



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MONOTERPENOS Y
SESQUITERPENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y LA
EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
RESISTENTE A METICILINA**

CLAUDIA DE LOS ÁNGELES SALINAS DÁVALOS

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

JUNIO, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MONOTERPENOS Y
SESQUITERPENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y LA
EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
RESISTENTE A METICILINA**

CLAUDIA DE LOS ÁNGELES SALINAS DÁVALOS

Tutor: PROF. DRA ROSA GUILLÉN FRETES

Co-tutor: PROF. DR NELSON ALVARENGA

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

Salinas Dávalos, Claudia De Los Ángeles

Evaluación del efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la producción de biofilm y la expresión de genes asociados en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina / Claudia De Los Ángeles Salinas Dávalos; Tutora: Rosa María Guillén Fretes; Co-tutor: Nelson Alvarenga.- - San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas; 2021.

xvii, 59; il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. Terpenos 2. Biopelículas 3. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina l.

Titulo

CDD: (ed. 18ª) 616.01
Sal33e



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud- Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL/LA PROF. DRA. ROSA MARÍA GUILLÉN FRETES, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación del efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la producción de biofilm y la expresión de genes asociados en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Claudia De Los Ángeles Salinas Dávalos para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 18 días del mes de junio de 2021.

Tutora: Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL/LA **PROF. DR. NELSON ALVARENGA**, DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación del efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la producción de biofilm y la expresión de genes asociados en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Claudia De Los Ángeles Salinas Dávalos para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 18 días del mes de junio de 2021.

Co-Tutor: Prof. Dr. Nelson Alvarenga



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**,
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA
UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación del efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la producción de biofilm y la expresión de genes asociados en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Claudia De Los Ángeles Salinas Dávalos para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF. DRA. ROSA MARÍA GUILLÉN FRETES** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 18 días del mes de junio de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Evaluación del efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la producción de biofilm y la expresión de genes asociados en *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Claudia De Los Ángeles Salinas Dávalos

Aprobado el 18 de junio de 2021

Tribunal examinador:

Dra. María Eugenia Flores Giubi, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

Dr. José Félix Plans Perrota, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

Dra. Juana Medarda Ortellado Canese, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

María Cristina Romero Rodríguez, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

Dra. Rosa María Guillén Fretes

Tutor

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.

Directora de Postgrado FCQ

DEDICATORIA

A mi madre y a mi hermana, los pilares de mi vida

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa María Guillén y la MSc. Fátima Rodríguez Acosta, por sus enseñanzas, su paciencia y cariño, no hubiera podido lograr esto sin su ayuda y guía. Mi gratitud eterna para con ustedes

Al Dr. Alvarenga por el acompañamiento durante el desarrollo de trabajo. Es un gran honor que me haya permitido ampliar el área de mi formación trabajando con usted

A todas las personas que me brindaron su ayuda permitiéndome usar equipos o reactivos. Gracias al laboratorio San Roque, al señor José Luis Faluótico, a los investigadores y estudiantes del departamento de Biotecnología de la Facultad Ciencias Químicas y de los departamentos de Inmunología y Producción del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud.

A mis amigos, gracias por todas las palabras de aliento, por toda la ayuda, por la comprensión, no sé qué hubiera hecho sin ustedes.

A mis compañeras de sueños: Patricia, Melisa y Christa. Todo era mejor con ustedes.

A mis papás, Amado y Vicente, porque desde donde estén sé que siempre me acompañaron y que lo seguirán haciendo hasta el último día. Espero se sientan orgullosos.

A mi mamá y a mi hermana, no tengo palabras para describir todo lo que significan para mí. Jamás podré terminar de retribuirles todo lo que hicieron y siguen haciendo. Gracias por tanto amor. Este logro definitivamente es de ustedes.

Y finalmente a Dios, al que se lo debo todo.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MONOTERPENOS Y
SESQUITERPENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y LA
EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS EN *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* RESISTENTE A METICILINA**

Claudia Salinas Dávalos*, Dra. Rosa Guillén Fretes, Dr. Nelson Alvarenga*****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad
Nacional de Asunción

*** Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

El biofilm es un conglomerado de células rodeado por una matriz extracelular, que contribuye a la persistencia de las infecciones, debido a que presenta una mayor resistencia a los antibióticos y a la acción del sistema inmune del huésped. La dificultad para eliminar el biofilm impulsa la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de los terpenos (-)-*trans*-cariofileno, (S)-*cis*-Verbenol, (S) -(-) - Limoneno, (R) - (+) - Limoneno y Linalol, tanto individualmente como en combinaciones sobre: el crecimiento bacteriano, mediante ensayo con resazurina; la formación de biofilm, mediante ensayo en placa de poliestireno y tinción con cristal violeta; y la expresión de genes asociados, mediante PCR a tiempo real, en dos aislados clínicos de *S. aureus*, ST30-t019 y ST5-t311, responsables de más del 90% de las infecciones pediátricas por este patógeno en Paraguay. Todas las combinaciones de terpenos fueron capaces de inhibir la formación de biofilm en un porcentaje superior al 50% sin afectar el crecimiento bacteriano. La combinación más efectiva fue la del (-)-*trans*-cariofileno y Linalol a una concentración de 500 µg/mL para cada uno, con un porcentaje de inhibición del 88%. Esta combinación disminuyó los niveles de expresión de los genes *sdrD*, *spa*, *agr* y *hld*, asociados con la etapa inicial de adhesión celular y el *quorum sensing*; mientras que incrementó los niveles de expresión de los genes *cap5B* y *cap5C*, asociados a la producción de polisacáridos capsulares. Las combinaciones de compuestos testadas constituyen unas prometedoras alternativas para inhibir la formación de biofilm en *S. aureus*.

Palabras claves: *S. aureus*, biofilm, terpenos

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MONOTERPENOS Y
SESQUITERPENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y LA
EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS EN *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* RESISTENTE A METICILINA**

Claudia Salinas Dávalos*, Dra. Rosa Guillén Fretes, Dr. Nelson Alvarenga*****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad
Nacional de Asunción

*** Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

ABSTRACT

The biofilm is a conglomerate of cells surrounded by an extracellular matrix. This bacterial association contributes to the persistence of infections, due to its greater resistance to antibiotics and to the action of the host's immune system. The difficulty of treating these bacterial biofilms prompts the search for new therapeutic options, with compounds obtained from natural sources being a promising alternative given their ease of obtaining and low toxicity. This work aimed to evaluate the effect of the terpenes (-) - *trans*-caryophyllene, (S)-*cis*-Verbenol, (S) - (-) - Limonene, (R) - (+) - Limonene and Linalool, individually as in combinations on: bacterial growth, by resazurin assay; biofilm formation, by polystyrene plate assay and crystal violet staining; and the expression of associated genes, by real-time PCR, in two clinical isolates of *S. aureus*, ST30-t019 and ST5-t311, responsible for more than 90% of pediatric infections by this pathogen in Paraguay. All terpene combinations were able to inhibit biofilm formation by a percentage greater than 50% without affecting bacterial growth. The most effective combination was (-) - *trans*-caryophyllene and Linalol at a concentration of 500 µg / mL for each, with an inhibition percentage of 88%. This combination decreased the expression levels of the *sdrD*, *spa*, *agr* and *hld* genes, associated with the initial cell adhesion stage and quorum sensing; and increased the expression levels of the *cap5B* and *cap5C* genes, associated with the production of capsular polysaccharides. The tested compound combinations constitute promising alternatives to inhibit biofilm formation in *S. aureus*

Keywords: *S. aureus*, biofilm, terpenes

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 Resistencia a meticilina.....	2
1.1.2 Cepas hospitalarias y comunitarias	2
1.1.3 Variabilidad genética	3
1.1.4 Situación en Paraguay	5
1.2 <i>S. aureus</i> y biofilm bacteriano	6
1.2.1 Etapas de la formación de biofilm	6
1.2.2 Genes asociados a la formación de biofilm.....	7
1.2.3 Nuevas opciones terapéuticas	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 General.....	10
2.2 Específicos	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Diseño de estudio y población	11
3.2 Monoterpenos y sesquiterpenos	11
3.3 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	13
3.4 Concentración inhibitoria mínima para combinaciones de terpenos	14
3.5 Ensayo de inhibición de formación de biofilm	15
3.6 Ensayo de inhibición de formación de biofilm para combinaciones de terpenos ..	16
3.7 Ensayo de expresión génica	17
3.7.1 Extracción de ARN	17
3.7.2 Síntesis de ADNc.....	18
3.7.3 Estandarización de condiciones de amplificación de genes.....	18
3.7.4 Cuantificación relativa de genes	19
3.8 Asuntos estadísticos	19
3.9 Consideraciones éticas	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Concentración Inhibitoria Mínima.....	21
4.2 Formación de biofilm en las cepas ST30-t019 y ST5-t311.....	22
4.3 Efecto de terpenos sobre la formación de biofilm	22

4.4	Concentración Inhibitoria Mínima para combinaciones de compuestos sobre el aislado ST5-t311	27
4.5	Efecto de combinaciones de terpenos sobre la formación de biofilm del aislado ST5-t311	27
4.6	Estandarización de la amplificación de genes asociados a formación de biofilm .	29
4.7	Efecto de terpenos sobre expresión de genes asociados a formación de biofilm...	29
4.7.1	Genes asociados a la adhesión	30
4.7.2	Genes asociados a dispersión	31
4.7.3	Genes asociados a la síntesis de polisacáridos capsulares	33
5.	Discusión.....	35
5.1	Concentración Inhibitoria Mínima.....	35
5.2	Efecto de terpenos sobre la formación de biofilm	38
5.3	Efecto de terpenos sobre expresión de genes asociados a formación de biofilm...	41
6.	CONCLUSIÓN.....	45
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8.	ANEXO.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clones de SARM reportados con mayor frecuencia en cada continente o región	4
Figura 2. Etapas de la formación de biofilm y composición de la matriz extracelular en cada etapa	7
Figura 3. Estructura de los compuestos terpénicos	12
Figura 4. Flujograma de trabajo	12
Figura 5. Ensayo de determinación de CIM para compuestos terpénicos	13
Figura 6. Capacidad de formación de biofilm de los aislados ST30-t019 y ST5-t311	22
Figura 7. Efecto del (S) y (R) Limoneno sobre la formación de biofilm	23
Figura 8. Efecto del (S)- <i>cis</i> -Verbenol sobre la formación de biofilm	24
Figura 9. Efecto del (-)- <i>trans</i> -cariofileno sobre la formación de biofilm	24
Figura 10. Efecto del espatulenol sobre la formación de biofilm	25
Figura 11. Efecto del Linalol sobre la formación de biofilm	26
Figura 12. Efecto de las combinaciones de terpenos sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311	28
Figura 13. Efecto de los terpenos Linalol, (-)- <i>trans</i> -cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen <i>sdrD</i>	30
Figura 14. Efecto de los terpenos Linalol, (-)- <i>trans</i> -cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen <i>spa</i>	31
Figura 15. Efecto de los terpenos Linalol, (-)- <i>trans</i> -cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen <i>hld</i>	32
Figura 16. Efecto de los terpenos Linalol, (-)- <i>trans</i> -cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen <i>agrA</i>	32
Figura 17. Efecto de los terpenos Linalol, (-)- <i>trans</i> -cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen <i>cap5B</i>	33
Figura 18. Efecto de los terpenos Linalol, (-)- <i>trans</i> -cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen <i>cap5C</i>	34

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Combinaciones de terpenos testadas	15
Tabla 2. Genes amplificados y su función asociada al proceso de formación de biofilm	19
Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos terpénicos	21
Tabla 4. Concentraciones inhibitorias mínimas de las combinaciones de compuestos terpénicos	26
Tabla 5. Porcentajes de inhibición de la formación de biofilm empleando combinaciones de terpenos	28

1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria gram-positiva con forma cocoide de un diámetro de aproximadamente 1 μm , que se presenta agrupada en racimos. Es una bacteria anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada, productora de catalasa y coagulasa (1,2).

Este microorganismo forma colonias blancas o amarillas en medios nutritivos, y es justamente a la pigmentación dorada, debida a ciertos carotenoides, a la que hace referencia el término “*aureus*”. Es capaz de crecer en medios con alto contenido de sales, como el agar manitol salado (7,5% de NaCl), y es por esto que en la práctica habitual se utiliza para aislar colonias del género *Staphylococcus* (2).

Es un comensal habitual de piel y mucosas en el ser humano. Se ha demostrado que aproximadamente 20% de los individuos son portadores permanentes, mientras que alrededor del 30% lo porta de manera intermitente. La existencia de individuos con mayor propensión a portar esta bacteria puede explicarse en base a diferencias en la microbiota, estado inmunitario e incluso obesidad (3–5).

La colonización frecuente sumada a su gran potencial patogénico, contribuyen a que este microorganismo sea uno de los principales causantes de infecciones a nivel global. Estas infecciones abarcan desde infecciones de piel y partes blandas, del aparato gastrointestinal, neumonías hasta incluso bacteriemias, endocarditis, osteomielitis, e incluso infecciones relacionadas a instrumental médico (1).

Gran parte de los cuadros causados por esta bacteria pueden ser atribuidas a la producción y excreción de toxinas, que pueden clasificarse principalmente en tres grupos: las toxinas formadoras de poros (hemolisina- α , hemolisina- β , leucotoxinas y modulinas solubles en fenol), toxinas exfoliativas (ETA, ETB, ETC, ETD) y los superantígenos (toxina del síndrome del shock tóxico, enterotoxinas y 11 toxinas similares a superantígenos) (6).

Otra de las características que ha determinado el éxito de este patógeno es la capacidad de adaptación a diferentes ambientes, pudiendo causar infecciones tanto en hospitales como en la comunidad. Además, es capaz de adquirir resistencia a antibióticos con

rapidez. La resistencia a la penicilina fue descrita tan sólo dos años después de su introducción como tratamiento y para inicios del siglo XXI más del 90% de las cepas de *S. aureus* eran resistentes a este antibiótico (7).

1.1.1 Resistencia a meticilina

La resistencia a penicilina es conferida por el gen plasmídico *blaZ* que codifica una enzima beta-lactamasa (conocida como penicilinasas) capaz de escindir el anillo beta-lactámico de la penicilina. En el año 1961 fue introducida la meticilina como alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por estas cepas resistentes. Este antibiótico aun siendo del grupo de los beta-lactámicos, es resistente a la acción de la penicilinasas. Sin embargo, en el mismo año de su introducción aparecieron las primeras cepas resistentes a este nuevo compuesto (7).

Los beta-lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular mediante la unión a las proteínas denominadas PBP (*penicillin binding proteins* o proteínas de unión a penicilina), unas transpeptidasas que intervienen en el paso final de la síntesis de peptidoglicanos de la pared. Las cepas resistentes a meticilina poseen el gen *mecA* que codifica una PBP alternativa (PBP2a), la cual posee baja afinidad por estos antibióticos (8).

1.1.2 Cepas hospitalarias y comunitarias

Inicialmente *S. aureus* fue señalado como un patógeno hospitalario, sin embargo en las últimas décadas se ha incrementado su asociación a infecciones en individuos sanos de la comunidad. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) para clasificar a una cepa como SARM-AC (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridos de la comunidad) debe ser aislada de un paciente en menos de 48 horas desde su admisión al hospital, sin historial de cirugías, diálisis, implantes de dispositivos médicos u hospitalizaciones durante el año anterior. Se clasifican como SARM-AH (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridas en el hospital) a todas aquellas cepas que no cumplan con esta definición. No obstante, debido a la movilidad del microorganismo entre ambos ambientes y su instalación exitosa en los mismos, esta clasificación se torna cada vez más complicada; registrándose cada vez con mayor

frecuencia infecciones adquiridas en el hospital causadas por cepas caracterizadas como comunitarias. Recientemente se incluyó además a las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina asociadas al ganado (SARM-AG), que fueron descritas por primera vez en 2005 y han cobrado importancia en los últimos años (9–14).

1.1.3 Variabilidad genética

Los métodos genotípicos empleados para caracterizar a los aislados incluyen a la electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*, *PFGE*), la tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus Sequence Typing*, *MLST*), *spa typing*, el Análisis Multi-Locus de Secuencias Repetitivas en Tándem de Número Variable (*Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis*, *MLVA*); la tipificación del elemento SCCmec, entre otros (15–19)

La caracterización de los aislados es indispensable para la implementación y la evaluación de la efectividad de medidas de control de brotes. La gran variabilidad de esta especie requiere el empleo de una combinación de métodos tanto fenotípicos como genotípicos, para lograr la identificación clonal (12).

Si bien la prevalencia de los clones varía geográficamente, existen 5 complejos clonales (CC) más frecuentes a nivel mundial: CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45. Los complejos clonales son grupos evolutivamente relacionados agrupados en base al secuenciotipo (ST) obtenido mediante la técnica de MLST. La diversidad de clones para cepas SARM-AC es mayor que para cepas SARM-AH. En la figura 1 se muestra un resumen de los clones más prevalentes en varios continentes (12).

En Estados Unidos y Canadá el clon comunitario más prevalente es el clon conocido como USA300 (ST8). Una variante de este clon, denominada variante latinoamericana (USA300-LV) es la principal causa de infecciones asociadas a *S. aureus* en los países del norte de Sudamérica (Colombia, Venezuela, Ecuador). A nivel regional, en Uruguay y Argentina los clones mayoritarios pertenecen a los clones ST30-IV y ST5-IV (20–25).

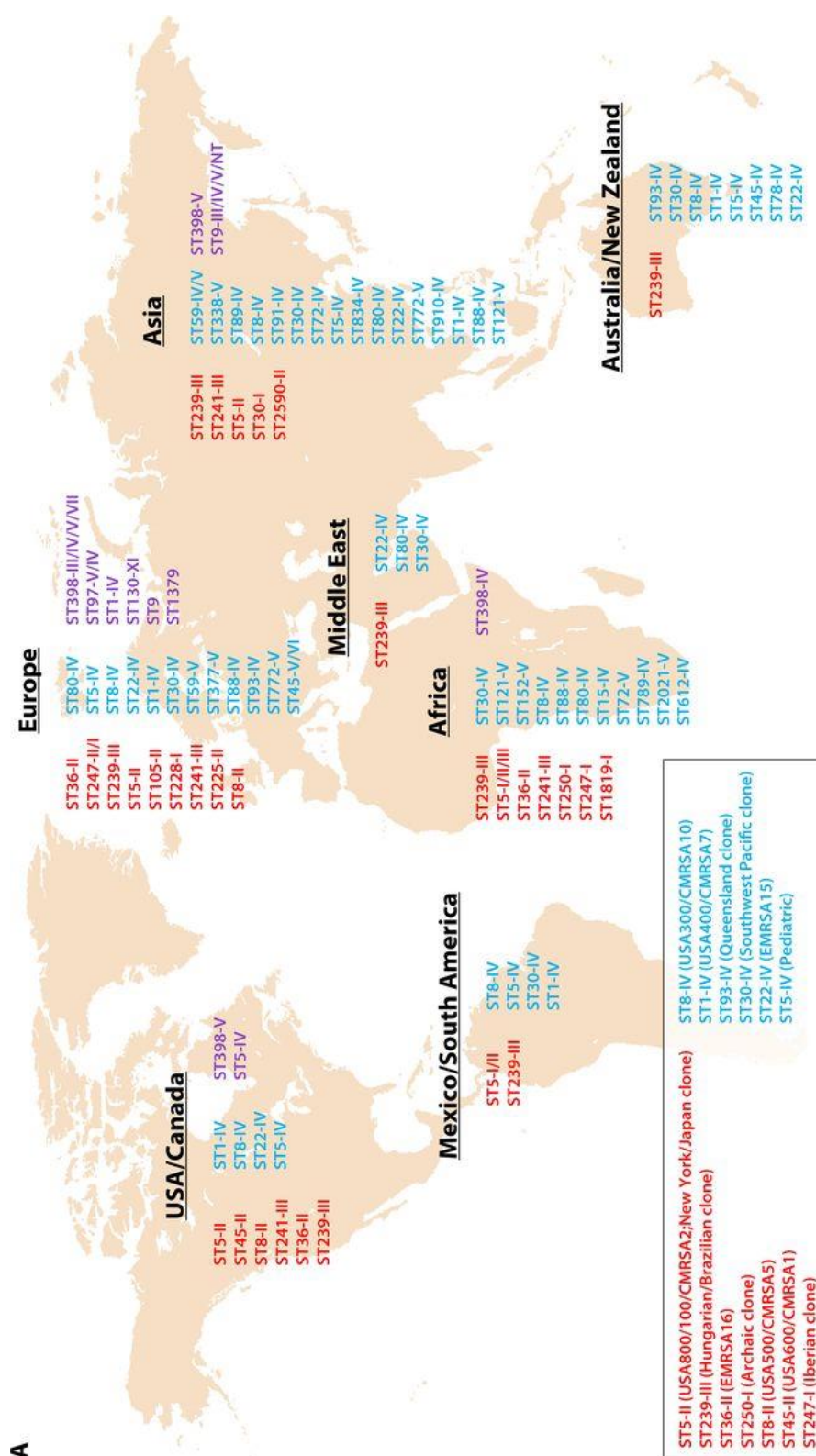


Figura 1. Clones de SARM reportados con mayor frecuencia en cada continente o región. El rojo se utiliza para los clones SARM-AH, el azul representa a los clones SARM-AC y el purpura a los clones SARM-AG. Extraído de Lakhundi (2018) (12)

El clon ST30-IV merece especial atención dada su amplia distribución, es considerado pandémico ya que es aislado de manera repetida en todos los continentes, y a que se ha registrado una asociación entre el aislamiento de este clon y el desarrollo de infecciones de tipo invasivo. En Uruguay un brote debido a este clon ocasionó la muerte de 7 personas. Además, puede presentar el mismo perfil de virulencia que el también pandémico clon USA300, causante de numerosas muertes en diferentes lugares del mundo. Si bien este clon ha ido desplazando al clon ST5-IV en la región, este también sigue siendo una importante causa de preocupación debido a que está asociado sobre todo a infecciones de tipo invasivo en población pediátrica, exhibe mayores niveles de resistencia a antibióticos como eritromicina y clindamicina que el clon ST30-t019, y posee la capacidad de presentar fenotipo resistente a vancomicina (23,24,26–29)

1.1.4 Situación en Paraguay

En Paraguay se registran niveles elevados de resistencia a meticilina en aislados de *S. aureus*, con porcentajes superiores al 60% en el año 2016 según datos de la Organización Panamericana de la Salud. Dada la dificultad de tratar las infecciones causadas por SARM, estos niveles resultan alarmantes. En cuanto a la variabilidad genética de los mismos, en un estudio realizado en 2005 por Mayor y colaboradores, se analizaron 35 aislados SARM-AH y se determinó que pertenecían a dos clones: ST5-t149-I (similar al clon Cordobés/Chileno) y ST239-t037-IIIA (relacionado al clon brasileño) (30,31).

En aislados SARM-AC, el único estudio realizado hasta la fecha con el fin de evaluar su epidemiología molecular en el país, arrojó que los clones responsables del 90% de las infecciones pediátricas en los años 2009-2010 y 2012-2013 corresponden a los clones ST30-IV y ST5-IV. Estos aislados fueron colectados en cuatro centros hospitalarios de referencia a nivel nacional (32,33).

1.2 *S. aureus* y biofilm bacteriano

S. aureus presenta la capacidad de persistir en implantes médicos, huesos, válvulas cardíacas, entre otros. Esta persistencia se logra mediante la formación de conglomerados celulares adheridos a una superficie y recubiertos con una matriz de naturaleza polimérica. Estos conglomerados reciben el nombre de biofilms o biopelículas, y constituyen una barrera contra los componentes del sistema inmune del huésped (34).

Estos biofilms presentan también una sensibilidad a antimicrobianos diferente a la de las células en estado no asociado. El incremento de hasta 1000 veces la resistencia a antibióticos en comparación a las células en estado plantónico puede darse a través de varios mecanismos. Uno de ellos es que la existencia de la matriz extracelular actúa como una barrera física que disminuye la penetración de los antimicrobianos hacia las capas más internas del biofilm. También, una limitación en el aporte de nutrientes conduce a ciertas células a un estado estacionario en el que los antibióticos pierden efectividad. Se ha demostrado además un incremento en la eficiencia de transferencia de plásmidos que confieren resistencia a un antibiótico en biofilms que son expuestos al mismo (35,36)

1.2.1 Etapas de la formación de biofilm

La formación de biofilm implica varias etapas: adhesión, multiplicación, éxodo, maduración y dispersión. En la etapa de adhesión las bacterias se unen a superficies bióticas o abióticas mediante diversas proteínas de superficie. Entre estas podemos citar a la proteína A, familia de proteínas con repeticiones serina-aspartato (SdrC, SdrD, SdrE), adhesinas de colágeno, proteínas de unión a fibronectina, entre otras. Para superficies abióticas, la adherencia se da más bien a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Luego de la adhesión, si las condiciones son adecuadas, las células empiezan a multiplicarse formando capas. En esta etapa aún no está presente la matriz polimérica por lo que las células son aún susceptibles a desprenderse de su unión a otras células (37,38).

En la etapa del éxodo se forman microcolonias a partir de la liberación coordinada de células desde las capas conformadas luego de la multiplicación. A diferencia de la

etapa de dispersión, mediada por el sistema *agr*, en esta etapa son las nucleasas las que participan en la liberación, degradando el ADN extracelular que participa en la adhesión entre células. Este ADN es producto de la lisis de algunas células durante la formación del conglomerado (37).

Inicialmente se consideraba que estas microcolonias se originaban luego de la formación de túneles en capas de células ya establecidas. Actualmente se propone que las microcolonias se forman a partir de las células remanentes en la capa basal luego de la etapa de éxodo, y que durante su etapa de maduración cada una puede adoptar un ritmo de crecimiento y una expresión de genes diferencial, aun cuando el biofilm se origine a partir de células genéticamente idénticas. Finalmente se produce la etapa de dispersión que es necesaria para la colonización y el establecimiento de nuevos sitios de infección. Las etapas de la formación de biofilm se esquematizan en la figura 2 (39).

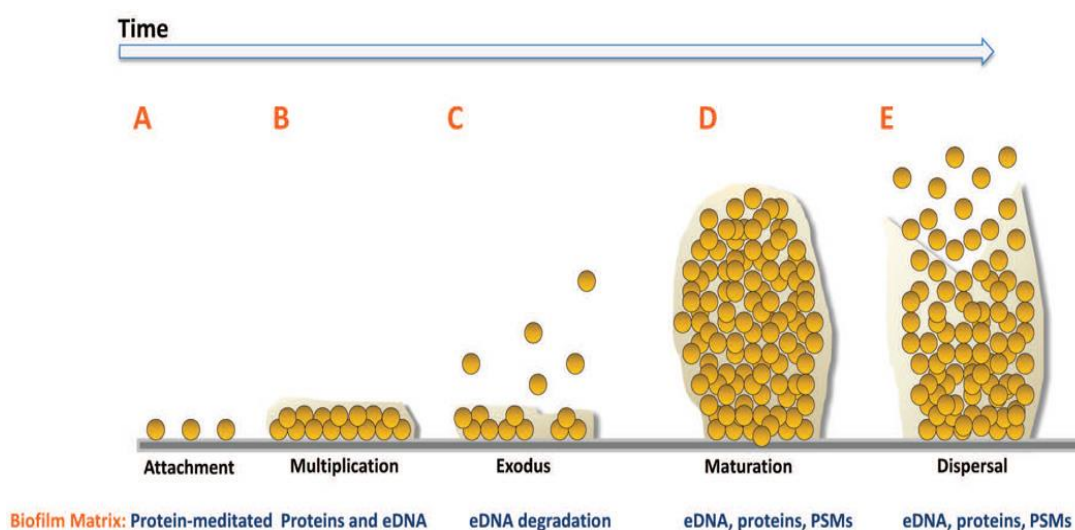


Figura 2. Etapas de la formación de biofilm y composición de la matriz extracelular en cada etapa. Extraído de Moormeier (2017) (37)

1.2.2 Genes asociados a la formación de biofilm

- **Genes que codifican proteínas de la familia de proteínas con repeticiones serina-aspartato (*Sdr*):** Dentro de esta familia se encuentran las proteínas SdrC, SdrD y SdrE en *S. aureus*. Estas proteínas participan en la etapa de adhesión, debido a que presentan tanto la capacidad de unirse a ligandos del huésped como la de promover la auto-asociación entre las células bacterianas; además de ser

capaces de inhibir la activación del complemento. En esta etapa de adhesión también pueden estar involucrados otros numerosos genes entre los que se pueden citar a los genes que codifican las proteínas de unión a fibronectina (FnBPA and FnBPB), autolisinas (AtlA and AtlE), proteína de unión a sialoproteínas óseas (Bbp), factores de aglutinación (ClfA y ClfB), proteína de adhesión a colágeno (CNA), entre otras (40,41)

- **Gen de la proteína A:** La proteína A, codificada por el gen *spa*, participa también en la etapa de adhesión mediando la agregación bacteriana. Incluso se ha demostrado que la adición exógena de esta proteína al medio de cultivo induce la formación de biofilm. Esta proteína participa además en la evasión de la respuesta inmune mediante la unión a la región Fc de la inmunoglobulina IgG (40,42)
- **Sistema *agr* (*accessory gene regulator*):** Es el sistema de *quorum-sensing* mejor descrito para *S. aureus*. Durante las etapas iniciales de formación de biofilm este sistema se encuentra reprimido. En la etapa de dispersión el aumento de la densidad celular o la acumulación de moléculas de señal en el *medio activan* al sistema *agr*, el cual controla la dispersión de las células mediante el incremento de la actividad de proteasas (43)
- **Gen *hld*:** Las modulinas solubles en fenol (PSM, *phenol-soluble modulin*), entre las que se encuentra la δ -hemolisina (codificada por el gen *hld*), son un grupo de moléculas de características surfactantes y constituyen el mecanismo efector del sistema *agr* durante los procesos de maduración y dispersión del biofilm. Una sobreexpresión de la δ -hemolisina implica una inhibición en la formación de biofilm (44,45)
- **Genes *cap*:** Estos genes se encuentran involucrados en la síntesis de polisacáridos capsulares, constituyentes de la sustancia polimérica extracelular que es requerida para la formación de biofilm. Además, contribuyen a la resistencia del patógeno a la fagocitosis y de esta manera favorece su persistencia (46)

1.2.3 Nuevas opciones terapéuticas

Dada la dificultad de tratar estos biofilms con agentes antibióticos tradicionales se han empleado otros agentes químicos para erradicarlos. Un ejemplo de esto son los compuestos cuaternarios de amonio que si bien tienen capacidad de eliminar el biofilm, resultan tóxicos, lo que limita su aplicación. Es por esto que actualmente numerosos trabajos se centran en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas seguras tanto para impedir la formación de biofilm como para eliminar el biofilm ya establecido. Estas nuevas estrategias incluyen al uso de compuestos de origen natural, moléculas que interfieren con el sistema de *quorum-sensing*, péptidos anti-biofilm, terapia con fagos, ingeniería de superficies, entre otras (47,48)

Los compuestos de origen natural presentan varias ventajas incluyendo su abundancia, facilidad de obtención y bajo costo en comparación a otras estrategias, seguridad e incluso la presencia de otras propiedades biológicas como por ejemplo anti-inflamatorias o cicatrizantes. Extractos de varias plantas como por ejemplo *Rhodomyrtus tomentosa*, *Hymenocallis littoralis*, *Cocculus trilobus*, *Eucalyptus globulus*, *Sesbania grandiflora* han demostrado tener capacidad de inhibir la formación de biofilm por *S. aureus* (48–52)

Los fitoquímicos puros también han demostrado efectos inhibidores. Entre estos se incluyen sobre todo a compuestos del grupo de los flavonoides, alcaloides o terpenos. Los terpenos constituyen uno de los principales componentes de los aceites esenciales de numerosas plantas. Son derivados del ácido mevalónico y estructuralmente implican una combinación de unidades de isopreno. Y en además de su actividad anti-biofilm contra *S. aureus* y otras especies bacterianas, presentan otras propiedades biológicas: anti-inflamatorias, anti-isquémicas, antioxidantes, insecticidas, antimicrobianas (53–55)

El presente trabajo busca brindar nuevas alternativas para evitar la formación del biofilm por *S. aureus* y todas las consecuencias que esto implica, evaluando no sólo la acción inhibidora de varios compuestos monoterpénicos y sesquiterpénicos, sino también su efecto sobre la expresión de ciertos genes asociados a este proceso, lo que podría conducir a una aproximación de su mecanismo de acción y a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 General

- Evaluar el efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la producción de biofilm y la expresión de genes asociados en SARM

2.2 Específicos

- Evaluar la actividad de monoterpenos y sesquiterpenos como inhibidores de la formación de biofilm en SARM
- Determinar el efecto de monoterpenos y sesquiterpenos sobre la expresión de seis genes asociados a la producción de biofilm en SARM

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de estudio y población

El diseño del presente trabajo corresponde a un estudio experimental. Los aislados de *S. aureus* incluidos provienen de niños y han sido previamente caracterizados a nivel molecular como pertenecientes a los clones ST30-t019 y ST5-t311. Estos fueron colectados en el marco de proyectos realizados por el grupo de investigación de Bacteriología Molecular del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, en los años 2010, 2012, 2013 y 2017, cuyos objetivos eran establecer la variabilidad genética de las cepas de *S. aureus* responsables de infecciones en población pediátrica en el Paraguay. La colecta de aislados se realizó en cuatro centros hospitalarios de referencia a nivel de Nacional e incluían al Hospital General Pediátrico “Niños de Acosta Ñu”, Instituto de Previsión Social, Hospital de Clínicas y el Hospital Nacional de Itauguá. Para llevar a cabo la genotipificación bacteriana se empleó una combinación de métodos moleculares: MLVA, MLST, spatyping, que determinaron a los clones ST30-t019 y ST5-t311, como responsables del 90% de las infecciones en niños causadas por este patógeno. Por este motivo fue seleccionado un aislado clínico representativo de cada uno de estos clones.

Estos aislados se encontraban conservados a -80°C en viales con medio infusión cerebro corazón (BHI, Britania, Argentina) suplementado con glicerol al 15%. Los cultivos para los ensayos posteriores se realizaron en agar tripticasa de soja (TSA, Becton, Dickinson and Company, USA).

3.2 Monoterpenos y sesquiterpenos

Las soluciones stock de los compuestos (–)-*trans*-cariofileno, (S)-*cis*-Verbenol, (S)-(-)-Limoneno, (R)-(+)-Limoneno (Sigma-Aldrich, USA) y Linalool (Consolidated Chemical & Solvents LLC, USA) fueron preparadas a concentraciones de 20, 10 y 4 mg/mL usando etanol (J.T Baker, USA) como solvente y conservadas a -20°C. Las estructuras de los compuestos citados se muestran en la figura 3, mientras que la figura 4 indica un flujograma resumido del trabajo experimental.

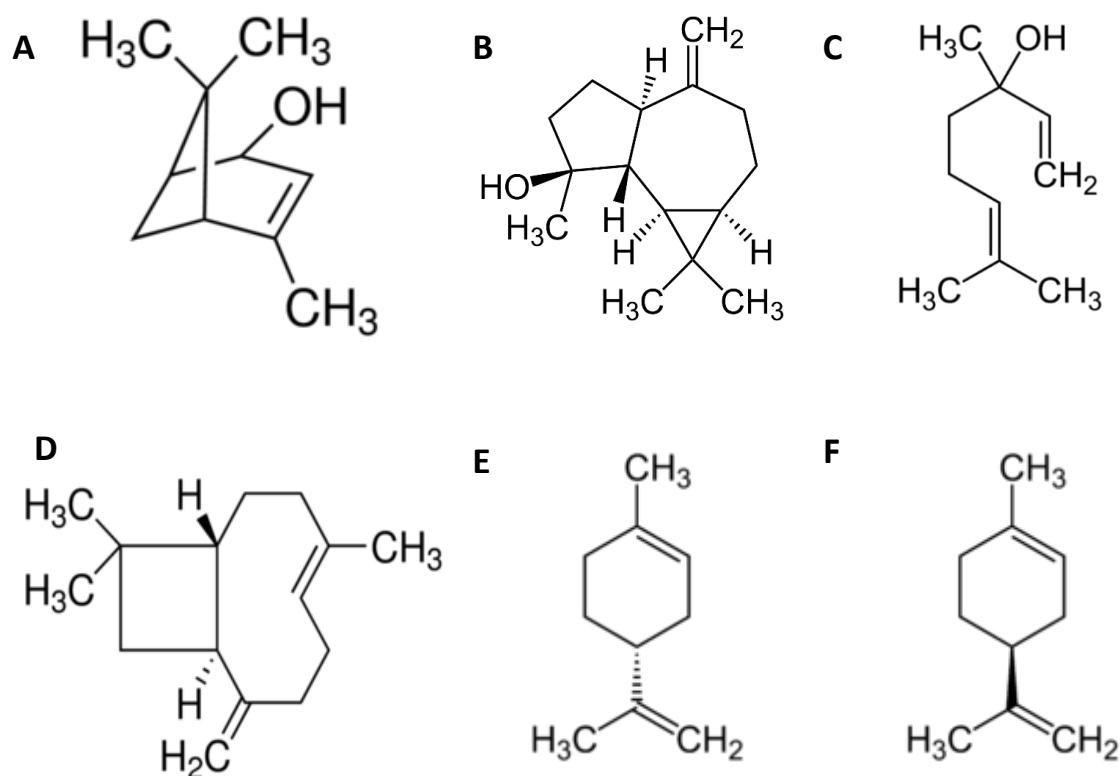


Figura 3. Estructura de los compuestos A) Verbenol, B) Epatulenol, C) Linalol D) *Trans*-cariofileno E) (R)-(+)-Limoneno F) (S)-(-)-Limoneno

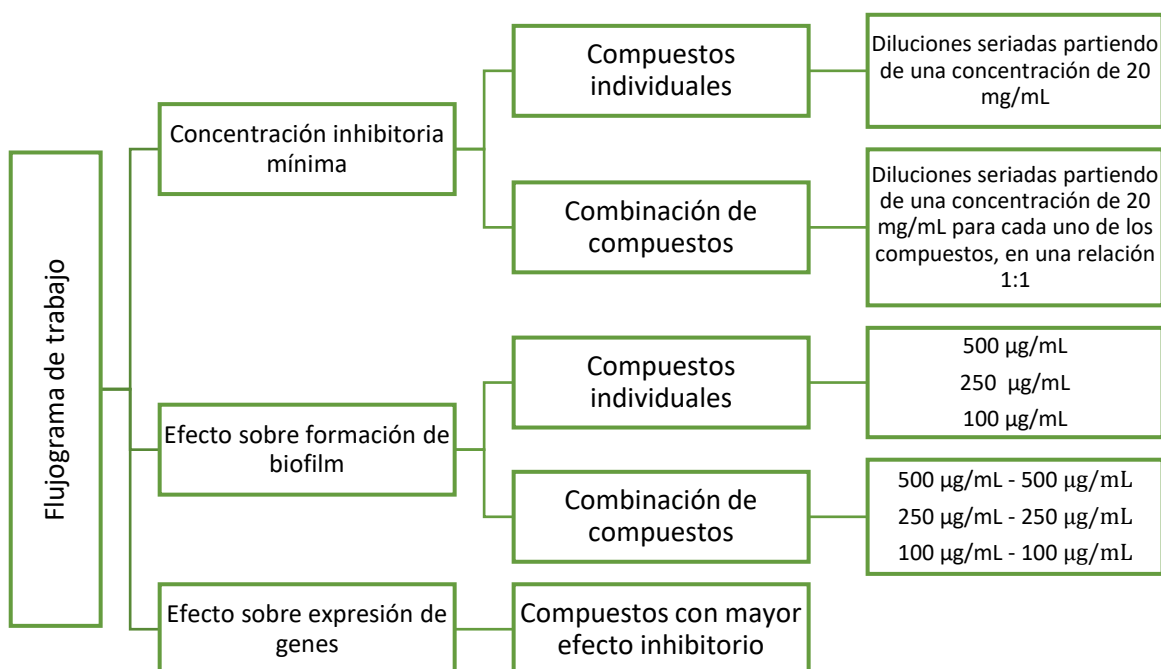


Figura 4. Flujograma de trabajo

3.3 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Las CIM del antibiótico gentamicina y de los terpenos fueron determinadas mediante el método descrito por Sarker y colaboradores en 2007, con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en placa de poliestireno de 96 pocillos, colocando en la primera columna 100 μ L de caldo tripticasa de soja (TSB, Becton, Dickinson and Company, USA), suplementado con gentamicina a una concentración de 1 mg/mL o con los compuestos terpénicos a una concentración final de 20 mg/mL.

En los pocillos restantes fueron colocados 50 μ L de medio TSB y fueron realizadas diluciones seriadas para obtener concentraciones decrecientes de los compuestos testados a un volumen final de 50 μ L. Las dos últimas columnas fueron utilizadas como control de crecimiento (medio de cultivo con inóculo bacteriano) y como control de esterilidad (medio de cultivo). Una suspensión bacteriana de $5 \cdot 10^5$ UFC fue añadida a cada pocillo para alcanzar un volumen final de 100 μ L. La placa se incubó a 37°C durante 24 horas.

Se agregaron 10 μ L de resazurina (Sigma Aldrich, USA) a cada pocillo, se incubó nuevamente la placa a 37°C y se realizó la lectura luego de 4 horas. El cambio de color de azul a rosa indica crecimiento bacteriano. La menor concentración a la cual ocurre el cambio de color es considerada como el valor de CIM. El ensayo se llevó a cabo por duplicado y se realizó un promedio de los valores obtenidos (Figura 5) (56).

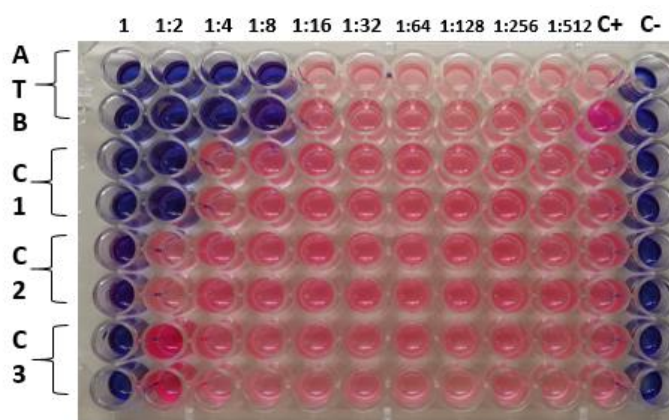


Figura 5. Ensayo de determinación de CIM para compuestos terpénicos. ATB: Gentamicina; C+: Control de crecimiento; C-: control de esterilidad.

3.4 Concentración inhibitoria mínima para combinaciones de terpenos

Se testaron combinaciones de dos terpenos de manera a evaluar una posible acción sinérgica entre los mismos. Los compuestos fueron clasificados en dos grupos: compuestos de cadena hidrocarbonada exclusiva ((-)-*trans*-cariofileno, (S)-(-)-Limoneno, (R)-(+)-Limoneno) y compuestos oxigenados (Linalool y (S)-*cis*-Verbenol). Las combinaciones se establecieron de manera a incluir a un compuesto de cada grupo y se detallan en la tabla 1.

La determinación de CIM se realizó según lo detallado en el apartado anterior para testar terpenos de manera individual. El ensayo se llevó a cabo en placa de poliestireno de 96 pocillos, colocando en la primera columna 100 μ L de medio TSB suplementado con gentamicina a una concentración de 1 mg/mL o con ambos compuestos terpénicos a una concentración final de 20 mg/mL para cada uno.

En los pocillos restantes fueron colocados 50 μ L de medio TSB y fueron realizadas diluciones seriadas para obtener concentraciones decrecientes de los compuestos testados a un volumen final de 50 μ L. Las dos últimas columnas fueron utilizadas como control de crecimiento y como control de esterilidad. Una suspensión bacteriana de 5.10^5 UFC fue añadida a cada pocillo para alcanzar un volumen final de 100 μ L. La placa se incubó a 37°C durante 24 horas. Se agregaron 10 μ L de resazurina a cada pocillo, se incubó nuevamente la placa a 37°C y se realizó la lectura luego de 4 horas. El cambio de color de azul a rosa indica crecimiento bacteriano. La menor concentración a la cual ocurre el cambio de color es considerada como el valor de CIM. El ensayo se llevó a cabo por duplicado y se realizó un promedio de los valores obtenidos.

Para evaluar las posibles interacciones entre compuestos fue utilizado el índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC, *Fractional inhibitory concentration*) y se establecen las siguientes categorías de interacción: sinérgica, aditiva, indiferente y antagonista. Una interacción sinérgica se da cuando el efecto debido a la combinación es mayor a la suma de los efectos individuales de los compuestos, mientras que un efecto aditivo se da cuando el efecto combinado es simplemente igual a dicha suma. Una interacción antagonista se registra cuando la combinación de los compuestos produce un efecto menor que el de los compuestos individuales. También puede darse

el caso en el que no exista ninguna interacción y entonces se habla de un efecto indiferente. La FIC se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$FIC = \frac{MIC_{combinación}}{MIC_{compuesto1}} + \frac{MIC_{combinación}}{MIC_{compuesto2}}$$

Los resultados son interpretados de la siguiente manera: sinergia ($FIC < 0.5$), efecto aditivo ($0.5 \leq FIC \leq 1$), efecto indiferente ($1 < FIC \leq 4$) o antagonismo ($FIC > 4$) (57)

Tabla 1. Combinaciones de terpenos testadas

Combinación	Compuestos
Combinación 1	(S)-(-)- Limoneno / Linalool
Combinación 2	(S)-(-)- Limoneno / (S)-cis-Verbenol
Combinación 3	(R)-(+)-Limoneno / Linalool
Combinación 4	(R)-(+)-Limoneno / (S)-cis-Verbenol
Combinación 5	(-)-trans-cariofileno / Linalool
Combinación 6	(-)-trans-cariofileno / (S)-cis-Verbenol

3.5 Ensayo de inhibición de formación de biofilm

El ensayo de inhibición de biofilm se realizó en placa de poliestireno de 96 pocillos según lo descrito por Qin y colaboradores en el año 2014, con algunas modificaciones. A partir de un cultivo de 24 horas en medio TSA, se preparó un inóculo de 0,5 McFarland en medio TSB suplementado con glucosa al 0,25%, utilizando el medio estéril como blanco (58).

A cada pocillo se agregaron 190 μ L de medio TSB estéril, 5 μ L del inóculo bacteriano, y 5 μ L de las soluciones madre para alcanzar concentraciones finales de 500, 250 y 100 μ g/mL, exceptuando aquellos pocillos destinados al control sin tratamiento en los que se colocaron 5 μ L del solvente empleado, en reemplazo de los terpenos. Se incluyeron además controles de esterilidad. La placa se incubó a 37°C por 24 horas. Luego de este periodo se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con PBS y posteriormente la fijación con 200 μ L de etanol (J.T Baker, USA) por pocillo, durante una hora. Tras eliminar el etanol se realizó la tinción con cristal violeta

(Anedra, Argentina) al 0,1% durante 30 minutos. El exceso de cristal violeta fue removido mediante tres lavados con agua destilada.

La elución se realizó con 200 μ L de una mezcla etanol/acetona (Cicarelli, Argentina) (70:30) y una agitación de 30 minutos en agitador automático (Nahita Blue, España). La lectura de las densidades ópticas se realizó mediante el espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, USA) a 570 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.6 Ensayo de inhibición de formación de biofilm para combinaciones de terpenos

Las combinaciones testadas en este ensayo fueron las mismas que se citan en la tabla 1. Para este ensayo fue utilizado el aislado ST5-t311 debido a que presentó mayor capacidad de formar biofilm. A partir de un cultivo de 24 horas en medio TSA, se preparó un inóculo de 0,5 McFarland en medio TSB suplementado con glucosa al 0,25%, utilizando el medio estéril como blanco. A cada pocillo se agregaron 185 μ L de medio TSB estéril, 5 μ L del inóculo bacteriano, y 5 μ L de las soluciones madre para alcanzar concentraciones finales de 500, 250 y 100 μ g/mL para cada uno de los compuestos incluidos en la combinación (relación 1:1), exceptuando aquellos pocillos destinados al control sin tratamiento en los que se colocaron 10 μ L del solvente empleado, en reemplazo de los terpenos. Se incluyeron además controles de esterilidad.

La placa se incubó a 37°C por 24 horas. Luego de este periodo se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con PBS y posteriormente la fijación con 200 μ L de etanol por pocillo, durante una hora. Tras eliminar el etanol se realizó la tinción con cristal violeta al 0,1% durante 30 minutos. El exceso de cristal violeta fue removido mediante tres lavados con agua destilada. La elución se realizó con 200 μ L de una mezcla etanol/acetona (70:30) y una agitación de 30 minutos. La lectura de las densidades ópticas se realizó mediante el espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, USA) a 570 nm. Todas las determinaciones se realizaron por

triplicado. Para el cálculo de los porcentajes de inhibición fue utilizada la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{control}}} \times 100\% \quad (58)$$

Para clasificar los porcentajes de inhibición fue utilizado el criterio publicado por Yuyama y colaboradores, el cual establece como elevada una inhibición de biofilm en un rango de 70 a 100%, buena en el rango de 40 a 69% y moderada en un rango de 20 a 39%. Los porcentajes inferiores a 20% se consideran inactivos (59).

3.7 Ensayo de expresión génica

Para realizar el ensayo de expresión génica se seleccionó la combinación de compuestos (-) *trans*-cariofileno y linalool a una concentración de 500 µg/mL para cada uno, la cual presentó la mayor actividad de inhibición de formación de biofilm. Se testó cada compuesto de manera individual y también la combinación de estos. El ensayo se realizó en placa de poliestireno de 6 pocillos. A cada pocillo se agregaron 100 µL de la solución madre de 20 mg/mL de los compuestos (-)-*trans*-cariofileno y/o Linalool, de manera a alcanzar una concentración final de 500 µg/mL para cada uno. Se incluyó un pocillo de control, en el que se añadió 100 µL de etanol. A partir de un cultivo de 24 horas en medio TSA, se prepararon inóculos bacterianos, en medio TSB suplementado con glucosa al 0,25%, de manera a alcanzar una concentración de 3.10^8 UFC/mL y un volumen final de 4 mL por pocillo. Se incluyeron además controles de esterilidad. La placa se incubó a 37°C por 4 horas. Luego de ese periodo, se transfirió el contenido de cada pocillo a tubos plásticos estériles y se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células obtenido fue conservado a -80°C hasta la extracción de ARN.

3.7.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó empleando el kit comercial Quick-RNA Fungal/Bacterial Kit (Zymo Research, Australia) según las recomendaciones del fabricante. Posterior a la extracción se realizó la digestión de ADN empleando el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA). A un volumen de 25 µL de ARN extraído,

se añadieron 3 μL de Buffer 10x RQ1, 1 μL de DNasa y 1 μL de agua libre de nucleasas. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se añadieron 3 μL de la solución de finalización y se realizó una incubación a 65°C por 10 minutos. La concentración final de ARN se midió empleando el espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, USA). El ARN extraído fue almacenado a -80°C hasta su uso en la síntesis del ADNc.

3.7.2 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADN complementario se realizó empleando 2 μg de ARN (el volumen utilizado fue calculado mediante la concentración obtenida) y 1 μg de random primers hexámeros (Macrogen, Corea del Sur). Se realizó una incubación a 70°C durante 5 minutos y un posterior enfriamiento en baño de hielo. Al tubo de reacción se agregaron 5 μL del Buffer de reacción M-MLV 5x (Promega, USA), 1,25 μL de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) con una concentración inicial de 10 mM (Promega, USA), 0,625 μL (25 u) del inhibidor de RNasa (Promega, USA), 1 μL (200 u) de la enzima M-MLV-RT (Promega, USA) y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 25 μL ; y se incubó a 37°C por 1 hora. El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.7.3 Estandarización de condiciones de amplificación de genes

Se seleccionaron 6 genes relacionados a la formación de biofilm en *S. aureus* para evaluar los cambios en la expresión génica: *spa*, *sdrD*, *hld*, *agrA*, *cap5B* y *cap5C*, cuyas funciones asociadas al biofilm se resumen en la tabla 2. La presencia de los genes en los aislados fue verificada mediante secuenciación de genoma completo realizada con el equipo Illumina MiSeq en el Instituto Tecnológico y de Energías Renovables (ITER, España). Para la amplificación de los transcritos de los genes se emplearon oligonucleótidos y condiciones de reacción descritas por Qin y colaboradores, con algunas modificaciones. Como gen normalizador fue utilizado el gen de la girasa. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL empleando el kit Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen, USA) según lo descrito por el fabricante. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 30s, seguida de 40 ciclos de 5 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C.

La especificidad de la amplificación fue verificada mediante la realización de curvas de fusión.

3.7.4 Cuantificación relativa de genes

Para calcular la expresión relativa normalizada fue empleado el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para su cálculo por una parte se obtienen las diferencias entre los valores promedios de C_t del gen de interés y del gen de referencia en presencia del compuesto a evaluar (ΔC_{tE}), y por otra parte la diferencia entre los valores promedios de C_t del gen de interés y gen de referencia bajo condiciones control (sin el compuesto) (ΔC_{tC}). Los cambios en los niveles de expresión se calculan mediante la siguiente fórmula:

Fold change = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tE} - \Delta C_{tC}$ (58,60).

Tabla 2. Genes amplificados y su función asociada al proceso de formación de biofilm

Gen	Función
<i>Spa</i>	Adhesión
<i>sdrD</i>	Adhesión
<i>Hld</i>	Dispersión
<i>agrA</i>	Dispersión
<i>Cap5B</i>	Síntesis de polisacáridos capsulares
<i>cap5C</i>	Síntesis de polisacáridos capsulares

3.8 Asuntos estadísticos

Los datos obtenidos fueron almacenados en bases de datos utilizando planillas electrónicas Excel (Microsoft Office 2013) y fueron procesados y analizados mediante el software GraphPad.

3.9 Consideraciones éticas

El banco de compuestos puros naturales forma parte del trabajo de investigación del grupo del Dpto. de Fitoquímica de la FCQ y la búsqueda de actividad inhibitoria de biofilm no conlleva conflictos de interés respecto a los objetivos de la creación dicho banco.

En este estudio se emplearon aislados de *S. aureus* obtenidos de muestras biológicas de pacientes que concurrieron a los laboratorios de microbiología, de los centros hospitalarios participantes de los proyectos marco. Los mismos cuentan con aprobación de comité científico y de ética del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, bajo los códigos P29/2011 y P12/2016, al igual que el presente trabajo bajo código P25/2019.

Los trabajos publicados a partir del presente estudio conllevarán el respeto de la autoría y la posición de acuerdo a la contribución de cada investigador participante.

4. RESULTADOS

4.1 Concentración Inhibitoria Mínima

La CIM de los diversos terpenos varió entre 5 mg/L y mayor a 20 mg/mL y se observa un perfil de susceptibilidad diferente entre los clones ST30-t019 y ST5-t311. El aislado ST30-t019 presentó mayor sensibilidad a los compuestos (-)-*trans*-cariofileno y (S)-(-)-Limoneno, mientras que presentó una sensibilidad intermedia para (S)-*cis*-verbenol, Linalool y (R)-Limoneno. En el caso del compuesto espatulenol su efecto fue nulo sobre el crecimiento de la bacteria a 20 mg/mL, y debido a la poca solubilidad del mismo no se pudieron analizar concentraciones superiores y evaluar su efecto sobre el crecimiento bacteriano, por lo que se considera una CIM de > 20 mg/mL (Tabla 3).

En el caso del aislado ST5-t311, la mayor sensibilidad se registró para los compuestos (S)-*cis*-verbenol y Linalool y una susceptibilidad intermedia a los isómeros (S)-Limoneno y (R)-Limoneno. El nivel de resistencia más elevado se observó con los compuestos (-)-*trans*-cariofileno y espatulenol, cuya CIM fue establecida en > 20 mg/mL. Con la finalidad de emplear concentraciones subinhibitorias y evaluar su efecto sobre el biofilm, los siguientes ensayos emplearon 500, 250 y 100 µg/mL de terpeno.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos terpénicos

Compuesto	CMI (mg/mL)	
	ST30-t019	ST5-t311
(S)-Limoneno	5	15
(R)-Limoneno	15	20
(-)- <i>trans</i> -cariofileno	5	>20
(S)- <i>cis</i> -verbenol	20	7,5
Linalool	20	7,5
Espatulenol	>20	>20

4.2 Formación de biofilm en las cepas ST30-t019 y ST5-t311

Tanto el aislado ST30-t019 como ST5-t311 son capaces de formar biofilm. Como se observa en la figura 6, en el que se presentan los valores de absorbancia obtenidos a 570 nm, el aislado ST5-t311 presenta una mayor capacidad de formar biofilm en las condiciones ensayadas.

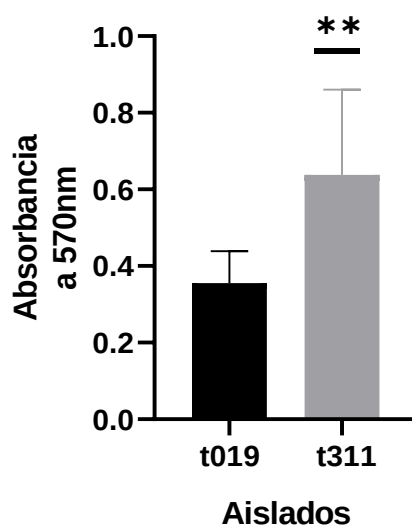


Figura 6. Capacidad de formación de biofilm de los aislados ST30-t019 y ST5-t311. Se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Prueba t de Student. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia

4.3 Efecto de terpenos sobre la formación de biofilm

El compuesto (*S*)-Limoneno indujo la formación de biofilm en el aislado ST30-t019 a 500 $\mu\text{g/mL}$. A las demás concentraciones no se observó un efecto significativo en la formación de biofilm en este aislado. Para el aislado ST5-t311, si bien se observa una reducción similar en la capacidad de formar biofilm a las tres concentraciones testadas, estas no resultan estadísticamente significativas respecto al control. El isómero (*R*)-Limoneno no afectó la formación de biofilm en ambos aislados a ninguna de las tres concentraciones (Figura 7).

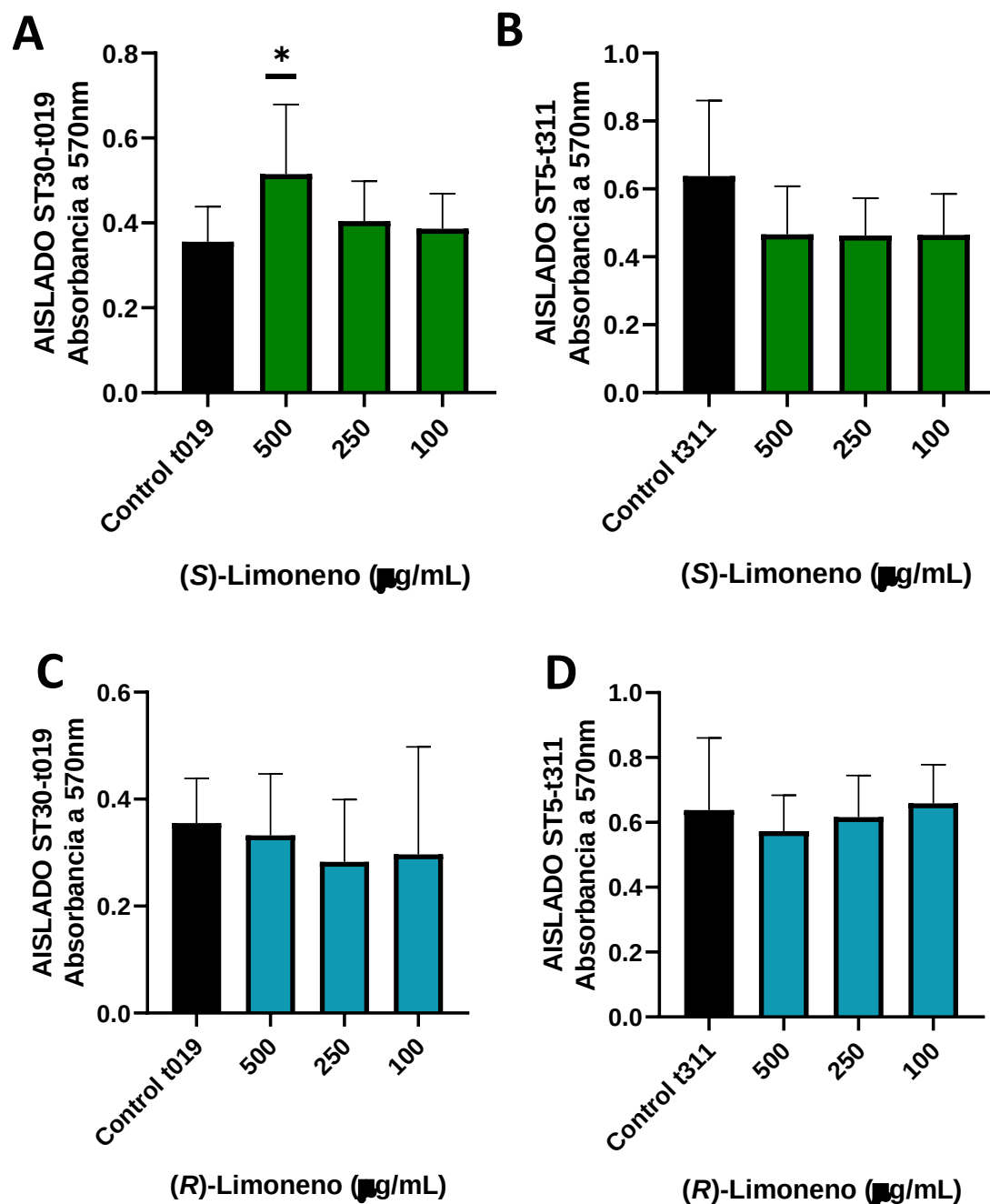


Figura 7. A. Efecto de (S)-Limoneno sobre la formación de biofilm en el aislado ST30-t019. B. Efecto de (S)-Limoneno sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. C. Efecto de (R)-Limoneno sobre la formación de biofilm en el aislado ST30-t019. D. Efecto de (R)-Limoneno sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia

Se observó un efecto de inducción en la formación de biofilm en ambos aislados con el compuesto (S)-*cis*-verbenol. Los mayores efectos se observaron a las concentraciones de 250 µg/mL para el aislado ST30-t019 y de 100 µg/mL para el aislado ST5-t311. En este último aislado, a las concentraciones de 500 µg/mL y 250 µg/mL no se observó efecto sobre la formación de biofilm (Figura 8).

En ambos aislados no se observó efecto significativo sobre el biofilm formado al utilizar los compuestos (-)-*trans*-cariofileno (Figura 9) y espatulenol (Figura 10), a ninguna de las tres concentraciones ensayadas.

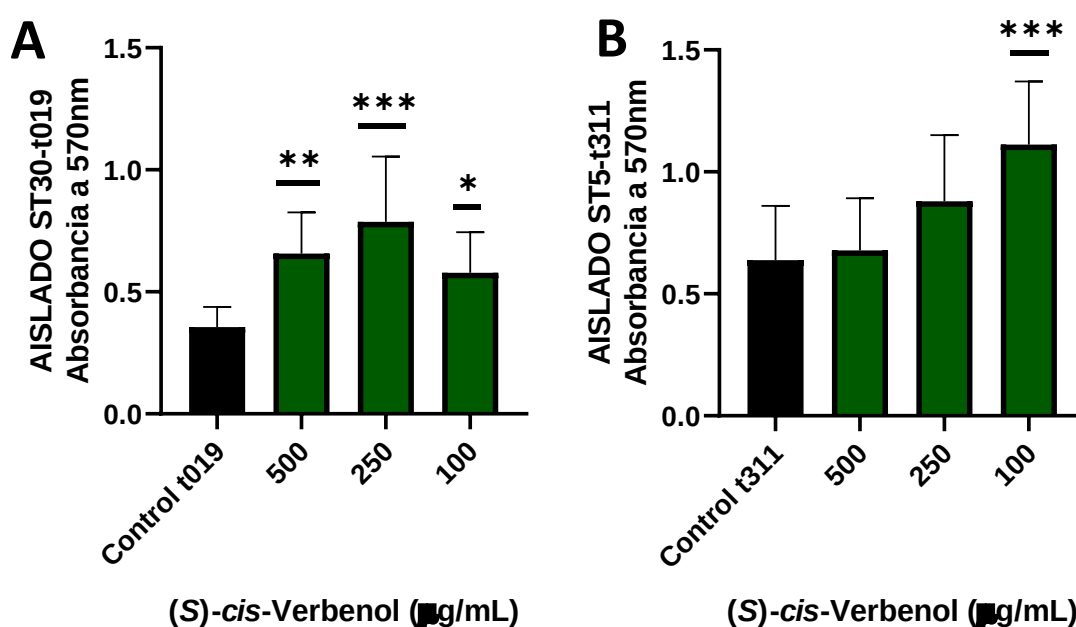


Figura 8. A. Efecto de (S)- *cis*-verbenol sobre la formación de biofilm en el aislado ST30-t019. B. Efecto de (S)- *cis*-verbenol sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$) y *** ($p<0,001$) indican significancia

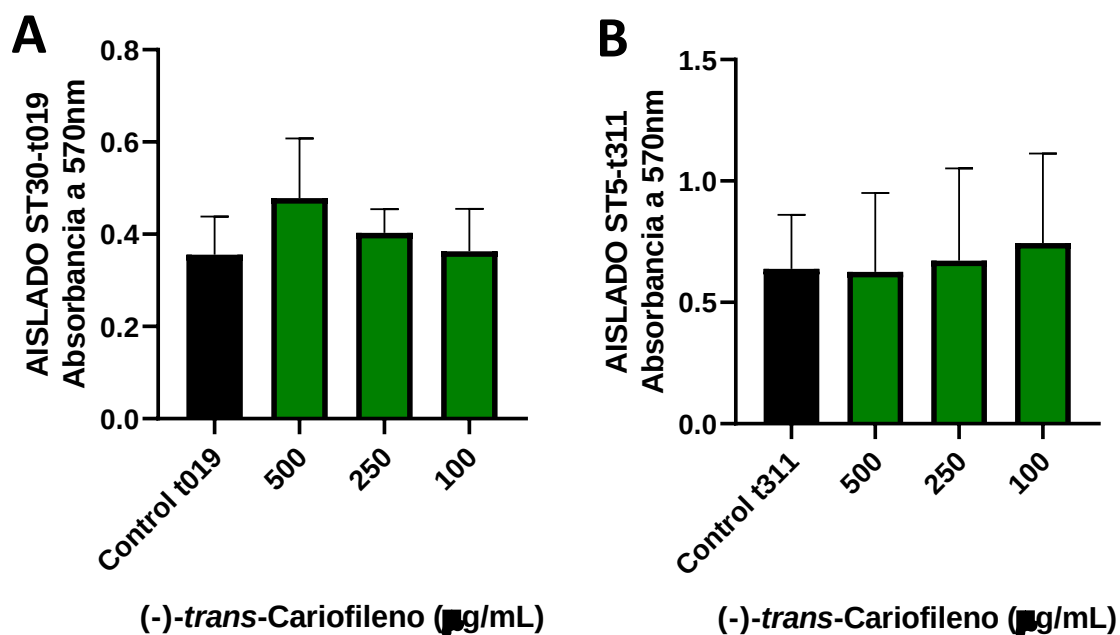


Figura 9. A. Efecto de (-)-*trans*-cariofileno sobre la formación de biofilm en el aislado ST30-t019. B. Efecto de (-)-*trans*-cariofileno sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett)

El Linalool incrementó significativamente la producción de biofilm en ambos aislados. La mayor capacidad inductora se observó a una concentración de 500 µg/mL con el aislado ST30-t019. Sin embargo, para el aislado ST5-t311 el mayor efecto fue registrado empleando la menor concentración (100 µg/mL), mientras que a 500 µg/mL no se observaron cambios en la formación del biofilm en este aislado (Figura 11)

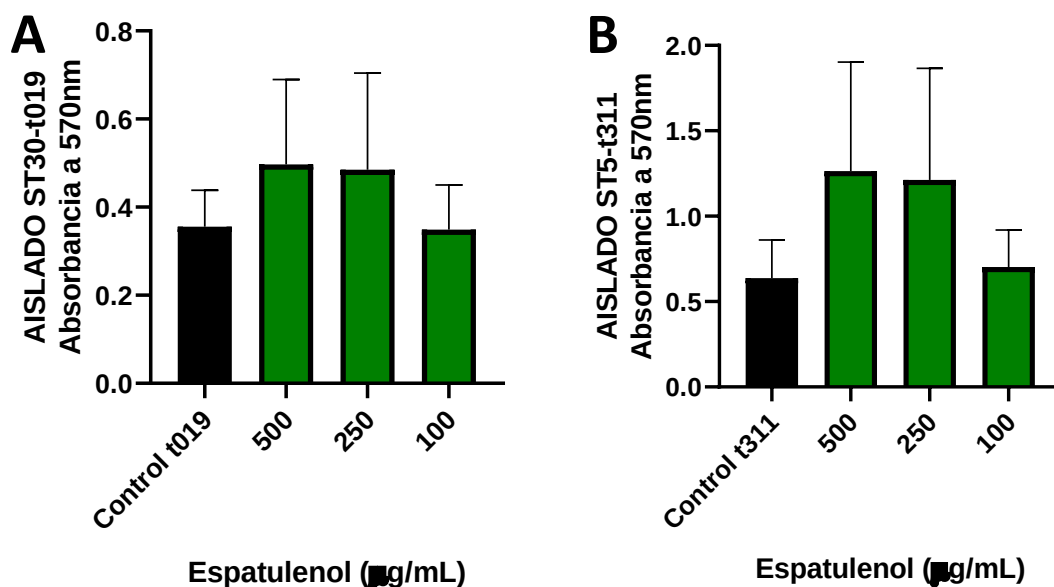


Figura 10. A. Efecto de espatulenol sobre la formación de biofilm en el aislado ST30-t019. B. Efecto de espatulenol sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett)

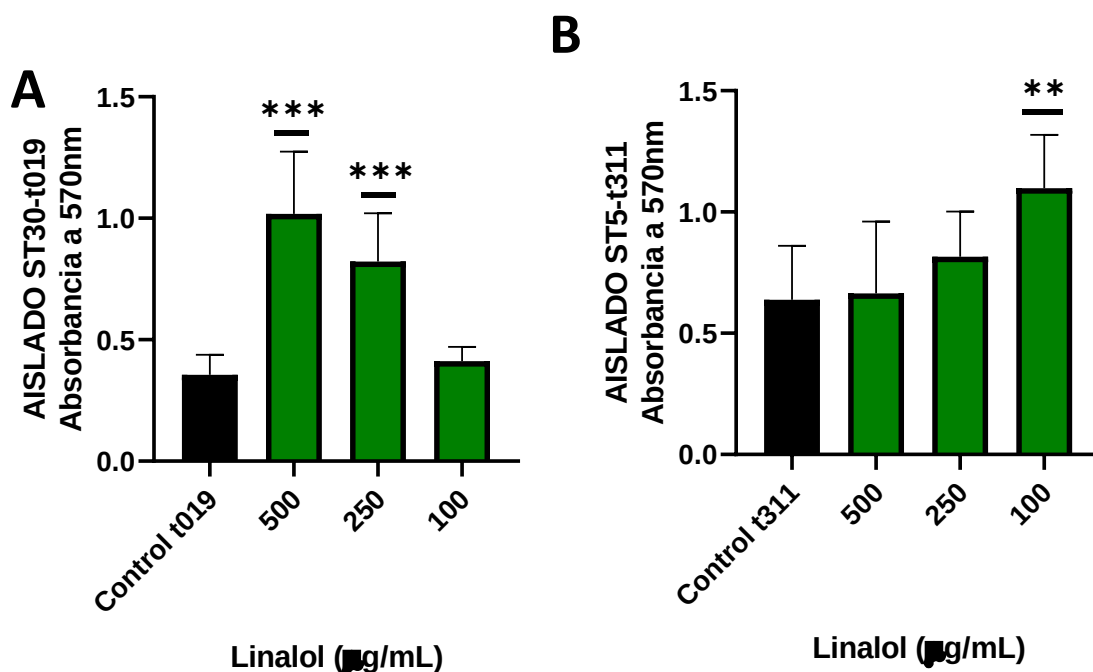


Figura 11. A. Efecto de linalool sobre la formación de biofilm en el aislado ST30-t019. B. Efecto de linalool sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia

4.4 Concentración Inhibitoria Mínima para combinaciones de compuestos sobre el aislado ST5-t311

El aislado ST5-t311 fue empleado en los ensayos para evaluar el efecto de combinaciones de terpenos sobre el crecimiento bacteriano y la capacidad de formar biofilm debido a que esta cepa formaba biofilm con mayor intensidad. Las combinaciones que involucraban al compuesto (–)-*trans*-cariofileno, tanto con Linalool como con (S)-(cis)-Verbenol, presentaron un efecto aditivo. Las combinaciones restantes no tuvieron efecto sobre los valores de CIM con respecto a los valores obtenidos con los compuestos individuales (Tabla 4)

Tabla 4 Concentraciones mínimas inhibitorias de las combinaciones de compuestos terpénicos

Compuestos	CIM (mg/mL)	FIC	Tipo de interacción
(S)-(–)- Limoneno / Linalool	10	2	Indiferente
(S)-(–)- Limoneno / (S)- <i>cis</i> -Verbenol	7,5	1,5	Indiferente
(R)-(+)-Limoneno / Linalool	10	1,8	Indiferente
(R)-(+)-Limoneno / (S)- <i>cis</i> -Verbenol	10	1,8	Indiferente
(–)- <i>trans</i> -cariofileno / Linalool	5	0,9	Aditiva
(–)- <i>trans</i> -cariofileno (S)- <i>cis</i> -Verbenol	5	0,9	Aditiva

4.5 Efecto de combinaciones de terpenos sobre la formación de biofilm del aislado ST5-t311

Todas las combinaciones de terpenos inhibieron la formación de biofilm. La combinación más efectiva resultó ser la que involucraba los compuestos Linalool y (–)-*trans*-cariofileno. El mayor efecto se observó a la concentración de 500 µg/mL para cada uno de los compuestos con una reducción de la formación de biofilm del 88% con respecto a la condición control. A 250 µg/mL se observó una reducción similar, y para la concentración de 100 µg/mL el efecto fue ligeramente menor en comparación a las concentraciones anteriores. La segunda combinación más efectiva también incluía al compuesto (–)-*trans*-cariofileno, esta vez en conjunto con el (S)-*cis*-Verbenol, que redujo la formación de biofilm en una proporción similar a la combinación anterior a las concentraciones de 500 y 250 µg/mL (86 y 87%,

respectivamente) y tuvo un efecto menor a la concentración de 100 µg/mL (65% de inhibición) (Figura 12. Tabla 5)

Una reducción similar en la capacidad de formar biofilm se obtuvo también para el compuesto Linalool en sus combinaciones con (*R*)-(+)-Limoneno, con un porcentaje de inhibición del 84% para las concentraciones de 500 y 250 µg/mL de cada uno de los compuestos, y con (*S*)-(-)-Limoneno, con una inhibición del 80% a las mismas concentraciones. A 100 µg/mL, ambas combinaciones redujeron la formación de biofilm en un 78% respecto al control.

Empleando el (*S*)-*cis*-Verbenol en sus combinaciones con los isómeros (*R*)-(+)-Limoneno y (*S*)-(-)-Limoneno se obtuvo el menor efecto de inhibición, siendo 57% el menor porcentaje registrado.

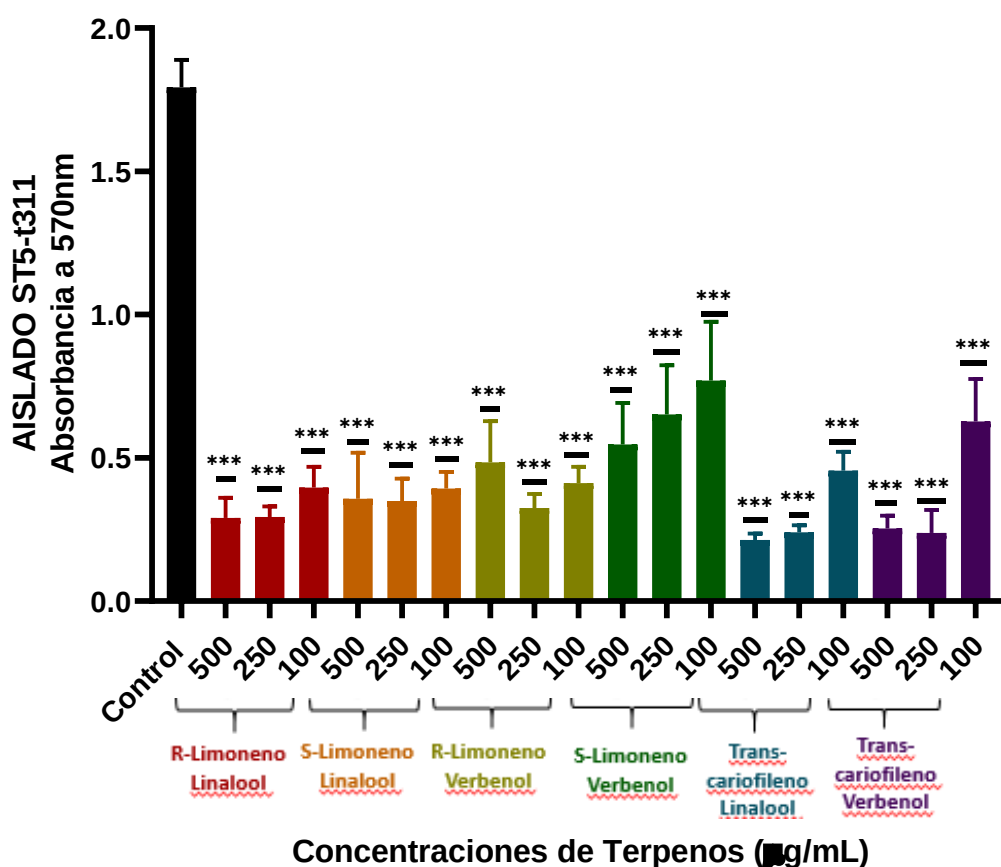


Figura 12. Efecto de combinaciones de terpenos sobre la formación de biofilm en el aislado ST5-t311. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett). * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia

Tabla 5. Porcentajes de inhibición de la formación de biofilm empleando combinaciones de terpenos

Compuestos	Concentración (µg/mL)	Porcentaje de inhibición	Efecto inhibitorio
(S)-(-)- Limoneno / Linalool	500	80,1	Elevado
	250	80,5	Elevado
	100	78,1	Elevado
(S)-(-)- Limoneno / (S)-cis-Verbenol	500	69,5	Bueno
	250	63,7	Bueno
	100	57,1	Bueno
(R)-(+)-Limoneno / Linalool	500	83,8	Elevado
	250	83,6	Elevado
	100	77,9	Elevado
(R)-(+)-Limoneno / (S)-cis-Verbenol	500	73,0	Elevado
	250	81,9	Elevado
	100	77,0	Elevado
(-)-trans-cariofileno / Linalool	500	88,1	Elevado
	250	86,6	Elevado
	100	74,6	Elevado
(-)-trans-cariofileno / (S)-cis-Verbenol	500	85,9	Elevado
	250	86,7	Elevado
	100	65,0	Bueno

4.6 Estandarización de la amplificación de genes asociados a formación de biofilm

Se logró la amplificación de los 7 genes bajo las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. La especificidad de amplificación se evaluó mediante la realización de curvas de fusión, que mostraron la ausencia de productos secundarios de amplificación. Los valores de Tm obtenidos experimentalmente corresponden a los valores calculados teóricamente. Los gráficos de las curvas de fusión obtenidos se incluyen en el anexo.

4.7 Efecto de terpenos sobre expresión de genes asociados a formación de biofilm

Para comprender el mecanismo a través del cual ocurre la inhibición, fue testada la expresión de 6 genes relacionados a la formación de biofilm en el aislado ST5-t311 cuando fue sometida a la combinación de los compuestos Linalool y (-)-trans-

cariofileno a una concentración de 500 µg/mL para cada uno. También fueron testados los compuestos individuales a la misma concentración. Los valores de Cq obtenidos así como de expresión relativa normalizada se incluyen en el anexo. La amplificación del gen de la girasa utilizada como gen de referencia fue uniforme entre las distintas condiciones, con un valor Ct promedio de 19,7 y una desviación estándar de 0,89.

4.7.1 Genes asociados a la adhesión

En el caso del gen *sdrD*, su expresión aumentó 2 veces en comparación a la condición control cuando el aislado fue tratada con el compuesto linalool. Sin embargo, se observó una disminución de 20 veces en su expresión cuando se utilizó sólo el compuesto (-)-trans-cariofileno o la combinación de ambos terpenos (Figura 20)

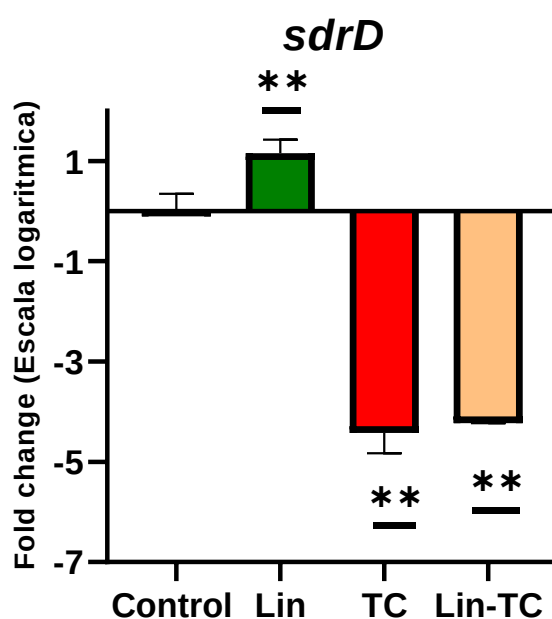


Figura 13. Efecto de los terpenos Linalool, (-)-trans-cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen *sdrD*. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia. Lin: Linalool. TC: (-)-trans-cariofileno.

Ambos compuestos testados de manera individual, así como su combinación, redujeron la expresión del gen *spa*. El linalool y (-)-*trans*-cariofileno empleados en conjunto disminuyeron su expresión en 500 veces, mientras que de manera individual la reducción fue de 26 y 469 veces, respectivamente (Figura 21)

4.7.2 Genes asociados a dispersión

Para el gen *hld*, el tratamiento con linalool redujo la expresión de este gen en 4 veces en comparación a la condición control. El compuesto (-)-*trans*-cariofileno y su combinación con linalool, tuvieron un mayor efecto disminuyendo en más de 900 veces la expresión del gen (Figura 22)

El compuesto linalool disminuyó en más de 4 veces la expresión del gen *agrA*. El (-)-*trans*-cariofileno redujo en 16 veces dicha expresión, mientras que con el empleo de la combinación de compuestos se observó una reducción de más de 40 veces con respecto al control (Figura 23)

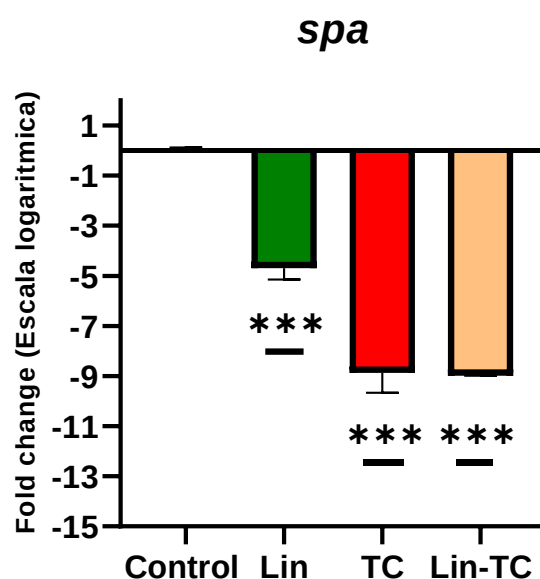


Figura 14. Efecto de los terpenos Linalool, (-)-*trans*-cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen *spa*. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia. Lin: Linalool. TC: (-)-*trans*-cariofileno.

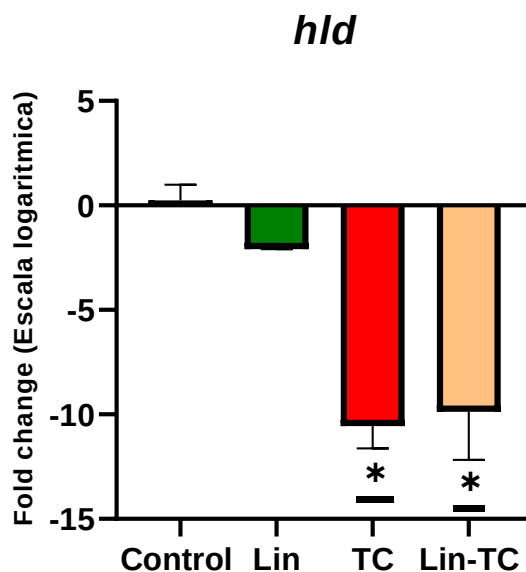


Figura 15. Efecto de los terpenos Linalool, (-)-*trans*-cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen *hld*. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia. Lin: Linalool. TC: (-)-*trans*-cariofileno.

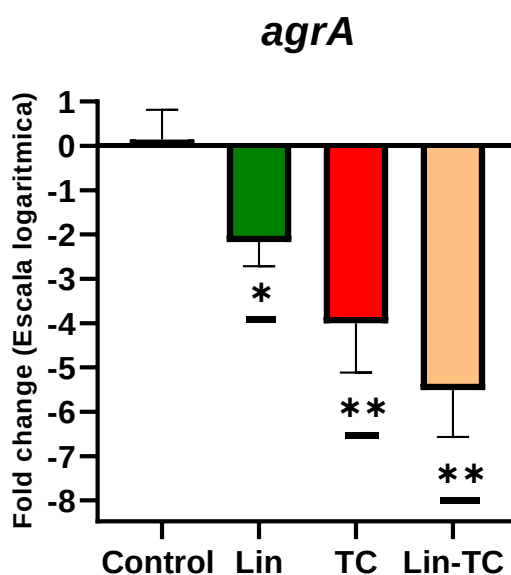


Figura 16. Efecto de los terpenos Linalool, (-)-*trans*-cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen *agrA*. En cada caso, se presenta el promedio de tres mediciones y la desviación estándar. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia. Lin: Linalool. TC: (-)-*trans*-cariofileno.

4.7.3 Genes asociados a la síntesis de polisacáridos capsulares

Todas las condiciones testadas incrementaron la expresión del gen *cap5B*. La combinación Linalool y (-)-*trans*-cariofileno incrementó su expresión en 1,2 veces con respecto al control, mientras que de manera individual la incrementaron en más de 3,5 y 2 veces, respectivamente (Figura 24)

La expresión del gen *cap5C* se incrementó en más de 10 veces luego del tratamiento del aislado con linalol, en más de 6 veces con el compuesto (-)-*trans*-cariofileno y en casi 3 veces empleando la combinación de ambos compuestos (Figura 25)

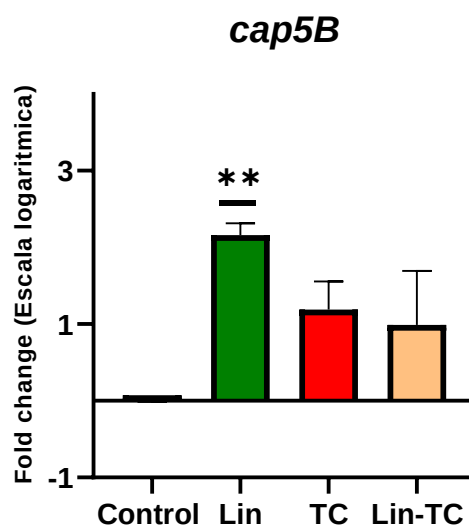


Figura 17. Efecto de los terpenos Linalool, (-)-*trans*-cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen *cap5B*. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia. Lin: Linalol. TC: (-)-*trans*-cariofileno.

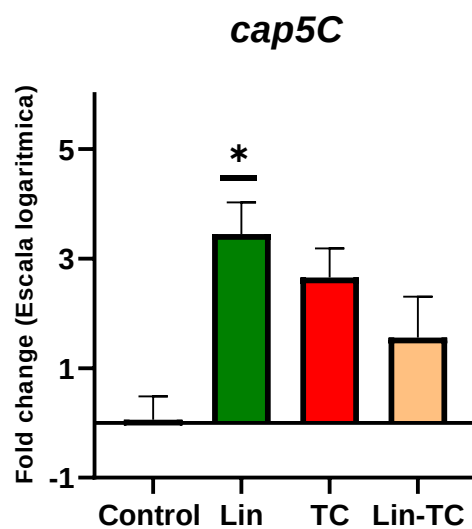


Figura 18. Efecto de los terpenos Linalool, (-)-*trans*-cariofileno y su combinación sobre la expresión del gen *cap5C*. Se compara el efecto de cada concentración con respecto al control (Anova de un factor, prueba post hoc de Dunnett) * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican significancia. Lin: Linalool. TC: (-)-*trans*-cariofileno.

5. DISCUSIÓN

5.1 Concentración Inhibitoria Mínima

Las CIM de los compuestos (S) y (R)-Limoneno, (S)-*cis*-Verbenol y Linalol para ambos aislados y del compuesto (-)-*trans*-cariofileno para el aislado ST30-t019 fueron determinadas dentro de un rango de entre 5 y 20 mg/mL. Las CIM para el compuesto espatulenol contra ambos aislados y el (-)-*trans*-cariofileno contra el aislado ST5-t311 sólo pudieron establecerse como superiores a 20 mg/mL, debido a los límites de solubilidad de los compuestos en el solvente utilizado. En base a los criterios establecidos por diversos autores, según los cuales un compuesto posee actividad antimicrobiana interesante sólo cuando la CIM obtenida es menor a 0,1 mg/mL, estos resultados señalan que los compuestos estudiados en este trabajo no poseen actividad antimicrobiana. Este hecho resulta positivo desde el punto de vista de la búsqueda de compuestos inhibidores de biofilm porque disminuye la probabilidad de desarrollo de fenómenos de resistencia (61,62).

El isómero (S)-(-)- Limoneno resultó más activo en la inhibición del crecimiento bacteriano en comparación al (R)-(+)-Limoneno en ambos aislados. Las diferencias de susceptibilidad para los estereoisómeros del Limoneno se señalaron previamente para la cepa ATCC 12600 de *S. aureus*, siendo también el (S)-(-)- Limoneno el más activo, con una CIM 3 veces menor a la del otro isómero. Estas diferencias entre isómeros también se describen para otras especies bacterianas como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *M. catarrhalis*. En otro trabajo realizado por Chalchat y colaboradores, se registraron CIM diferentes no sólo para los estereoisómeros del limoneno, con mayor actividad también para el (S)-(-)- Limoneno, sino además para los isómeros del α y β pineno frente a *S. aureus* y otros patógenos. Estos hallazgos permiten postular que la inhibición del crecimiento se daría a través de mecanismos estereoespecíficos (63,64).

El aislado más susceptible al (S)-(-)- Limoneno fue ST30-t019, con una CIM de 5 mg/mL; mientras que para el aislado ST5-t311 la CIM fue de 15 mg/mL. Van Vuuren y colaboradores obtuvieron un valor de CIM de 4 mg/mL para este isómero frente a *S. aureus*, el cual resulta cercano al valor obtenido con la primera cepa mencionada. Para el (R)-(+)-Limoneno el aislado ST30-t019 también resultó ser la más susceptible, con un valor de CIM de 15 mg/mL. Los autores mencionados anteriormente obtuvieron

una CIM de 13 mg/mL contra la cepa ATCC 12600 de *S. aureus* para este compuesto (63)

Para el (–)-*trans*-cariofileno, el menor valor de CIM obtenido (5 mg/mL) correspondió nuevamente al aislado ST30-t019. En un estudio realizado por Ríos y colaboradores, en el que se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Annona cherimola* y de sus componentes mayoritarios, se obtuvo una CIM de 8 mg/mL para el (–)-*trans*-cariofileno testado contra la cepa ATCC 25213 de *S. aureus* (65).

En el presente estudio el aislado ST5-t311, la más sensible al compuesto (*S*)-*cis*-Verbenol, presentó un valor de 7,5 mg/mL. En un trabajo realizado por Bobadilla y colaboradores en el año 2018 se obtuvo un valor de CIM de 8,6 mg/mL cuando fue testado el (*S*)-*cis*-Verbenol contra un aislado clínico de SARM. Además se demostró la capacidad del compuesto de establecer sinergia con los antibióticos gentamicina y amoxicilina (66).

Uno de los compuestos terpénicos con el que más se ha ensayado la actividad antimicrobiana es el Linalol. En el estudio realizado por Hada y colaboradores en el que se evaluó la actividad antimicrobiana de varios terpenos contra 34 aislados tanto sensibles como resistentes a meticilina, se obtuvo una CIM mayor a 1 mg/mL para el Linalol. En el trabajo realizado por Ríos y colaboradores también fue testado el compuesto Linalol, obteniéndose una CIM de 2 mg/mL tanto para *S. aureus* como para otras especies bacterianas como *E. coli*, *S. sonei* y *P. mirabilis*. Las diferencias con respecto a los valores obtenidos en este trabajo pueden obedecer a diversos factores como los referentes a la metodología utilizada, ya que se reportan valores mayores de CIM cuando es utilizada la resazurina para evaluar el crecimiento bacteriano. También las diferencias puede deberse a la variedad de aislados empleados en los diferentes ensayos (65,67).

Para el espatulenol se obtuvieron concentraciones inhibitorias mínimas de más de 20 mg/mL con ambos aislados. Estos valores difieren de los reportados por Fernandes y colaboradores en un trabajo publicado en 2015, donde registraron un valor de CIM mayor a 200 µg/mL (68).

Por lo general, los compuestos terpénicos oxigenados presentan una mayor actividad antimicrobiana, mientras que los terpenos con cadena hidrocarbonada exclusiva con frecuencia son menos activos. Si bien contra el aislado ST5-t311 los compuestos más activos fueron de tipo oxigenado, contrario a esto, para el aislado ST30-t019 los compuestos más activos resultaron el (S)-Limoneno y *trans*-cariofileno (compuestos hidrocarbonados). Sin embargo, se reconoce que este tipo de terpenos es el menos estudiado, por lo que la generalización enunciada podría tener excepciones como las evidenciadas en este trabajo. Cabe resaltar también la importancia de comparar la actividad de los terpenos bajo las mismas condiciones metodológicas, ya que se han demostrado importantes diferencias entre los métodos de difusión en disco, turbidimétricos y aquellos que emplean colorantes para evidenciar el crecimiento bacteriano. Se debe considerar además la relevancia de la variabilidad propia de cada cepa (61,69,70)

Ambos aislados demostraron distinta susceptibilidad frente a los diferentes terpenos testados. También se han obtenido estas diferencias entre varias cepas del mismo patógeno en un estudio realizado por Hada y colaboradores, en el que se registraron valores de CIM entre 512 y ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ para el sesquiterpeno (+)-nerolidol cuando fue testado contra un grupo de 20 aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina. Para este mismo grupo de aislados, el rango de CIM obtenido con el compuesto plaunotol fue de 16 a ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. En otro estudio realizado por Kępa y colaboradores con el compuesto fenólico ácido caféico se obtuvieron resultados similares en cuanto a diversidad en la susceptibilidad donde, con un grupo de 20 aislados clínicos de *S. aureus* y 3 cepas de referencia, se obtuvieron valores de CIM entre 256 y 1024 $\mu\text{g/mL}$. Este comportamiento es análogo al que se da con respecto a los antimicrobianos conocidos, donde aislados de la misma especie presentan diferente sensibilidad frente a los mismos, debido a la variabilidad genética propia de cada cepa. La mayor o menor susceptibilidad de las cepas frente a los terpenos testados brinda nuevas posibilidades de estudio, con el fin de dilucidar cuáles serían los mecanismos implicados en *S. aureus* (67,71)

También fue evaluada la acción en conjunto de los terpenos para evidenciar posibles interacciones sinérgicas. Varios estudios han testado interacciones entre terpenos fenólicos con otros del mismo tipo o con monoterpenos alcohólicos, sin embargo son

pocos los estudios que se centran en la evaluación de posibles efectos sinérgicos de terpenos oxigenados con aquellos hidrocarbonados. Para evaluar las posibles interacciones entre compuestos fue utilizado el índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC, *Fractional inhibitory concentration*) (57,70,72–74).

Las combinaciones del *trans*-cariofileno, tanto con el Linalol como con el (*S*)-*cis*-Verbenol, fueron consideradas como con efecto aditivo. Las demás combinaciones testadas fueron establecidas como indiferentes. Si bien se esperarían efectos antagonistas entre terpenos hidrocarbonados y oxigenados debido a diferencias en la solubilidad, es importante resaltar que se postulan varios mecanismos a través de los cuales pueden darse estas interacciones: inhibición secuencial de la misma vía metabólica, inhibición de enzimas protectoras o disrupción de la membrana por un compuesto facilitando la entrada del otro (70,75–77).

Los reportes presentados en este trabajo constituyen los primeros sobre los efectos de estas combinaciones de terpenos sobre la formación de biofilm en *S. aureus*. Si bien no han sido descritos los efectos de estas mismas combinaciones en otros estudios, sí se han evaluado los efectos de algunos de estos compuestos en combinación con otros diferentes a los aquí presentados. Se ha registrado por ejemplo que la adición de Linalol a ciertos aceites esenciales puede incrementar su potencial antimicrobiano. También se ha descrito una interacción sinérgica entre el limoneno y el 1,8-cineol contra *S. aureus*. Otra combinación que ha demostrado efecto sinérgico para este patógeno es geraniol/mentol. Interacciones de tipo aditivo se han registrado con las combinaciones timol/carvacrol y cinnamaldehído/eugenol (63,78–81)

5.2 Efecto de terpenos sobre la formación de biofilm

Ambos aislados testados en este estudio mostraron capacidad de formar biofilm según los resultados del ensayo en placa de poliestireno. Este hecho resulta alarmante dado que estas cepas son responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones pediátricas causadas por este patógeno en nuestro país. Si bien ambos aislados presentaron esta capacidad, el aislado ST5-t311 fue capaz de formar biofilm con mayor intensidad. Esta capacidad diferencial de formar biofilm entre diferentes clones fue evidenciada también por un estudio realizado por Espina y colaboradores en el año 2015, en el que cuatro clones distintos formaron biofilm con diferente intensidad y sin

correlación con el lugar de aislamiento ni la presencia o ausencia de resistencia a meticilina. En el trabajo citado también se registraron diferentes respuestas en cuanto a la inhibición de formación de biofilm en las cuatro cepas cuando eran expuestas a la acción de terpenos (32,82)

Se observó una inducción en la formación de biofilm del aislado ST30-t019 a una concentración de 500 µg/mL de (S)-(-)- Limoneno. Todas las demás concentraciones testadas de ambos isómeros en ambos aislados no produjeron efectos significativos sobre la producción de biofilm. En un trabajo realizado por Kim y colaboradores en el año 2015 también fue registrada una inducción en el biofilm formado por *P. aureginosa* cuando se enfrentó al Limoneno a una concentración de 0,1% (v/v), mientras que esta misma concentración no tuvo efecto sobre la formación de biofilm en *E. coli enterohemorrágica* (EHEC). Sin embargo, otros trabajos demuestran su potencial inhibidor de biofilm, como el realizado por Espina y colaboradores, en el cual este compuesto fue capaz de inhibir la formación de biofilm de cuatro clones diferentes de *S. aureus* entre un 12 y 78%; o el llevado a cabo por Subramenium y colaboradores, en el que el limoneno fue capaz de inhibir la formación de biofilm entre un 75 y 95% en tres especies del género *Streptococcus* (*pyogenes*, *mutans* y *mitis*) a una concentración de 400 µg/mL. Se postula que este efecto podría deberse a su capacidad para inhibir la adhesión inicial a superficies. También fue capaz de inhibir la formación de biofilm de *C. albicans* de una manera dependiente de la dosis y del estadio del biofilm. El análisis proteómico en este hongo sugiere que sus efectos podrían deberse a la inducción de un daño en la pared celular (82–85)

El compuesto (-)-*trans*-cariofileno no afectó significativamente la producción de biofilm en ambas cepas. En otros estudios se ha demostrado la capacidad de este compuesto para inhibir la formación de biofilm en *S. mutans* y *P. intermedia* (86,87)

El Linalol incrementó significativamente la formación de biofilm en ambos aislados. Se han observado efectos diversos de este compuesto contra el biofilm formado por varias especies bacterianas. El Linalol fue capaz de eliminar la formación de biofilm cuando fue utilizado a una concentración de 3% (v/v) contra *S. flexneri*. También redujo la formación de biofilm de *L. monocytogenes* en más del 50% a 0,5% (v/v) e inhibió la formación de biofilm y eliminó el biofilm ya formado por *Acinetobacter*

baumannii, afectando capacidad de adhesión y el sistema *quorum sensing*. Sin embargo, no afectó significativamente el biofilm formado por *P. aeruginosa* y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (83,88–90)

Los datos obtenidos en este trabajo para los compuestos (*S*)-*cis*-Verbenol y espatulenol constituyen los primeros reportes de sus efectos sobre la formación de biofilm tanto en *S. aureus* como en otras especies bacterianas.

En términos generales ninguno de los compuestos fue capaz de inhibir la formación de biofilm a ninguna de las concentraciones testadas, observándose incluso un efecto inductor a determinadas dosis. Este efecto inductor ha sido observado también al emplear aceites esenciales de hierbabuena, salvia y orégano en concentraciones inferiores a la CIM contra *S. aureus*. Aceites esenciales de pimienta negra y mastranzo registraron actividad antibiofilm a una concentración de 1% (v/v), sin embargo al reducir gradualmente esta concentración se pierden los efectos inhibidores e incluso se induce la formación de biofilm. Papa y colaboradores sugieren, en base a estos hallazgos, utilizar a los aceites esenciales con actividad anti-biofilm en condiciones en las que no se reduzca su concentración tales como en la desinfección de superficies o en la aplicación tópica sobre piel o mucosas de seres humanos o animales, ya que su dilución podría provocar el efecto opuesto (91–93).

La actividad inductora de estos compuestos podría ser aprovechada en ciertos modelos en los que es deseable la formación de biofilm, como en reactores biológicos para la producción de compuestos de importancia económica o para el tratamiento de aguas o desechos industriales. En este último caso, podrían aplicarse para inducir la formación de biofilm en organismos que no poseen esta capacidad pero que poseen excelentes propiedades de biodegradación, y de esta manera facilitar la separación bacteriana del efluente tratado, siempre realizando los ensayos necesarios para determinar las concentraciones óptimas a ser utilizadas según el microorganismo, dados los efectos variables observados (94,95)

Los aceites esenciales constituyen la mezcla de más de 20 compuestos distintos, por lo que cabe esperar que sus efectos puedan deberse no sólo a un componente en particular si no a la interacción de varios de ellos. Por ejemplo, el aceite esencial de pomelo resultó más efectivo que su componente mayoritario (Limoneno) para inhibir

la formación de biofilm de *P. aureginosa*. De manera a evaluar posibles interacciones sinérgicas sobre la formación de biofilm de los compuestos incluidos en este trabajo, fueron testadas las mismas combinaciones previamente evaluadas en el ensayo de concentración mínima inhibitoria. Todas las combinaciones fueron capaces de inhibir la formación de biofilm en un porcentaje superior al 50%, siendo la más efectiva la combinación (-)-*trans*-cariofileno/Linalol con un porcentaje de inhibición del 88% a 500 µg/mL. Esta combinación ya ha demostrado su eficacia para inhibir la formación de biofilm en *C. albicans* a una concentración de 0,005% (v/v) para cada compuesto (96,97)

Estos compuestos también han sido testados en otras combinaciones. El (-)-*trans*-cariofileno redujo en un porcentaje menor a 30% la formación de biofilm en *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* a una concentración de 117 y 133 µg/mL, respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de inhibición superaron 50% cuando fue utilizado en combinación con cinamaldehído o eugenol en una proporción 1:1 con respecto a sus MIC. Por otra parte, el Linalol actuó sinérgicamente con el α -longipineno para reducir la formación de biofilm en *C. albicans*. También se ha descrito la capacidad del Linalol de inhibir el biofilm formado por *S. flexneri* cuando fue combinado con el citral y el timol. Los mecanismos a través de los cuáles se origina este efecto sinérgico podrían ser similares a los ya descritos para la inhibición del crecimiento, siendo la facilitación del ingreso de uno de los compuestos gracias a la acción del segundo, uno de los mecanismos más probables (88,97,98).

5.3 Efecto de terpenos sobre expresión de genes asociados a formación de biofilm

El estudio de expresión génica incluyó a 6 genes que fueron analizados en presencia de Linalol y (-)-*trans*-cariofileno de manera individual, a una concentración de 500 µg/mL; y también en presencia de la combinación de ambos compuestos en una proporción 1:1 a la misma concentración.

El compuesto Linalol aumentó la expresión del gen *sdrD*, mientras que el (-)-*trans*-cariofileno y la combinación de compuestos redujeron su expresión. Se ha demostrado que este gen media la adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales nasales humanas y otras células mediante su unión a la glicoproteína desmogleína 1. Considerando que

este gen codifica una proteína que participa en la etapa de adhesión inicial a superficies o a la matriz extracelular de las células del huésped, su sobreexpresión concuerda con lo observado en el ensayo de inhibición de biofilm dado el potencial inductor demostrado por el compuesto Linalol. Ya que el (-)-*trans*-cariofileno pudo reducir de manera individual la expresión del gen puede atribuirse principalmente a este compuesto el efecto supresor sobre este gen; sin embargo, esta reducción no fue suficiente para afectar la formación de biofilm del aislado. Recién cuando fue combinado con el linalol fue afectada la capacidad de formar biofilm. En un trabajo realizado por Kong y colaboradores en el 2018 se evaluó el efecto de un derivado de benzimidazol sobre la formación de biofilm y sobre la expresión de genes asociados en *S. aureus*, observando un potencial inhibidor y una disminución de la expresión principalmente en genes asociados a la etapa de adhesión, entre ellos genes *sdr*. La capacidad de reducir la expresión de este gen es una característica importante, ya que se ha demostrado su participación en la evasión de la acción del sistema inmune innato, contribuyendo así a aumentar la supervivencia del patógeno en sangre y tejidos durante las infecciones (40,46,99)

Las tres condiciones testadas fueron capaces de reducir la expresión del gen *spa*, siendo la combinación la que produjo una reducción mayor, seguida del (-)-*trans*-cariofileno, y por último del Linalol. La proteína A, codificada por este gen, participa también en la evasión de la respuesta inmune del huésped mediante la unión a la región Fc de la inmunoglobulina IgG. Su rol en el biofilm ha sido demostrado empleando cepas mutantes carentes de este gen, que redujeron significativamente su capacidad de formar biofilm. Se presume que cumple un papel en la adhesión inicial; sin embargo su mecanismo de participación no ha sido completamente dilucidado (40,100).

El sistema de quorum sensing *agr* controla la expresión de alrededor de 200 factores de virulencia a través de la producción del denominado péptido autoinducido (AIP). También cumple un rol fundamental en la etapa de dispersión de biofilm; su expresión es necesaria para la liberación de las células bacterianas permitiendo así la infección de nuevos tejidos. Por lo tanto, en etapas tempranas debe encontrarse suprimida dicha expresión hasta alcanzar la maduración del biofilm formado. Los principales efectores de este sistema *agr* sobre la estructura del biofilm son las modulinas solubles en fenol (PSM, *phenol-soluble modulin*). Estos péptidos poseen una estructura anfipática y

tienen una acción surfactante, responsable de la generación de canales y la liberación de células del biofilm. Una de las modulinas más importantes de este grupo es la δ -hemolisina, codificada por el gen *hld*. Dada la implicancia directa que tiene la sobreexpresión de este sistema en la inhibición de la formación de biofilm, podría constituir un blanco para la acción de nuevos compuestos anti-biofilm. Sin embargo en este trabajo, tanto la expresión del gen *agrA* como del gen *hld* se vieron reducidas tras el tratamiento con los compuestos tanto de manera individual como en combinación. Para el gen *agrA* se observó una mayor reducción de la expresión del gen al emplear la combinación de compuestos. Sin embargo, para el gen *hld* el compuesto (-)-*trans*-cariofileno presentó el mayor efecto, incluso superior al de la combinación, por lo que puede atribuirse principalmente a este compuesto la acción sobre este gen y un cierto efecto antagónico al Linalol. Si bien, se esperaría un incremento en la expresión de estos genes, al menos al emplear la combinación de compuestos dada la inhibición del biofilm observada, este resultado podría indicar que la afectación del sistema *agr* no sería el mecanismo implicado en el efecto de esta combinación de compuestos. Más bien, la reducción en la expresión de estos genes podría indicar una acción compensatoria dada la reducción de la capacidad de formar biofilm a través de otro mecanismo. Esta disminución de la formación de biofilm sin afectar el sistema *quorum sensing agr* podría ser una cualidad extremadamente deseable, ya que su inducción podría ocasionar el incremento en la producción de toxinas tales como las hemolisinas o la leucocidina de Pantón-Valentine. Otra posibilidad sería que el efecto de la combinación se deba a un bloqueo del paso desde etapas tempranas del biofilm hacia la maduración del mismo, minimizando así su dispersión (44,101–105)

El locus *cap5* está implicado en la producción de polisacáridos capsulares, que son componentes de la pared celular que protegen a la bacteria contra la fagocitosis y que aumentan la virulencia del patógeno. Sin embargo, también pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos facilitando su eliminación. En este trabajo, todas las condiciones testadas indujeron la expresión de los genes *cap5B* y *cap5C*. El efecto fue mayor para el compuesto Linalol, seguido del (-)-*trans*-cariofileno, mientras que para la combinación de compuestos, si bien se observó también un incremento en la expresión, el efecto fue menor. Salimena y colaboradores han observado una

correlación negativa entre la producción de polisacáridos capsulares y la intensidad del biofilm formado. Sin embargo estos resultados parecen contrarios a los obtenidos en este trabajo, en donde la combinación de compuestos, que inhibió de manera más efectiva el biofilm, fue la que presentó los niveles de expresión más bajos en comparación a los de los compuestos individuales. Sin embargo, es importante mencionar que el estudio realizado por Salimena evaluó la producción de los polisacáridos mientras que en este trabajo sólo fueron medidos los niveles de expresión de algunos genes relacionados, que podrían no traducirse en la misma intensidad de producción. Es importante considerar el efecto de estos compuestos sobre estos genes ya que una disminución de la expresión de polisacáridos capsulares está asociada a la persistencia de las infecciones (106,107)

En base a los perfiles de expresión génica observados se podría postular que la combinación de compuestos Linalol/(-)-*trans*-cariofileno inhibe la formación de biofilm a través de la supresión de la expresión de proteínas asociadas a la etapa de adhesión, y que podría originarse una respuesta compensatoria del sistema *agr* para contrarrestar este efecto inhibitorio. Por tanto, dada la complejidad del fenómeno de formación de biofilm es de nuestro interés en un futuro próximo investigar el perfil de expresión de otros genes también implicados en este proceso para tener aproximaciones más finas respecto al mecanismo de acción.

Este trabajo presenta datos valiosos sobre el efecto de terpenos, tanto en forma individual como en combinaciones, en la formación de biofilm por *S. aureus*; permitiendo ofrecer soluciones frente a las dificultades que implica el tratamiento de los biofilms bacterianos.

6. CONCLUSIÓN

Las combinaciones de terpenos inhibieron la formación de biofilm en ambos clones SARM analizados, siendo la combinación (-)-*trans*-cariofileno/Linalol la más efectiva. Mientras que no se observó efecto inhibitorio en compuestos individuales. Tanto las combinaciones como los compuestos individuales no afectaron el crecimiento bacteriano.

La combinación (-)-*trans*-cariofileno/Linalol disminuyó los niveles de expresión tanto de los genes *sdrD* y *spa*, implicados en la etapa de adhesión, como de los genes *agrA* y *hld*, asociados al sistema de *quorum sensing*; mientras que indujo la expresión de los genes *cap5B* y *cap5C*, que participan en la síntesis de polisacáridos capsulares.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):603–61.
2. Gnanamani A, Hariharan P, Paul-Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. Front. 2017
3. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005 Dec 1;5(12):751–62.
4. Otto M. Staphylococci in the human microbiome: the role of host and interbacterial interactions. Curr Opin Microbiol. 2020 Feb 1;53:71–7.
5. Sakr A, Brégeon F, Mège J-L, Rolain J-M, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. Front Microbiol. 2018 Oct 8;9:2419–2419.
6. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins. 2018 Jun 19;10(6):252.
7. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003;111(9):1265–73.
8. Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2004 Sep 24;279(39):40802–6.
9. Kale P, Dhawan B. The changing face of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Vol. 34, Indian Journal of Medical Microbiology. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2016. p. 275–85.
10. D'Agata EMC, Webb GF, Horn MA, Moellering RC Jr, Ruan S. Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Feb 1;48(3):274–84.
11. Henderson A, Nimmo GR. Control of healthcare- and community-associated MRSA: recent progress and persisting challenges. Br Med Bull. 2018 Mar 1;125(1):25–41.
12. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2018 Sep 12;31(4):e00020-18.
13. Barcudi D, Sosa EJ, Lamberghini R, Garnerio A, Tosoroni D, Decca L, et al. MRSA dynamic circulation between the community and the hospital setting: New insights from a cohort study. J Infect. 2020 Jan 1;80(1):24–37.

14. Anjum MF, Marco-Jimenez F, Duncan D, Marín C, Smith RP, Evans SJ. Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK. *Front Microbiol.* 2019;10:2136.
15. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2000;6(3):189–98.
16. Saunders NA, Holmes A. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2007;391:71–85.
17. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):792–9.
18. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, et al. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, spa Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3095–100.
19. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol Pol Tow Mikrobiol Pol Soc Microbiol.* 2011;60(2):95–103.
20. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis S-O, Narechania A, Reyes J, Xing G, et al. Parallel Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Infection in North and South America. *J Infect Dis.* 2015 Dec 15;212(12):1874–82.
21. Zurita J, Barba P, Ortega-Paredes D, Mora M, Rivadeneira S. Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *Braz J Infect Dis.* 2016;20:525–33.
22. Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2013 Mar;14:401–5.
23. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnerio A, Kevric I, et al. Spread of Epidemic MRSA-ST5-IV Clone Encoding PVL as a Major Cause of Community Onset Staphylococcal Infections in Argentinean Children. *PLOS ONE.* 2012;7(1):e30487.
24. Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2014;304(8):1086–99.
25. Pardo L, Machado V, Mollerach M, Mota MI, Tuchscher LPN, Gadea P, et al. Characteristics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

- (CA-MRSA) Strains Isolated from Skin and Soft-Tissue Infections in Uruguay. *Int J Microbiol*. 2009;2009.
26. Fernandez S, Ledo C, Lattar S, Noto Llana M, Bertelli AM, Di Gregorio S, et al. High virulence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019, the dominant community-associated clone in Argentina. *Int J Med Microbiol*. 2017 Jun 1;307(4):191–9.
 27. Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, et al. Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jun;11(6):973–6.
 28. Chua KYL, Seemann T, Harrison PF, Monagle S, Korman TM, Johnson PDR, et al. The Dominant Australian Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone ST93-IV [2B] Is Highly Virulent and Genetically Distinct. *PLOS ONE*. 2011 Oct 3;6(10):e25887.
 29. Errecalde L, Ceriana P, Galletti P, Erbín M, Duarte A, Rolón MJ, et al. First isolation in Argentina of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate susceptibility to vancomycin and nonsusceptibility to daptomycin. 2013;45(2):99–103.
 30. Sanchez JD, <https://www.facebook.com/pahowho>. OPS/OMS | Plataforma de Análisis de ReLAVRA [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2019.
 31. Mayor L, Ortellado J, Menacho C, Lird G, Courtier C, Gardon C, et al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected in Asunción, Paraguay. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2298–300.
 32. Fátima Rodríguez, Claudia Salinas, Silvina Fernandez, Sol Haim, Marta Mollerach, Wilma Basualdo, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones from Paraguayan children. *J Infect Dev Ctries*. 2020;14(03).
 33. Salinas C, Escobar F, Rodríguez F, Campuzano de Rolón A, Almada P, Ortellado-Canese J, et al. Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina que infectaron a niños paraguayos. *Pediatría Asunción*. 2017;44:233–8.
 34. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:178.
 35. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Apr;47(4):1251–6.
 36. Ma H, Bryers JD. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012/06/06 ed. 2013 Jan;97(1):317–28.

37. Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol.* 2017 May;104(3):365–76.
38. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Jan;12(1):49–62.
39. Moormeier DE, Endres JL, Mann EE, Sadykov MR, Horswill AR, Rice KC, et al. Use of microfluidic technology to analyze gene expression during *Staphylococcus aureus* biofilm formation reveals distinct physiological niches. *Appl Environ Microbiol.* 2013/03/22 ed. 2013 Jun;79(11):3413–24.
40. Paharik AE, Horswill AR. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr.* 2016 Apr;4(2).
41. Barbu EM, Mackenzie C, Foster TJ, Höök M. SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. *Mol Microbiol.* 2014 Oct;94(1):172–85.
42. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2009 Feb;191(3):832–43.
43. Reffuveille F, Josse J, Vallé Q, Gangloff CM and SC. *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field. *Rise Virulence Antibiot Resist.* 2017
44. Periasamy S, Joo H-S, Duong AC, Bach T-HL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012/01/09 ed. 2012 Jan 24;109(4):1281–6.
45. Kirmusaoğlu S. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. *Microb Biofilms - Importance Appl.* 2016 Jul 13 [cited 2021 Feb 15];
46. Kong C, Chee C-F, Richter K, Thomas N, Rahman NA, Nathan S. Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Sci Rep.* 2018 Feb 9;8(1):2758.
47. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem.* 2019 Nov 28;7.
48. Belanger CR, Mansour SC, Pletzer D, Hancock REW. Alternative strategies for the study and treatment of clinical bacterial biofilms. Walker D, editor. *Emerg Top Life Sci.* 2017 Apr 7;1(1):41–53.
49. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin Med.* 2019 Mar 20;14(1):11.
50. Yong YY, Dykes GA, Choo WS. Biofilm formation by staphylococci in health-related environments and recent reports on their control using natural compounds. *Crit Rev Microbiol.* 2019 Mar;45(2):201–22.

51. Gomes F, Martins N, Ferreira ICFR, Henriques M. Anti-biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Heliyon*. 2019 May 1;5(5):e01728.
52. Gandhi AD, Vizhi DK, Lavanya K, Kalpana VN, Devi Rajeswari V, Babujanarthanam R. In vitro anti- biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Rep*. 2017 Dec 1;12:193–7.
53. Erasto P, Viljoen AM. Limonene - a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Nat Prod Commun*. 2008 Jul 1;3(7):1934578X0800300728.
54. Choi I-Y, Lim JH, Hwang S, Lee J-C, Cho G-S, Kim W-K. Anti-ischemic and anti-inflammatory activity of (S)-*cis*-verbenol. *Free Radic Res*. 2010 May;44(5):541–51.
55. do Nascimento KF, Moreira FMF, Alencar Santos J, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *J Ethnopharmacol*. 2018 Jan 10;210:351–8.
56. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods San Diego Calif*. 2007 Aug;42(4):321–4.
57. Bassolé IHN, Lamien-Meda A, Bayala B, Tirogo S, Franz C, Novak J, et al. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules*. 2010 Nov 3;15(11):7825–39.
58. Qin N, Tan X, Jiao Y, Liu L, Zhao W, Yang S, et al. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci Rep*. 2014 Jun 27;4.
59. Yuyama KT, Wendt L, Surup F, Kretz R, Chepkirui C, Wittstein K, et al. Cytochalasins Act as Inhibitors of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. *Biomolecules*. 2018;8(4).
60. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
61. Eloff JN. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complement Altern Med*. 2019 May 22;19(1):106–106.
62. Ren D, Zuo R, González Barrios AF, Bedzyk LA, Eldridge GR, Pasmore ME, et al. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jul;71(7):4022–34.
63. Van vuuren S, Viljoen A. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr J*. 2007 Nov 1;22:540–4.

64. Chalchat JC, Chiron F, Garry RPh, Lacoste J, Sautou V. Photochemical Hydroperoxidation of Terpenes. Antimicrobial Activity of α -Pinene, β -Pinene and Limonene Hydroperoxides. *J Essent Oil Res.* 2000 Jan 1;12(1):125–34.
65. Ríos MY, Castrejón F, Robledo N, León I, Rojas G, Navarro V. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). *Rev Soc Quím México.* 2003 Jun;47(2):139–42.
66. Bobadilla D, Flores-Giubi ME, Alvarenga N. Synergistic effect of (S)-cis-verbenol with the antibiotics amoxicillin and gentamicin against sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Int J Pharm Sci & Res.* 2019;5:2182–8.
67. Hada T, Shiraishi A, Furuse S, Inoue Y, Hamashima H, Matsumoto Y, et al. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Nat Med.* 2003 Apr 20;57(2):64–7.
68. Fernandes FH, da R. Guterres Z, Violante IMP, Lopes TFS, Garcez WS, Garcez FR. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicol Rep.* 2015 Jan 1;2:1482–8.
69. Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Mol Basel Switz.* 2014 Nov 3;19(11):17773–98.
70. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules.* 2012 Apr 2;17(4):3989–4006.
71. Kępa M, Mikłasińska-Majdanik M, Wojtyczka RD, Idzik D, Korzeniowski K, Smoleń-Dzirba J, et al. Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *BioMed Res Int.* 2018 Jul 15;2018.
72. Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* 2006 Jun 1;77(4):279–85.
73. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol.* 2008 May 10;124(1):91–7.
74. Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, Vágvölgyi C, et al. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol.* 2011 Jan 5;144(3):480–6.
75. Goñi P, López P, Sánchez C, Gómez-Lus R, Becerril R, Nerín C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 2009 Oct 15;116(4):982–9.
76. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001;91(3):492–7.

77. Pei R-S, Zhou F, Ji B-P, Xu J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *J Food Sci.* 2009 Sep;74(7):M379-383.
78. Herman A, Tambor K, Herman A. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Curr Microbiol.* 2016 Feb 1;72(2):165–72.
79. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J.* 2009 Nov 1;24(6):348–54.
80. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001 Sep 12;91(3):453–62.
81. Moleyar V, Narasimham P. Antibacterial activity of essential oil components. *Int J Food Microbiol.* 1992 Aug 1;16(4):337–42.
82. Espina L, Pagán R, López D, García-Gonzalo D. Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Basel Switz.* 2015 Jun 19;20(6):11357–72.
83. Kim Y-G, Lee J-H, Kim S-I, Baek K-H, Lee J. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol.* 2015 Feb 16;195:30–9.
84. Subramenium GA, Vijayakumar K, Pandian SK. Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors. *J Med Microbiol.* 2015 Aug;64(8):879–90.
85. Thakre A, Zore G, Kodgire S, Kazi R, Mulange S, Patil R, et al. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Med Mycol.* 2018 Jul 1;56(5):565–78.
86. Yoo H-J, Jwa S-K. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch Oral Biol.* 2018 Apr;88:42–6.
87. Ramak P, Talei GR. Chemical composition, cytotoxic effect and antimicrobial activity of *Stachys koelzii* Rech.f. essential oil against periodontal pathogen *Prevotella intermedia*. *Microb Pathog.* 2018 Nov 1;124:272–8.
88. Ngome MT, Alves JGLF, de Oliveira ACF, da Silva Machado P, Mondragón-Bernal OL, Piccoli RH. Linalool, citral, eugenol and thymol: control of planktonic and sessile cells of *Shigella flexneri*. *AMB Express.* 2018 Jun 25;8(1):105.
89. Gao Z, Van Nostrand JD, Zhou J, Zhong W, Chen K, Guo J. Anti-listeria Activities of Linalool and Its Mechanism Revealed by Comparative Transcriptome Analysis. *Front Microbiol.* 2019;10.
90. Alves S, Duarte A, Sousa S, Domingues FC. Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling.* 2016 Feb 7;32(2):155–65.

91. Vetas D, Dimitropoulou E, Mitropoulou G, Kourkoutas Y, Giaouris E. Disinfection efficiencies of sage and spearmint essential oils against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus* cells in comparison with sodium hypochlorite. *Int J Food Microbiol*. 2017 Sep 18;257:19–25.
92. dos Santos Rodrigues JB, de Carvalho RJ, de Souza NT, de Sousa Oliveira K, Franco OL, Schaffner D, et al. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*. 2017 Mar 1;73:1237–46.
93. Papa R, Garzoli S, Vrenna G, Sabatino M, Sapienza F, Relucenti M, et al. Essential Oils Biofilm Modulation Activity, Chemical and Machine Learning Analysis—Application on *Staphylococcus aureus* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan;21(23):9258.
94. Qureshi N, Annous BA, Ezeji TC, Karcher P, Maddox IS. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microb Cell Factories*. 2005 Aug 25;4(1):24.
95. Abdelfattah A, Hossain MI, Cheng L. High-strength wastewater treatment using microbial biofilm reactor: a critical review. *World J Microbiol Biotechnol*. 2020 May 10;36(5):75.
96. Luciardi MC, Blázquez MA, Alberto MR, Cartagena E, Arena ME. Grapefruit essential oils inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Sci Technol Int*. 2019 Nov 5;26(3):231–41.
97. Manoharan RK, Lee J-H, Kim Y-G, Kim S-I, Lee J. Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. *Biofouling*. 2017 Feb 7;33(2):143–55.
98. Purkait S, Bhattacharya A, Bag A, Chattopadhyay RR. Evaluation of antibiofilm efficacy of essential oil components β -caryophyllene, cinnamaldehyde and eugenol alone and in combination against biofilm formation and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Lett Appl Microbiol*. 2020;71(2):195–202.
99. Askarian F, Ajayi C, Hanssen A-M, van Sorge NM, Pettersen I, Diep DB, et al. The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Sci Rep*. 2016 Feb 29;6(1):22134.
100. Shrestha L, Kayama S, Sasaki M, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, et al. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiol Immunol*. 2016;60(3):148–59.
101. Paulander W, Varming AN, Bojer MS, Friberg C, Bæk K, Ingmer H. The agr quorum sensing system in *Staphylococcus aureus* cells mediates death of sub-population. *BMC Res Notes [Internet]*. 2018 Jul 24 [cited 2021 Jan 11];11.
102. Boles BR, Horswill AR. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathog*. 2008 Apr 25;4(4):e1000052.

103. García-Moreno MA, Garza-Ramos MA de la, Martínez-Ávila CGC, Gutiérrez-Díez A, Ojeda-Zacarías M del C, Aguirre-Arzola VE, et al. Inhibición de la expresión del sistema agr de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante el uso de polifenoles totales de hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). *Nova Sci.* 2017;9(18):200–21.
104. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Oct 27 [cited 2021 Jan 11];6.
105. Butrico CE, Cassat JE. Quorum Sensing and Toxin Production in *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Pathogenesis and Paradox. *Toxins*. 2020 Aug;12(8):516.
106. Salimena APS, Lange CC, Camussone C, Signorini M, Calvino LF, Brito MAVP, et al. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet Res Commun*. 2016 Dec 1;40(3):97–106.
107. Grunert T, Stessl B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. *Sci Rep*. 2018 Oct 29;8(1):15968.

8. ANEXO

Gen *sdrD*

Compuesto	Valores Cq promedio		Expresión normalizada	Expresión relativa normalizada	Fold change
	<i>gyr</i>	<i>sdrD</i>			
Control	19,86	21,41	2,11	1,00	1,00
Linalool	19,41	20,39	0,98	-1,13	2,22
Trans-cariofileno	19,32	25,82	6,50	4,39	0,05
Linalool – Trans-cariofileno	20,04	27,11	7,07	4,96	0,05

Gen *spa*

Compuesto	Valores Cq promedio		Expresión normalizada	Expresión relativa normalizada	Fold change
	<i>gyr</i>	<i>spa</i>			
Control	19,86	15.01	-4,30	1,00	1,001
Linalool	19,41	19.85	0,43	4,73	0,039
Trans-cariofileno	19,32	24.01	4,70	9,00	0,002
Linalool – Trans-cariofileno	20,04	25.68	5,63	9,93	0,002

Gen *hld*

Compuesto	Valores Cq promedio		Expresión normalizada	Expresión relativa normalizada	Fold change
	<i>gyr</i>	<i>hld</i>			
Control	19,86	10.50	-8,81	1,00	1,00
Linalool	19,41	14,17	-5,24	3,57	0,2346
Trans-cariofileno	19,32	21,18	1,86	10,67	0,0007
Linalool – Trans-cariofileno	20,04	21,72	1,68	10,49	0,0011

Gen *agrA*

Compuesto	Valores Cq promedio		Expresión normalizada	Expresión relativa normalizada	Fold change
	<i>gyr</i>	<i>agrA</i>			
Control	19,86	16,23	-3,071	1,02	1,00
Linalool	19,41	18,57	-0,847	2,223	0,222
Trans-cariofileno	19,32	20,45	1,138	4,208	0,062
Linalool – Trans-cariofileno	20,04	22,66	2,616	5,686	0,022

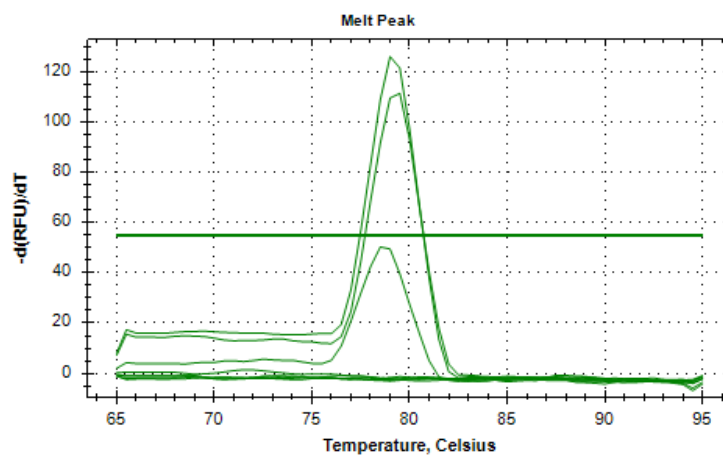
Gen *cap5B*

Compuesto	Valores Cq promedio		Expresión normalizada	Expresión relativa normalizada	Fold change
	<i>gyr</i>	<i>Cap5B</i>			
Control	19,86	23,15	3,84	1,00	1,00
Linalool	19,41	21,59	2,18	-1,66	3,51
Trans-cariofileno	19,32	22,01	2,69	-1,15	2,28
Linalool – Trans-cariofileno	20,04	24,20	3,51	-0,33	1,28

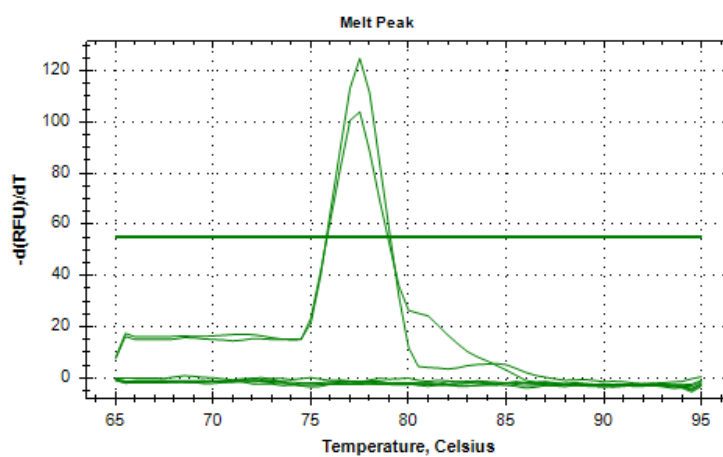
Gen *cap5C*

Compuesto	Valores Cq promedio		Expresión normalizada	Expresión relativa normalizada	Fold change
	<i>gyr</i>	<i>cap5C</i>			
Control	19,86	25,57	6,27	1,00	1,04
Linalool	19,41	22,40	2,98	-3,29	10,93
Trans-cariofileno	19,32	23,05	3,74	-2,53	6,29
Linalool – Trans-cariofileno	20,04	25,14	5,10	-1,17	2,95

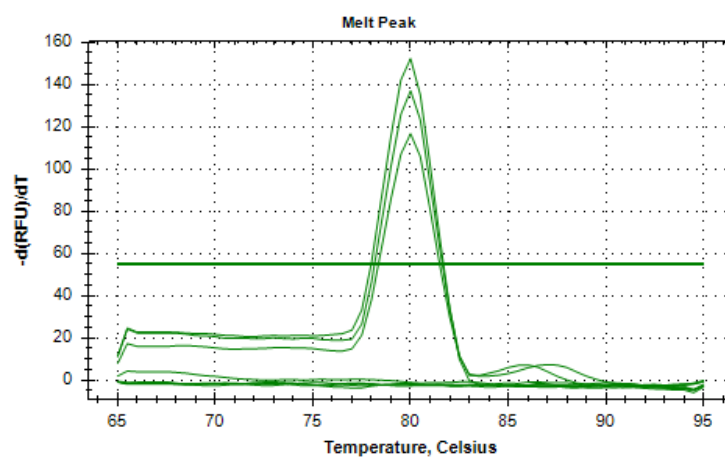
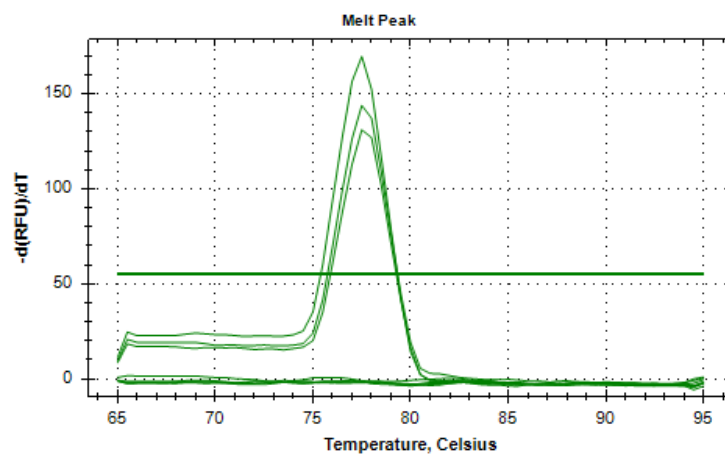
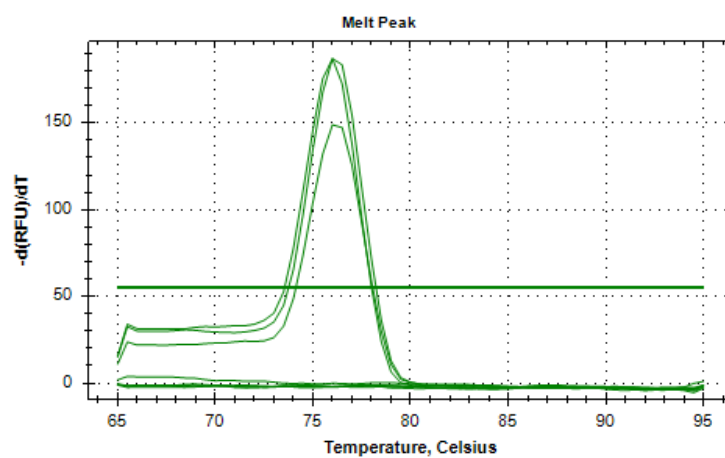
Curvas de temperatura de fusión

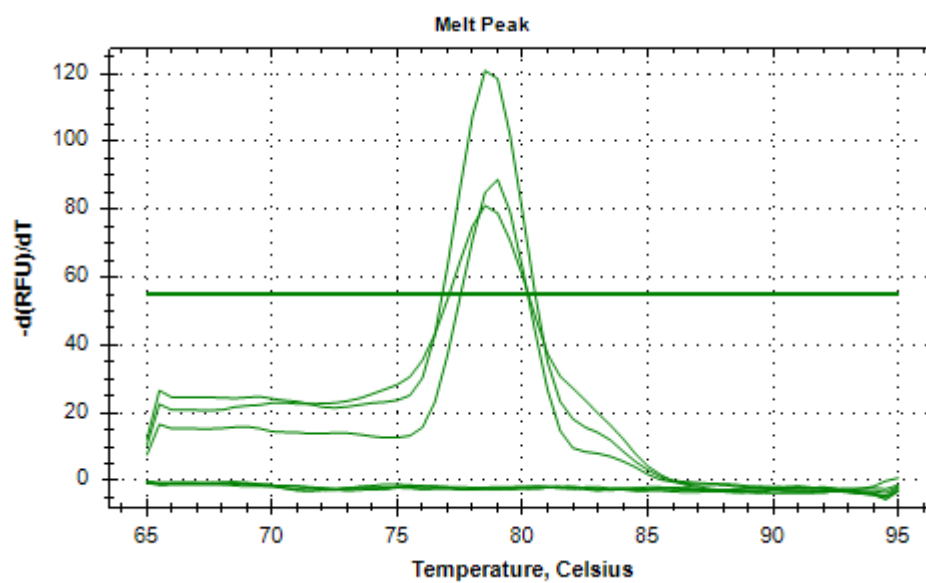


Curvas de fusión del gen *gyr*

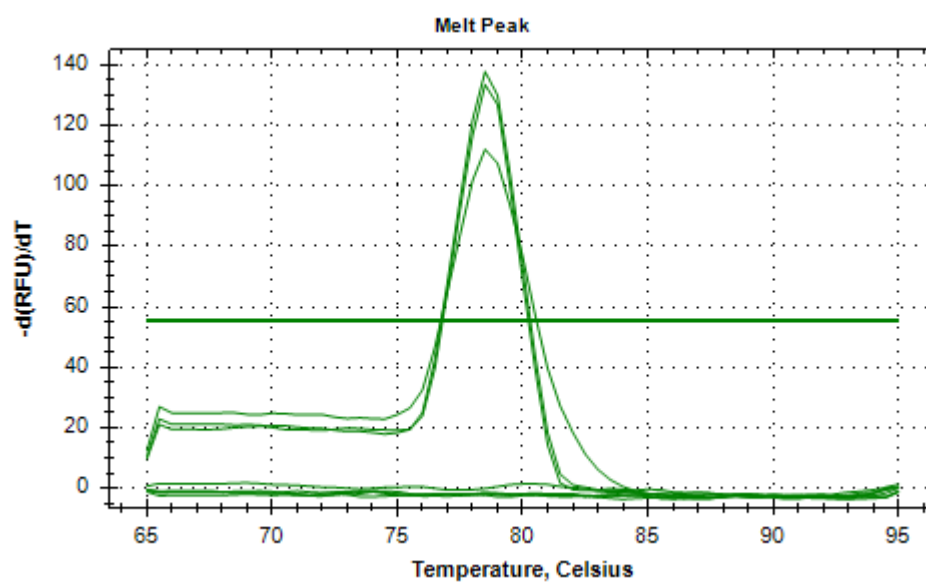


Curvas de fusión del gen *sdrD*

Curvas de fusión del gen *spa*Curvas de fusión del gen *agrA*Curvas de fusión del gen *hld*



Curvas de fusión del gen *cap5B*



Curvas de fusión del gen *cap5C*