honey. IUBMB Life. 64(1): 48–55

- Lee, J. H., H. S. Cho, S. W. Joo, S. Chandra Regmi, J. A. Kim, C. M. Ryu, S. Y. Ryu, M. H. Cho, and J. Lee. 2013. Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling* 29:1189–1203.
- Lee, J. H., S. C. Regmi, J. A. Kim, M. H. Cho, H. Yun, C. S. Lee, and J. Lee. 2011. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infect. Immun.* 79:4819–4827.
- Lee, J., M. Kim, D. Kim, C. Yu, B. S. Kim, J. S. Lee, and S.-S. Kang. 2020. Anti-biofilm Effect of Bioconversion of Whey by Lactic Acid Bacteria against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics* 6:25–31.
- Leonhardt, S. D. 2017. Chemical Ecology of Stingless Bees. *J. Chem. Ecol.* 43:385–402.
- Lichtenberg-Kraag, B. 2014. Evidence for correlation between invertase activity and sucrose content during the ripening process of honey. *J. Apic. Res.* 53:364–373.
- Meo, S. A., S. A. Al-Asiri, A. L. Mahesar, and M. J. Ansari. 2017, July 1. Role of honey in modern medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* 24(5): 975–978.
- Moo-Huchin, V. M., G. A. Gonzalez-Aguilar, J. D. Lira-Maas, E. Perez-Pacheco, R. Estrada-Leon, M. I. Moo-Huchin, and E. Sauri-Duch. 2015. Physicochemical Properties of *Melipona beecheii* Honey of the Yucatan Peninsula. *J. Food Res.* 4:25.
- Morroni, G., J. M. Alvarez-Suarez, A. Brenciani, S. Simoni, S. Fioriti, A. Pugnali, F. Giampieri, L. Mazzoni, M. Gasparrini, E. Marini, M. Mingoia, M. Battino, and E. Giovanetti. 2018. Comparison of the Antimicrobial Activities of Four Honeys From Three Countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). *Front. Microbiol.* 9:1378.
- Nagai, T., R. Inoue, N. Suzuki, Y. Tanoue, and N. Kai. 2012. Characterization of α -amylase from mandarin orange honey. *J. Apic. Res.* 51:3–9.
- Nordin, A., N. Q. A. V. Sainik, S. R. Chowdhury, A. Bin Saim, and R. B. H. Idrus. 2018. Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. *J. Food Compos. Anal.* 73:91–102.
- Oloketuyi, S. F., and F. Khan. 2017. Strategies for Biofilm Inhibition and Virulence Attenuation of Foodborne Pathogen-*Escherichia coli* O157:H7. *Curr. Microbiol.* 74:1477–1489.

- Ortega-Ramirez, L. A., M. M. Gutiérrez-Pacheco, I. Vargas-Arispuro, G. A. González-Aguilar, M. A. Martínez-Téllez, and J. Fernando Ayala-Zavala. 2020. Inhibition of glucosyltransferase activity and glucan production as an antibiofilm mechanism of lemongrass essential oil against *Escherichia coli* O157:H7. *Antibiotics*. 9.
- Ortiz-Vázquez, E., L. Cuevas-Glory, G. Zapata-Baas, J. Martínez Guevara, and J. Ramón-Sierra. 2013. Which bee honey components contribute to its antimicrobial activity? A review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7:5758–5765.
- Paris, E. H., V. B. Castrejon, D. S. Walker, and C. P. Lope. 2020. The Origins of Maya Stingless Beekeeping. *J. Ethnobiol.* 40:386–405.
- Prateeksha, S. K. Barik, and B. N. Singh. 2019. Nanoemulsion-loaded hydrogel coatings for inhibition of bacterial virulence and biofilm formation on solid surfaces. *Sci. Rep.* 9: 6520 (2019).
- Quezada-Euán, J. J. G. 2005. Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini). Mérida, Yucatán, México : Universidad Autónoma de Yucatán. Dirección General de Desarrollo Académico. Coordinación General de Extensión. Departamento Editorial, Ed. Mérida, Yucatán, México. pp19-20.
- Quezada-Euán J.J.G. 2018. Services Provided by Stingless Bees. In: *Stingless Bees of Mexico*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77785-6_7
- Ramón-Sierra, J. M., J. C. Ruiz-Ruiz, and E. De La Luz Ortiz-Vázquez. 2015. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. *Food Chem.* 183:43–48.
- Ramón-Sierra, J., J. L. Martínez-Guevara, L. Pool-Yam, D. Magaña-Ortiz, A. Yam-Puc, and E. Ortiz-Vázquez. 2020a. Effects of phenolic and protein extracts from *Melipona beecheii* honey on pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology* 29:1013–1021.
- Ramón-Sierra, J., M. A. Villanueva, M. Rodríguez-Mendiola, D. Reséndez-Pérez, , E. Ortiz-Vázquez, and C. Arias-Castro. 2020b. Characterization of a non-glycosylated fraction from honey proteins of *Melipona beecheii* with antimicrobial activity against *E.coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.*

- Ramón-Sierra J.M., Villanueva M.A., Yam-Puc A., Rodríguez-Mendiola M., Arias-Castro C., Ortiz-Vázquez E. 2022. Antimicrobial and antioxidant activity of proteins isolated from *Melipona beecheii* honey. Food Chem: X 13: 100177
- Rosales, G. R. O. 2013. Medicinal Uses of *Melipona beecheii* Honey, by the Ancient Maya. Vit P., Pedro S., Roubik D. (eds). Pot-Honey: a legacy of stingless bees. Springer New York, NY. pp. 229–240.
- Roy, R., M. Tiwari, G. Donelli, and V. Tiwari. 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. Virulence 9:522–554.
- Sojka, M., I. Valachova, M. Bucekova, and J. Majtan. 2016. Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. J. Med. Microbiol. 5:337–344.
- WHO (World Health Organization). 2018, February 7. *E. coli* OMS 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
- Zamora, L. G., C. J. Beukelman, A. J. J. Van Den Berg, P. C. Aerts, H. C. Q. Van Ufford, R. Nijland, and M. L. Arias. 2017. An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. J. Wound Care. 26:168–177.
- Zulkhairi Amin, F. A., S. Sabri, S. M. Mohammad, M. Ismail, K. W. Chan, N. Ismail, M. E. Norhaizan, and N. Zawawi. 2018. Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey. Adv. Pharmacol. Sci. (Article ID 6179596): 1-12.

II. CAPÍTULO 2. EFFECT OF conA-UNBOUND PROTEINS FROM *Melipona beecheii* HONEY ON THE FORMATION OF *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 BIOFILM

Luis Pool-Yam, Jesús Ramón-Sierra, A.I. Oliva, Roberto Zamora-Bustillos*,

Elizabeth Ortiz-Vázquez*

(Artículo publicado en: Archives of Microbiology; <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03783-7>)

*Corresponding author e-mail: elizabeth.ov@merida.tecnm.mx, roberto.zb@conkal.tecnm.mx

2.1 Resumen /Abstract

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria oportunista que puede formar biofilm con la capacidad de colonizar diferentes superficies y aumentar su resistencia a los antibióticos. Una alternativa para solucionar este problema puede ser el uso de proteínas no glucosiladas de la miel de *Melipona beecheii*, capaces de inhibir el crecimiento de este patógeno. En este trabajo se evaluó la actividad antibiofilm de la fracción proteica no unida a conA (F1) de *M. beecheii*. El extracto proteico crudo (ECP) y la fracción F1 inhibieron el crecimiento del biofilm de *P. aeruginosa* por encima del 80% a 4 y 1.3 µg/mL, respectivamente. Estas proteínas afectaron la estructura del biofilm, así como la expresión de los genes *fleQ* y *fleR* involucrados en la formación y regulación del biofilm de *P. aeruginosa*. Los resultados demostraron que las proteínas de la fracción F1 de la miel de *M. beecheii* inhiben y afectan la formación del biofilm de *P. aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium that can form a biofilm with the ability to colonize different surfaces and for increasing resistance to antibiotics. An alternative to solve this problem may be the use of non-glucose/mannose glycosylated proteins from *Melipona beecheii* honey, which are capable of inhibiting the growth of this pathogen. In this work, the antibiofilm activity of the conA unbound protein fraction (F1) from *M. beecheii* was evaluated. The crude protein extract (CPE) and the F1 fraction inhibited the *P. aeruginosa* biofilm growth above 80% at 4 and 1.3 µg/mL, respectively. These proteins affected the structure of the biofilm, as well as *fleQ* and *fleR* gene expressions involved in the formation and regulation of the *P. aeruginosa* biofilm. The results demonstrated that the F1 fraction proteins of *M. beecheii* honey inhibit and affect the formation of the *P. aeruginosa* biofilm.

III. CAPITULO 3. EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA MIEL DE ABEJA *Melipona beecheii* SOBRE EL PROTEOMA DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Luis Pool-Yam, Jesús Ramón-Sierra, Mario Alberto Martínez Núñez, Marco Antonio Villanueva Méndez, Elizabeth Ortiz-Vázquez*, Roberto Zamora-Bustillos*

e-mail, primer autor: felipe-19201@outlook.com

*e-mail, autor de correspondencia: elizabeth.ov@merida.tecnm.mx, roberto.zb@conkal.tecnm.mx

3.1 Resumen /Abstract

Las enfermedades asociadas a la formación biofilm como la otitis externa, las enfermedades respiratorias, la mastitis clínica y subclínica en animales representan un problema en la medicina veterinaria y son ocasionadas por bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, causando infecciones crónicas y difíciles de erradicar. Nuestro grupo ha reportado que las proteínas no glicosiladas (fracción F1) obtenidas de la miel de la abeja (*Melipona beecheii*), podrían ser una alternativa para combatir el biofilm bacteriano. Para este trabajo se realizó una electroforesis bidimensional (2D) de los extractos proteicos del biofilm de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en presencia del extracto crudo proteico (ECP) y la fracción F1 de la miel de *M. beecheii*, se comparó en paralelo los proteomas de los biofilm y se analizó cada proteoma del biofilm de *P. aeruginosa*, esto para conocer el mecanismo de acción antibiofilm que tienen estas proteínas.

Biofilm-associated diseases, such as otitis externa, respiratory diseases, and both clinical and subclinical mastitis in animals, pose a problem in veterinary medicine and are caused by bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*, leading to chronic infections that are difficult to eradicate. Our group has reported that non-glycosylated proteins (F1 fraction) obtained from *Melipona beecheii* honey could be a potential alternative to combat bacterial biofilm. For this study, two-dimensional (2D) electrophoresis was conducted on protein extracts from the biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 27853 in the presence of the crude protein extract (CPE) and the F1 fraction from *M. beecheii* honey. The biofilm proteomes were compared in parallel, and each biofilm proteome of *P. aeruginosa* was analyzed to understand the antibiofilm action mechanism of these proteins.