



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA  
INSTITUTO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

**TESIS DOCTORAL**

“Caracterización de cepas de *Escherichia coli* con fenotipos de multirresistencia inducidos o seleccionados *in vitro* con antimicrobianos o con fármacos no antimicrobianos”

VIRGINIA DANIELA AQUILI

Las Palmas de Gran Canaria

2007

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

La gratitud es uno de los sentimientos que nunca deben faltar en la vida pues nos obliga a reconocer que todo trabajo o acto es el cúmulo de esfuerzos conjuntos, que no estamos solos en esta vida y que nos necesitamos los unos a los otros, por eso quiero dejar constancia en estas líneas de mi agradecimiento y reconocimiento a todas estas personas, que me apoyaron de alguna u otra manera hasta poder llegar al final de esta tesis.

En primer lugar quiero expresar mi gran agradecimiento a mis directores Tesis:

Dra. Tavío María del Mar, Dr. Bismark Poveda Guerrero y Dra. Balagué Claudia.

Un Agradecimiento especial para mi directora Dra. Tavío María del Mar, por sus conocimientos, su paciencia, su predisposición, sus consejos, su generosidad, su amistad, por el ejemplo, por todo el esfuerzo que ha puesto para la realización de esta tesis, pero además por haberme hecho sentir como en casa. Hay deudas impagables, sólo puedo expresarle mi respeto y cariño por siempre.

Al Dr. Poveda Guerrero, por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus conocimientos, su dirección y su apoyo siempre que lo necesité, muchas gracias por todo.

A la Dra. Claudia Balagué por haber influido en mi formación en Microbiología, por haberme estimulado e impulsado a realizar esta tesis doctoral, por su apoyo siempre y en todo momento, mil gracias.

A la Dra. Luisa Fernández porque hizo de la microbiología un mundo más fascinante para mí, gracias por su afecto, por creer siempre en mí, por su fuerza, su gran generosidad y por compartir conmigo sus conocimientos y su experiencia.

A mis hermanos, mis padres, amigos y a Gabriel, por el aguante, por todo el apoyo y por el amor que me dieron durante todo este tiempo.

*Mil gracias a todos  
Virginia*

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	I
<hr/>	
<b>RESUMEN</b>	VII
<hr/>	
<b>SUMMARY</b>	IX
<hr/>	
<b>ABREVIATURAS</b>	XI
<hr/>	
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>CAPÍTULO 1: BACILOS GRAM NEGATIVOS: <i>Escherichia coli</i></b>	1
<hr/>	
1. Enterobacteriaceae	
1.1- Generalidades	
1.2- Características bioquímicas e identificación	
2. Género <i>Escherichia</i> - especie: <i>Escherichia coli</i>	
3. Patologías y síndromes clínicos más frecuentes	
<b>CAPÍTULO 2: PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS: <i>Escherichia coli</i></b>	14
<hr/>	
Componentes de la pared celular de <i>Escherichia coli</i> :	
2.1 Introducción	
2.2 Estructura del peptidoglicano	
2.3 Periplasma	
2.4 Membrana externa	
2.4.1 Lipopolisacárido	
2.4.2 Proteínas	
2.4.2.1- Porinas: OmpF y OmpC	
2.4.2.2- TolC	
2.4.2.3- Proteínas canal específico	
2.4.2.4- OmpA	
2.4.3 Papel de la membrana externa en la permeabilidad y resistencia a los antimicrobianos.	

- 3.1 Introducción
- 3.2 Tipos de resistencia
  - 3.2.1- Resistencias cromosómicas
  - 3.2.2- Resistencias Extracromosómicas
- 3.3 Mecanismos generales de resistencia a antimicrobianos
  - 3.3.1- Clasificación general de los antimicrobianos
  - 3.3.2- Inactivación del antimicrobiano
  - 3.3.3- Alteración de las barreras de permeabilidad  
(Entrada disminuida)
  - 3.3.4- Incremento en el eflujo activo de los antimicrobianos
  - 3.3.5- Alteración de la diana o lugar de acción del antimicrobiano

Resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en cepas de *Escherichia coli*:

- 4.1 Introducción
- 4.2 Mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos
- 4.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos
  - 4.3.1 - Producción de  $\beta$ -lactamasas
  - 4.3.2 - Alteración de la permeabilidad de la membrana por pérdida o disminución de las porinas de la membrana externa
  - 4.3.3 - Sistemas de eflujo activo
  - 4.3.4 - Alteración de los sitios blancos (PBPs: proteínas de unión a penicilina)

## Relación estructura y actividad

## 5.1 Clasificación de las quinolonas

## 5.2 Mecanismo de acción de las quinolonas

## 5.3 Mecanismos de resistencia a quinolonas

## 5.3.1 Resistencia de tipo cromosómico

## 5.3.2 Resistencia por alteración en la membrana externa bacteriana

## 5.3.3 Resistencias basadas en el eflujo del fármaco

## 5.3.4 Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

5.4 Otros efectos inducidos por las quinolonas: *la respuesta SOS*

## CAPÍTULO 6: MÚLTIPLE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

*Operón marRAB y soxRS*

112

A. Operón *marRAB*

## 6.1 Introducción

6.2 Estructura y función del operón *mar*

## 6.3 MarR

## 6.3.1- Familia MarR/SlyA

## 6.3.2- Características estructurales de la proteína MarR

6.3.3- MarR y la regulación del operón *mar*

## 6.4 MarA

## 6.4.1- Familia XylS/AraC

6.4.2- MarA y la regulación del operón *mar*

## 6.4.3- Características estructurales de MarA

## 6.5 MarB y MarC

B. Operón *soxRS*

## C. Otras proteínas regulatorias homólogas a MarA y SoxS: Rob

## CAPITULO 7: SISTEMAS DE EFLUJO DE MÚLTIPLES DROGAS

EN *Escherichia coli*

134

## 7.1 Introducción

## 7.2 Clasificación de los transportadores de múltiples drogas (MDR) procariontas

7.3 Transportadores (MDR) en *E. coli*7.4 Características de los principales sistemas de eflujo en cepas de *E. coli*

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. Identificación bacteriana y medios de siembra
2. Antimicrobianos y Reactivos utilizados en este estudio
3. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo
4. Selección *in vitro* de mutantes multirresistentes a partir de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas:
  - Selección de mutantes multirresistentes con antimicrobianos
  - Selección de mutantes multirresistentes con Fármacos no antimicrobianos
  - Frecuencia de selección
5. Ensayos de inducción de multirresistencia en cepas de *E. coli* susceptibles y compuestos utilizados en este trabajo
6. Valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos
  - Test de dilución en agar
  - Test de difusión en agar
7. Caracterización de los sistemas de eflujo valorando la susceptibilidad a antimicrobianos en presencia de los inhibidores
8. Métodos de obtención de los extractos de proteína de membrana externa e interna a partir de cepas de *E. coli*.
  - Obtención de los extractos de OMP e IMP
  - Obtención de los extractos de Proteínas de unión a penicilina (PBP)
  - Obtención de los extractos de proteína de membrana externa bajo el efecto de NaCl al 1%
9. Concentración de proteínas en los extractos (método de Lowry)
10. Análisis del perfil de proteínas de membrana externa e interna
  - Electroforesis en geles de poliacrilamida
  - Métodos de detección
11. Valoración de la actividad  $\beta$ - lactamasa sobre el extracto crudo.
  - Obtención del extracto crudo
  - Valoración de la Actividad Específica de los Extractos Enzimáticos Crudos
12. Valoración del incremento en la tolerancia al ciclohexano
13. Ensayos de transducción
14. Dosaje de la actividad Betagalactosidasa
15. Valoración de la acumulación de norfloxacin. Técnica de bioensayo

- Técnica de obtención de los sobrenadantes con norfloxacino acumulado intracelularmente
  - Técnica de bioensayo
16. Estudio de los cambios morfológicos mediante
- Tinción de Gram
  - Estudio en fresco
17. Estudio del nivel de expresión de *acrB*
- Extracción de ARN
  - Transcripción inversa del ARN total y PCR del ADNc

## RESULTADOS

---

1. Resultados obtenidos a partir de las inducción de cepas de <i>Escherichia coli</i> con fármacos no antibióticos	199
2. Resultados obtenidos a partir de la selección de cepas de <i>Escherichia coli</i> con antimicrobianos: ceftazidima y lomefloxacina	231
3. Resultados obtenidos a partir de la selección de cepas de <i>Escherichia coli</i> con fármacos no antibióticos: diazepam y salicilato	261

## DISCUSIÓN

---

1. Inducción de fenotipos de múltiple resistencia en la cepa <i>E. coli</i> AG100...	299
2. Selección de mutantes estables multirresistentes son antimicrobianos	319
3. Selección de cepas de <i>Escherichia coli</i> con fármacos no antibióticos	343

<b>CONCLUSIONES</b>	361
---------------------	-----

---

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	365
---------------------	-----

---



# RESUMEN

## RESUMEN

---

El fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos (fenotipo MAR) puede ser inducido en cepas de *E. coli* con diferentes compuestos como el salicilato de sodio, y diazepam entre otros, o también puede ser adquirido por mutaciones debidas a la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos. La sobre-expresión de los activadores transcripcionales MarA, SoxS y Rob resulta en el fenotipo Mar, que se caracteriza por una disminuida susceptibilidad a múltiples antimicrobianos debido a la disminución en la expresión de la porina F y al incremento de expresión de AcrAB. Otro de los reguladores transcripcionales implicados también en la respuesta bacteriana a situaciones de estrés es SdiA cuya activación resulta en incrementados niveles de transcripción de componentes de sistemas de eflujo activo como *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *acrD* y *tolC*.

En este trabajo se estudiaron si otros nueve medicamentos no antibióticos utilizados en cirugía (Clonazepam, Ketorolaco, Clorpromazina, Dexametasona, Haloperidol, Metamizol, Diclofenaco, Fenobarbital, Propacetamol) pueden inducir, al igual que el salicilato, el fenotipo Mar en cepas susceptibles de *E. coli* AG100.

Asimismo se evaluó la posible selección de mutantes estables multirresistentes con fármacos no antimicrobianos (diazepam y salicilato) a partir de dos cepas de *E. coli* de origen clínico. Los mutantes fueron caracterizados y comparados con los mutantes seleccionados con antimicrobianos (ceftazidima y lomefloxacina) a partir de las mismas cepas origen.

**Mediante los ensayos de inducción** demostramos que los nueve medicamentos usados en cirugía son capaces de inducir al igual que el salicilato el fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos en la cepa sensible de *E. coli* AG100 y que la capacidad de inducir multirresistencia dependía de la dosis o concentración de fármaco utilizada y no de la estructura química del compuesto.

**En la selección in vitro de mutantes multirresistentes** se demostró que es posible seleccionar *in vitro* mutantes multirresistentes estables de *E. coli* con fármacos no antimicrobianos (diazepam) y con salicilato de sodio. Estos mutantes presentaron patrones y mecanismos de resistencia similares a los hallados en los mutantes seleccionados con antimicrobianos (ceftazidima y lomefloxacina). El desarrollo de múltiple resistencia generada por drogas sean o no antimicrobianos se asoció a la sobre-expresión de PBP3 que junto a la disminución de la expresión de la porina F y al incremento del eflujo activo dio lugar a incrementos de 2-128 veces en la resistencia a ceftazidima, cefpirome y aztreonam en los mutantes seleccionados. Asimismo, se encontraron indicios de la sobre-expresión del regulador transcripcional SdiA en los fenotipos de multirresistencia.



# SUMMARY

## SUMMARY

---

Multiple antibiotic resistance phenotype (MAR phenotype) can be induced in *Escherichia coli* strains by different compounds such as sodium salicylate or diazepam, among others, also it can be acquired through mutations due to the selective pressure exerted by antimicrobial agents. The overexpression of the transcriptional activators MarA, SoxS or Rob results in MAR phenotypes, that are characterized by a decreased susceptibility to multiple antibiotics due to a decreased expression of porin F and increased expression of the AcrAB-TolC efflux system. SdiA is another transcriptional activator involved in the bacterial response to environmental stresses, whose activation results in increased transcript levels of components of efflux systems such as *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *acrD* and *tolC*.

In this work, nine non-antimicrobial drugs, which are used in surgery (Clonazepam, Ketorolac, Chlorpromazine, Dexamethasone, Haloperidol, Methamisole, Diclofenac, Phenobarbital and Propacetamol), were tested as inducers of MAR phenotypes in the *E. coli* AG100 strain, a wild-type strain. Likewise, the *in vitro* selection of stable multidrug-resistant mutants by diazepam or salicylate from two different *E. coli* clinical isolates was evaluated, and mutants were characterized and compared with those mutants *in vitro* selected with antimicrobial agents (ceftazidime and lomefloxacin).

The induction experiments showed that the nine drugs used in surgery as well as salicylate were able to induce MAR phenotypes in the wild type *E. coli* AG100 strain and the ability to induce multidrug resistance depended on the dose or concentration of the drug used and not on the chemical structure of the compound.

The *in vitro* selection experiments showed that it is possible the *in vitro* selection of stable multidrug-resistant mutants with non-antimicrobial drugs (diazepam) or sodium salicylate. These mutants showed patterns and mechanisms of resistance similar to those found in the mutants selected with antimicrobial agents (ceftazidime or lomefloxacin).

The development of multidrug resistance in mutants generated by antimicrobials or non-antimicrobial drugs was associated with the overexpression of PBP3, which together with OmpF decreased expression and an increasing active efflux resulted in 2-128 fold increase in the resistance to ceftazidime, aztreonam and cefpirome. In addition, evidences of the overexpression of the transcriptional regulator SdiA in the *in vitro* selected multidrug-resistant mutants were found.



# ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

---

- ABC: Transportadores tipo ABC ( del inglés ATP- binding casete)
- Abs.: absorbancia
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AMP: adenosín monofosfato
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: adenosina trifosfato
- AZT: aztreonam
- BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido
- CCCP: carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (del inglés Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)
- CF: cefalotina
- CH: ciclohexano
- CIN: concentración intracelular de norfloxacin
- CL: cloranfenicol
- CMIs: concentración inhibitoria mínima
- CPO: cefepime
- CTX: cefotaxima
- DO: densidad óptica
- DZ: diazepam
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- EC: Equivalencia de la concentración
- FOX: cefoxitina
- g: gramos
- IMP: imipenem
- kDa: kilo-daltones
- Mar: múltiple resistencia a antimicrobianos
- MATE: Extrusión de múltiples drogas y compuestos tóxicos
- MDR: resistencia a múltiples drogas
- ME: membrana externa
- MFP: proteína de fisión
- MFS: Facilitadores mayores
- mg: miligramo

- MI: membrana interna
- ml: mililitro
- mM: milimolar
- mtC: mitomicina C
- NaCl: cloruro de sodio
- NAL: ácido nalidíxico
- ND: no determinado
- nm: nanómetro
- NOR: norfloxacin
- Omp: proteínas de membrana externa
- PBPs: proteínas de unión a penicilinas
- PM: peso molecular
- RND: Resistencia-Nodulación-División
- SDS: dodecil sulfato de sodio
- SI: secuencias de inserción
- SL: salicilato de sodio
- SMR: Staphylococcal (or Small) multidrug resistance
- TE: tetraciclina
- UM: Unidades Miller
- UV: ultra violeta
- µg: microgramo
- µl: microlitro
- µM: micromolar

# INTRODUCCIÓN

# 1

## BACILOS GRAM NEGATIVOS: *Escherichia coli*

1. Enterobacteriaceae
  - 1.1- Generalidades
  - 1.2- Características bioquímicas e identificación
2. Género *Escherichia*- especie: *Escherichia coli*
3. Patología y síndromes clínicos más frecuentes

### 1. Enterobacteriaceae

#### 1.1- Generalidades

La familia de las enterobacterias está constituida por más de 47 géneros bacterianos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>) que incluyen muchas bacterias no relacionadas con el hábitat humano y otras mantienen estrecha relación con el hombre, desde el estado de comensal al de patógeno (*SEIMC, 2005*). Pero a pesar de la complejidad de esta familia son menos de 20 las especies responsables del 95% de las infecciones (*Murray P., 2004*). Estos bacilos gram negativos habitan frecuentemente en el tracto gastrointestinal de los animales y el hombre, sin ser causante por ello de enfermedad, es decir son flora comensal pero también se encuentra dispersa en otros nichos ambientales como en suelo, agua y plantas. En enfermos hospitalizados o cuando existe una alteración de las barreras anatómicas, muchas de las enterobacterias pueden ser causantes de enfermedades oportunistas, siendo responsables de bacteriemias, gastroenteritis, infecciones urinarias, neumonías, formación de abscesos, meningitis, entre otras. Las enterobacterias son además una de las principales causas de infección nosocomial (*Mandel y cols., 1990*). Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentra la especie *Escherichia coli*, que es causa frecuente de infecciones urinarias y de gastroenteritis bacteriana en individuos sanos. Sin embargo, unos pocos miembros de esta familia deben considerarse como patógenos estrictos y poseen alto poder patógeno (tabla N° 1).

<b>Tabla 1: Principales especies de enterobacterias de interés médico</b> (Prats G. & B. Mirelis, 1996)		
<b>Especies comensales más importantes</b> (Oportunistas potenciales)	<i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Morganella morganii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Providencia alcalifaciens</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Serratia marcescens</i>
<b>Especies patógenas</b> (Todas)	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella bongori</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

Los géneros de esta familia están enumerados a continuación, sin embargo de todos ellos los de mayor importancia médica son: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia* y *Morganella*.

#### **Géneros de la familia *Enterobacteriaceae***

<i>Alterococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Proteus</i>
<i>Aranicola</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Providencia</i>
<i>Arsenophonus</i>	<i>Grimontella</i>	<i>Rahnella</i>
<i>Averyella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Raoultella</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Samsonia</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Leclercia</i>	<i>Serratia</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Leminorella</i>	<i>Shigella</i>
<i>Candidatus</i>	<i>Margalefia</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Calymmatobacterium</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Morganella</i>	<i>Thorsellia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Tiedjei</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Trabusiella</i>
<i>Dickeya</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Wigglesworthia</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>Photorhabdus</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Pragia</i>	<i>Yokenella</i>

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>)

## 1.2- Características bioquímicas e identificación

La familia *Enterobacteriaceae* como vemos está compuesta por muchos miembros, como ser *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia*, etc., éstas se caracterizan por no producir esporas, ser capaces de crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (anaerobios facultativos), fermentar la glucosa, no producir oxidasa, producir catalasa, reducir nitratos a nitritos (excepto algunas cepas del género *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, etc.). Las enterobacterias tienen requerimientos nutricionales simples, crecen bien en el medio de cultivo Mac Conckey y tienen una movilidad variable (dependiendo de la presencia o no de flagelos).

### 2. Género: *Escherichia*- Especie: *Escherichia coli*

El género *Escherichia* consta de 7 especies, siendo *Escherichia coli* la especie aislada con más frecuencia en muestras clínicas (tabla N° 2). Generalmente se considera que el hábitat normal de *E. coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos), aunque se la puede encontrar en otras partes fuera del tracto digestivo (*Souza y cols., 1999; Schaechter, 2001*). *E. coli* es una de las primeras especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas del canal de parto y de las heces de su madre (*Bettelheim, 1994*). Las colonizaciones posteriores se deben por lo general a la ingestión de alimentos contaminados.

Las especies pertenecientes a este género son bastones rectos de 1,1–1,5 x 2,0–6,0 µm, que se encuentran tanto aislados como en parejas. Algunas de las cepas pueden presentar cápsula o microcápsula. Móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Son gram negativos, anaerobios facultativos y presentan tanto un metabolismo fermentativo como oxidativo. *E. coli* es un organismo quimioorganotrofo, oxidasa negativo y catalasa positiva, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y cuyas colonias, aisladas en agar nutritivo, pueden ser tanto lisas como rugosas. Pueden usar el acetato como única fuente de carbono pero no el citrato; asimismo pueden fermentar la glucosa, y otros carbohidratos, con producción de piruvato, el cual es posteriormente convertido en los ácidos láctico, acético y fórmico. Parte de este ácido fórmico es transformado por medio de un sistema hidrogenoliasa en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. La mayoría de las cepas pueden fermentar la lactosa pero esta capacidad de fermentación de la lactosa puede estar

latente o ausente. Reduce el nitrato y presenta reacción positiva con rojo de metilo, y negativa la prueba de Voges-Proskauer. Dan negativas las pruebas de producción de SH<sub>2</sub>, hidrólisis de la urea y la lipasa. La mayor parte de las cepas de *E. coli* son citrato negativa. Para este género, la suma de bases G+C del ADN es del 48-52 moles % (Tm).

En la tabla N° 3 se detallan las pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas de *E. coli*, con los porcentajes de positividad de cada una de ellas.

La composición antigénica de *E. coli* es compleja, pero se puede hacer una clasificación serológica de acuerdo a sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) o capsulares (K).

**Tabla N° 2:** *Especies del género Escherichia (Euzéby JP., 2006; Abbott SL. y cols., 2003).*

<b>Género</b>	<b>Especies</b>
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia adecarboxylata</i> <i>Escherichia albertii</i> <i>Escherichia blattae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia fergusonii</i> <i>Escherichia hermannii</i> <i>Escherichia vulneris</i>

**Tabla N° 3: Identificación bioquímica de *E. coli* (Rodríguez G., 2002)**

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>% de Positividad</b>
Oxidasa	<b>0</b>
Producción de indol	<b>98</b>
Rojo de metilo	<b>99</b>
Voges-proskauer	<b>0</b>
Citrato de Simmons	<b>1</b>
H <sub>2</sub> S ( TSI)	<b>1</b>
Hidrólisis de urea	<b>1</b>
Utilización de malonato	<b>0</b>
Ácido de glucosa	<b>100</b>
Gas de glucosa	<b>95</b>
Fenilalanina desaminasa	<b>0</b>
Lisina decarboxilasa	<b>90</b>
Arginina Hidrolasa	<b>17</b>
Ornitina descarboxilasa	<b>65</b>
Movilidad a 36 °C	<b>95</b>
Hidrólisis de gelatina a 22°C	<b>0</b>
KCB crecimiento en	<b>3</b>
Fermentación en lactosa	<b>95</b>
Fermentación de la sacarosa	<b>50</b>
Fermentación de D-manitol	<b>98</b>
Fermentación de D-sorbitol	<b>94</b>
Fermentación de mucato	<b>95</b>
Fermentación de dulcitol	<b>60</b>
Fermentación de salicina	<b>40</b>
Fermentación de adonitol	<b>5</b>
Fermentación de inositol	<b>1</b>
Fermentación de L- arabinosa	<b>99</b>
Fermentación de la rafinosa	<b>50</b>
Fermentación de la L- ramnosa	<b>80</b>
Fermentación de maltosa	<b>95</b>
Fermentación de D- xilosa	<b>95</b>
Fermentación de trealosa	<b>98</b>
Fermentación de celobiosa	<b>2</b>
Fermentación de $\alpha$ -metil- D glucósido	<b>0</b>
Fermentación de eritriol	<b>0</b>
Hidrólisis de esculina	<b>35</b>
Fermentación de melodiosa	<b>75</b>
Fermentación de D-arabitol	<b>5</b>
Fermentación de D-manosa	<b>98</b>
Fermentación de glicerol	<b>75</b>
Nitrato a nitrito	<b>100</b>
Utilización de acetato	<b>90</b>
Lipasa ( aceite de maíz)	<b>0</b>
DNasa a 25°C	<b>0</b>
ONPG	<b>95</b>

### **3. Patología- Síndromes clínicos**

Las infecciones más frecuentes debidas a *E. coli* son las urinarias. Asimismo puede originar infecciones de las vías biliares, peritonitis, meningitis neonatal, neumonía, y gastroenteritis entre otras (Kaper JB. y cols., 2004).

Aunque *E. coli* es parte de la flora comensal puede causar infecciones en determinadas circunstancias, como son la emigración desde el intestino al tracto urinario, produciendo infecciones urinarias bajas y eventualmente bacteriemia o infecciones focales por vía hematógena, aunque la vía de entrada más común es la urinaria, ello no significa que sea la única que permite el acceso del germen a la circulación. (García Aguado JM. y cols., 1998)

Son muchos los síndromes clínicos que pueden estar causados por *E. coli* entre ellos destacan los siguientes:

#### **3.1) Infecciones urinarias**

#### **3.2) Gastroenteritis**

#### **3.3) Meningitis neonatal**

#### **3.4) Bacteriemia**

#### **3.5) Otras infecciones: neumonía, infecciones de las vías biliares, infecciones localizadas**

#### **3.1) Infecciones urinarias**

*Escherichia coli* es el patógeno oportunista aislado con más frecuencia en infecciones del tracto urinario (ITU), siendo el responsable de más del 70-95% de todas las infecciones del tracto urinario (ITU) adquiridas en la comunidad (Naber 2000; Kahlmeter 2003) y de la mayoría de las adquiridas en el hospital. Las ITU son generalmente infecciones ascendentes causadas por cepas presentes en la flora normal intestinal que presentan factores de virulencia que les permiten invadir, colonizar y dañar el tracto urinario provocando bacteriuria asintomática, cistitis o pielonefritis. Las infecciones urinarias son más frecuentes en mujeres debido al pequeño tamaño de la uretra, y a su proximidad a la región anal. La adhesión, mediada generalmente por fimbrias P u otro tipo de factores de colonización que presentan actividad hemaglutinante en presencia de manosa, es tal vez el evento

más importante en la patogenia de las ITU. Además de la adherencia, se ha demostrado que otros factores de virulencia pueden contribuir a la patogenicidad, tal es el caso de la producción de alfa-hemolisina (Hly) y la síntesis del factor necrosante citotóxico tipo 1 (CNF-1), la resistencia al suero y la expresión del sideróforo aerobactina. Estudios recientes parecen indicar que la capacidad para interactuar con ciertas proteínas del epitelio (uropilinas) permite a las bacterias invadir el epitelio de la vejiga y sobrevivir de forma quiescente, incluso en presencia de tratamientos antibióticos, lo que explicaría gran parte de las recurrencias de estas infecciones. Se cree que varios de estos factores contribuyen conjuntamente a la virulencia del microorganismo, siendo ésta multifactorial. (*Tratado de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica-SEIMC, 2005*)

### 3.2) Gastroenteritis

*E. coli* se aisló por primera vez como agente causante de diarrea infantil en 1920 (*Adam A., 1923*). Las infecciones intestinales pueden producirse por variedades diferentes de *E. coli*, las cuales a su vez poseen diferentes mecanismos patogénicos y se las puede dividir en 6 grupos:

- **ECET: *Escherichia coli* enterotoxigénica**
- **ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica**
- **ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasiva**
- **ECEP: *Escherichia coli* enteropatógena**
- **ECEA: *Escherichia coli* enteroagregativa**
- **ECAD: *Escherichia coli* de adherencia difusa**

### **ECET (*Escherichia coli enterotoxigénica*):**

La ECET produce diarrea infecciosa comúnmente en zonas con climas tropicales donde el agua contaminada es la principal fuente de contagio. Produce la llamada diarrea del viajero. Estas cepas colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas factores de colonización o CFA (*colonización factor antigens*) que favorecen la interacción de la bacteria con los enterocitos en el intestino, pero su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) o toxina termoestable (ST). Sus genes están codificados en un plásmido que también puede tener información genética para los factores de colonización (CFA), aunque algunos genes que codifican la toxina termoestable también se los ha encontrado en transposones. Las toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) lo que hacen es aumentar los niveles intracelulares de AMPc y GMPc respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la hipersecreción de agua y electrolitos.

Estas cepas afectan principalmente a niños, menores de 2 años, principalmente en los 6 primeros meses de vida. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14-50 horas y el cuadro clínico se caracteriza por: diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito. La diarrea generalmente es leve, breve y autolimitada, aunque se han descrito casos de gravedad.

### **ECEH (*Escherichia coli enterohemorrágica*):**

La gastroenteritis producida por estas cepas se caracteriza por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre, poco o nada de fiebre. El serotipo más frecuentemente asociado es O157:H7, y se la asocia a los casos donde se produce colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, caracterizado por la tríada: daño renal agudo, púrpura trombocitopénica trombótica y anemia hemolítica microangiopática, y la presencia en heces de cepas de *E. coli* productora de una citotoxina. Esta citotoxina tiene actividad sobre las células Vero, por lo que se la conoce también como verotoxina y a las cepas se las ha denominado *E. coli verotoxigénica*, asimismo se observó que la toxina producida era semejante a la sintetizada por la *Shigella dysenteriae*, por lo que además en la bibliografía se la

suele denominar “*shiga like toxin*”, toxina semejante a la Shiga o “*shiga toxin*” y a las cepas se las conoce como *E. coli* productora de shiga toxina (ECST o STEC).

La producción de esta toxina es el principal mecanismo de patogenicidad de la ECEH, y la misma está codificada en un bacteriófago, integrado al genoma de la bacteria. Esta toxina actúa a nivel de la síntesis de las proteínas puesto que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedador. La toxina tiene variantes denominadas Stx1 y Stx2, que son inmunológicamente diferentes, y puede que la bacteria sintetice ambas. Asimismo estas cepas poseen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E) y presentan un gen cromosómico llamado “*eae*” que codifica una proteína de membrana externa de 94 kDa, llamada intimina. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa) que codifica para la enterohemolisina (*Miguel Blanco y cols., 1985; Balagué C. y cols., 2006*).

El periodo de incubación de la enfermedad por EHEC es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas. Se cura o bien llega hasta síndrome hemolítico urémico (*Miguel Blanco y cols., 1985*).

#### **ECEI (*Escherichia coli* enteroinvasiva):**

La ECEI es un patógeno que causa una enfermedad parecida a la disentería producida por *Shigella*, el mecanismo de patogenicidad de estas cepas es la invasión del epitelio del colon, para ello lo primero que hacen es adherirse a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, después entran a la célula por endocitosis y posteriormente se multiplican dentro de la célula y así se pueden diseminar a las células sanas adyacentes.

Los genes necesarios para la invasión se encuentran codificados en un plásmido de 140 MDa (megadaltones) llamado pInv, que codifica proteínas como por ejemplo la Ipa, involucrada en el proceso de patogénesis.

Los síntomas de la enfermedad por ECEI son: diarrea acuosa con sangre y moco, pero en algunas ocasiones sólo se produce diarrea (*Stenutz R. y cols., 2006*).

### **ECEP (*Escherichia coli enteropatogena*):**

ECEP está asociada a diarrea en niños, siendo la adherencia su principal factor de virulencia, esta cepa después de adherirse, destruye las microvellosidades, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio donde se ha unido la bacteria, debido a un aumento del calcio intracelular y de proteína cinasa C. Este fenómeno es conocido como adherencia y esfacelamiento (A/E), donde las bacterias se adhieren al tejido y borran las vellosidades del intestino.

La adherencia está mediada por pilis o fimbrias cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF (*EPEC adherente factor*) y de algunos genes cromosómicos (locus LEE). En la adherencia es necesaria también la síntesis de intimina, una proteína de membrana externa de 94 kDa., codificada por el gen “*eae*”.

*In Vitro* las cepas EPEC se caracterizan por formar micro-colonias en el citoplasma de las células Hep-2.

Las cepas de EPEC afectan principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, que puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (*Stenutz R. y cols., 2006*).

### **ECEA (*Escherichia coli enteroagregativa*):**

Estas cepas se caracterizan por la auto-agregación inespecífica de las bacterias y además se adhieren a la superficie de las células Hep-2.

La adherencia a células Hep-2 y la hemoaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gen “*aggA*” que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gen “*aafA*”; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias.

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que

atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea.

EAEC posee un plásmido de 60 MDa en donde se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI. Asimismo se han caracterizado dos proteínas de alto peso molecular, las cepas fueron aisladas de niños que murieron de diarrea persistente. El gen que codifica una de estas proteínas se identificó en un plásmido de 65 MDa y a la proteína se le dio el nombre de Pet (*plasmid-encoded toxin*) que tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por arredondamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa.

La diana de las cepas EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito y sin o con poca fiebre.

### **ECAD (*Escherichia coli de adherencia difusa*)**

Las cepas de *E. coli* patógenas más difíciles de clasificar son las difusamente adherentes (ECAD). Estas cepas inducen la formación de estructuras como dedos en las células epiteliales del intestino, que embeben a la bacteria. Estas cepas son causantes de diarrea líquida, principalmente en niños (*Salyers & Whitt, 1994; Beinke y cols., 1998*).

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman micro-colonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El grupo ECAD se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante

en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.

### **3.3) Meningitis neonatal**

*E. coli*, junto con *Streptococcus agalactiae* y *Listeria monocytogenes*, representan la causa más común de meningitis neonatal; el 75% de las cepas causales poseen el antígeno capsular K1. Se piensa que el antígeno capsular K1 confiere escasa inmunogenicidad, lo que reduciría la vulnerabilidad de estas cepas a la lisis por el complemento (*Tratado de enfermedades infecciosas y microbiología clínica-SEIMC, 2005*).

Aunque es común la colonización de los lactantes por *E. coli* en el momento del parto, la enfermedad resulta relativamente poco frecuente, pero si se produce puede llevar a la muerte o a complicaciones neurológicas severas (*Stenutz R. y cols., 2006*).

### **3.4) Septicemia- bacteriemia**

*E. coli* es la primera causa de bacteriemia de adquisición comunitaria (29%) y una de las principales causas de bacteriemias nosocomiales (5,7%) según un estudio realizado por la Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (*Tratado de enfermedades infecciosas y microbiología clínica-SEIMC, 2005*).

*E. coli* es el bacilo gram negativo aislado con más frecuencia en pacientes con procesos generalizados, bacteriemias y sepsis. El foco de infección desde el que los microorganismos se diseminan al torrente sanguíneo, se localiza habitualmente en el tracto urinario o en el gastrointestinal. La mortalidad por septicemia debida a *E. coli* depende de la fuente de infección y la enfermedad subyacente del paciente, y es significativamente más alta en los enfermos inmunodeprimidos o con infecciones debidas a perforación intestinal.

### **3.5) Otras infecciones**

También es agente en infecciones biliares, peritoneales, de cualquier infección supurada como peritonitis, colangitis, colecistitis, empiema, infección de partes blandas, osteomielitis, artritis, neumonía, otitis, endoftalmitis, etc.

Las infecciones extraintestinales ocurren cuando hay circunstancias predisponentes como obstrucción y éstasis de vías urinarias y biliares, disminución de los mecanismos defensivos, etc.

# 2

## PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS: *Escherichia coli*

### Componentes de la pared celular de *Escherichia coli*:

#### 2.1 Introducción

#### 2.2 Estructura del peptidoglicano

#### 2.3 Periplasma

#### 2.4 Membrana externa

##### 2.4.1 Lipopolisacárido

##### 2.4.2 Proteínas

###### 2.4.2.1- Porinas: OmpF y OmpC

###### 2.4.2.2- TolC

###### 2.4.2.3- Proteínas canal específico

###### 2.4.2.4- OmpA

##### 2.4.3 Papel de la membrana externa en la permeabilidad y resistencia a los antimicrobianos.

### 2.1 Introducción

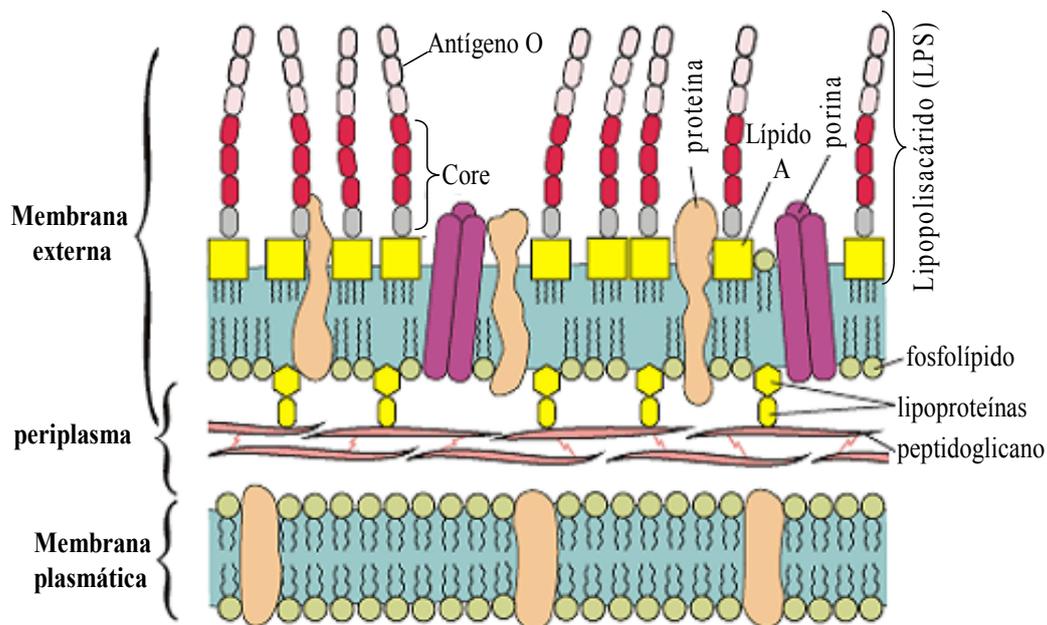
La pared celular es una estructura múltiple, compleja y semirrígida, que consta de varios estratos, situada exteriormente a la membrana citoplasmática que constituye el exoesqueleto de la bacteria. Esta estructura es la que en la célula bacteriana da la forma y protege a las bacterias de la lisis osmótica. También actúa como filtro, impidiendo la entrada de macromoléculas pero no el paso de agua y metabolitos esenciales, e interviene en el movimiento y en la división celular.

La pared celular de muchos microorganismos patógenos posee componentes que contribuyen a su patogenicidad, tiene importancia como factor de adherencia a superficies epiteliales y sobre ella van a actuar ciertos antimicrobianos así como bacteriófagos. La pared puede proteger a la célula frente a sustancias tóxicas y es el lugar de acción de varios antibióticos.

La pared de una célula bacteriana gram negativa (Fig. 1) está compuesta por dos capas fácilmente distinguibles, la exterior es la membrana externa, estructura bilaminar exclusiva de procariontes gram negativos y compuesta por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas. La segunda capa está situada internamente a la membrana externa y compuesta de un fino estrato

monomolecular de peptidoglicano que equivale sólo al 5-10 % del peso seco de la pared.

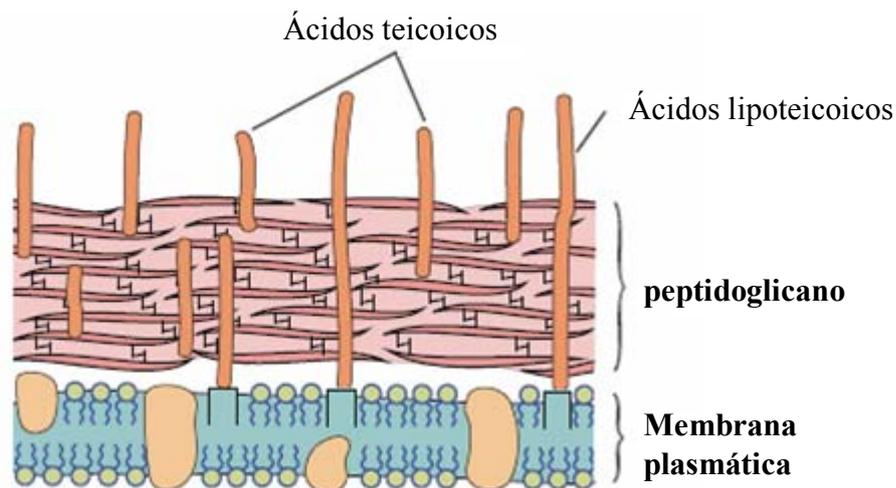
El espacio entre la membrana externa y la membrana citoplasmática se conoce como periplasma, en el que se encuentran una amplia variedad de enzimas y proteínas importantes para el metabolismo bacteriano (*García Rodríguez JA. & Bellido Muñoz JL., 1996; Prescott LM., 5ta edición*).



**Fig. 1:** Representación esquemática de la pared de las bacterias Gram negativas: formada por 2 bicapas lipídicas, la membrana externa e interna, separadas por el periplasma que contiene el peptidoglicano. La membrana externa es asimétrica, con la cara interna constituida por fosfolípidos y la externa por el lipopolisacárido. (Modificada de Prescott LM., 5ta edición)

A diferencia de las bacterias gram negativas, la pared celular de las bacterias gram-positivas (Fig. 2) es menos compleja y está compuesta principalmente por:

- **Ácidos teicoicos** son polímeros que están entrelazados en la capa de peptidoglicano y se extiende en forma de cilios más allá de la superficie de las células.
- La capa de **peptidoglicano**, o capa de mureína, de las bacterias gram-positivas es mucho más gruesa que la de las bacterias gram-negativas. Es responsable de mantener la forma del microorganismo.



**Fig. 2:** Representación esquemática de la pared de las bacterias Gram positivas. (Modificada de Prescott LM., 5ta edición)

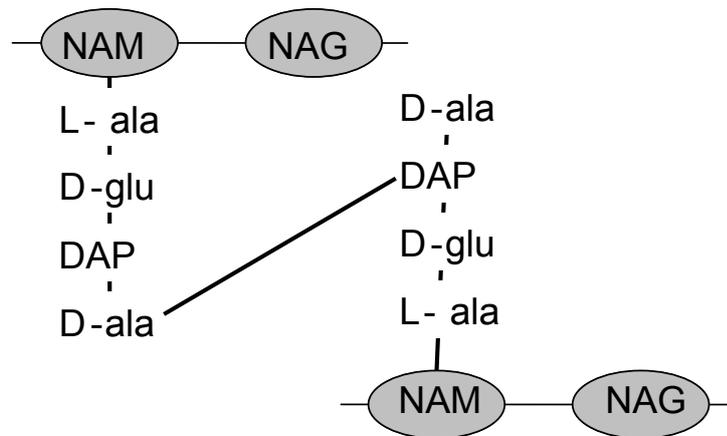
## 2.2 Estructura del peptidoglicano:

El peptidoglicano o mureína es un heteropolímero compuesto por muchas subunidades idénticas. El polímero contiene dos derivados de azúcar, N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM: éter lactilo de N-acetilglucosamina) unidos por enlace  $\beta$  1-4 y varios aminoácidos, tres de los cuales: ácido D-glutámico, D-alanina y ácido meso-diaminopimélico (DAP), no están presentes en las proteínas (Fig. 3B) (Parsons LM. ,2006). La presencia de D-aminoácidos las protege frente a la mayoría de las peptidasas.

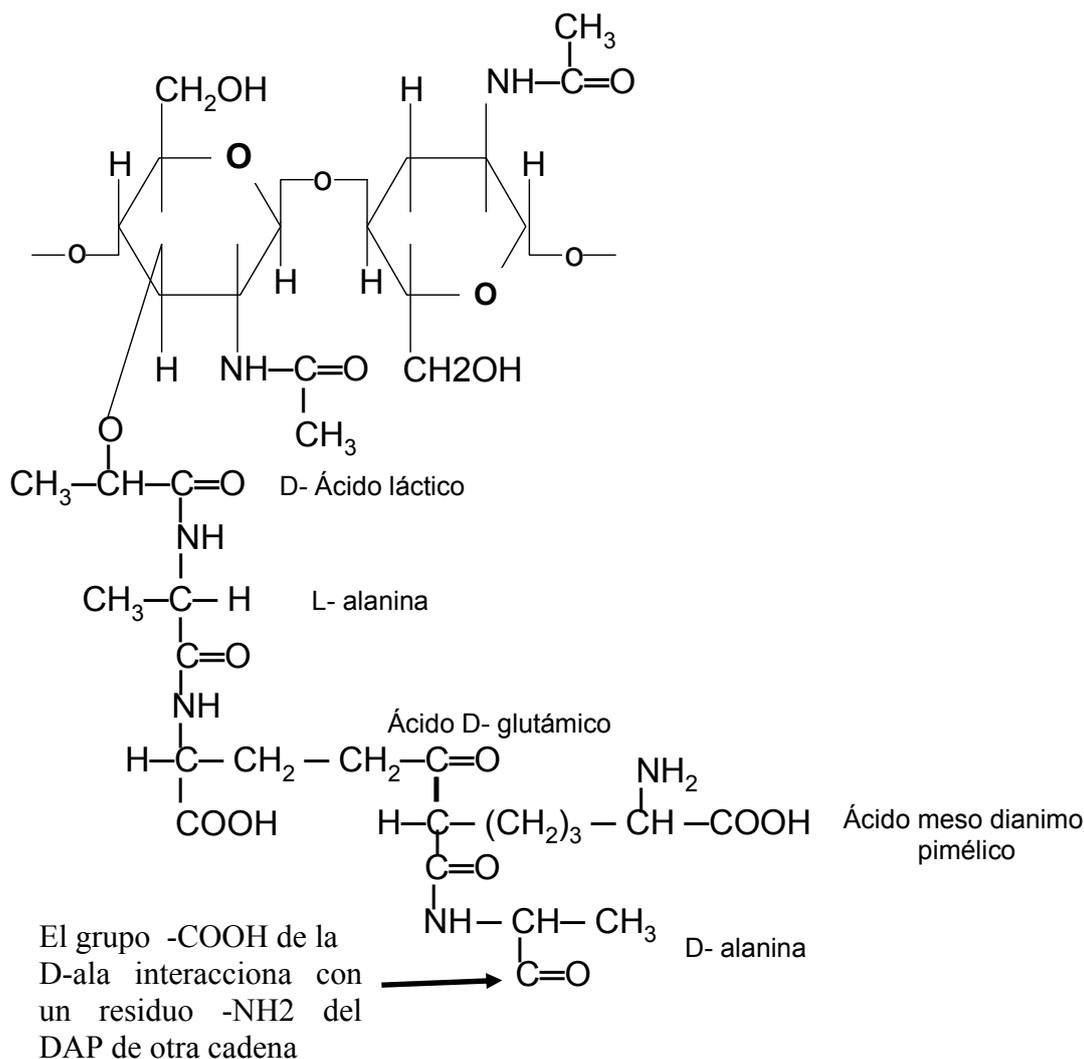
En las bacterias gram negativas, las cadenas peptídicas están interconectadas entre si, mediante un puente entre el grupo carboxilo terminal de una D-alanina (D-ala) con el grupo amino de un ácido meso diaminopimélico (DAP) de la otra (Fig. 3A), por estos entrecruzamientos es como se le da rigidez a la estructura (García Rodríguez JA., 1991; Prescott LM., 5ta edición; Stanier RY. y cols., 1991; Denyer SP. ,2002).

La capa de peptidoglicano de la pared lleva una pequeña lipoproteína específica de peso molecular 7,2 kDa, llamada lipoproteína del peptidoglicano o lipoproteína de Braun, que está incluida en la membrana externa por su extremo graso hidrofóbico. La membrana externa y el peptidoglicano están tan firmemente unidos por esta lipoproteína que pueden aislarse como una unidad. Esta lipoproteína es muy abundante, aproximadamente  $7 \times 10^5$  moléculas por célula, de las cuales aproximadamente un tercio están unidas al peptidoglicano (Nikaido H. y

*cols.*, 1997), pero a pesar de su abundancia y su función estructural aparentemente no es una molécula esencial para la supervivencia de las bacterias, pues se han aislado mutantes carentes de ellas (*Stanier RY. y cols.*, 1991). Además recientemente se ha descrito otras proteínas que interaccionan no covalentemente con el peptidoglicano a través de sus dominios periplásmicos, entre las que podemos mencionar a las proteínas de membrana externa Pal y OmpA , así como la proteína de membrana interna MotB y otras proteínas con funciones desconocidas hasta el momento (*Parsons LM.*, 2006).



**Fig. 3A:** Entrecruzamientos en el peptidoglicano de *E. coli* con enlace directo, típico de muchas bacterias Gram negativas. (Modificado de Prescott LM., 5<sup>ta</sup> edición).



**Fig. 3B:** Representación esquemática de la estructura del peptidoglicano de la pared celular de bacterias gram-negativas (Modificado de Prescott LM., 5<sup>a</sup> edición).

### 2.3 Periplasma:

Entre la membrana externa y la membrana celular de las bacterias gram negativas se crea un compartimiento virtual, llamado espacio periplásmico, es una matriz que incluye al peptidoglicano, pero además contiene proteínas y polisacáridos que facilitan la nutrición, transporte y mantenimiento de la pared celular y también inactivan compuestos tóxicos para la célula (Denyer S., 2002).

Este compartimiento contiene muchas proteínas que participan en la captación de nutrientes, por ejemplo, enzimas hidrolíticas como nucleasas, fosfatasas, proteasas, catalasas, y proteínas ligadoras que capturan azúcares, aminoácidos, vitaminas e iones inorgánicos hacia el interior de la célula. Asimismo podemos encontrar enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano y en la

modificación de compuestos tóxicos para la célula y sustancias de secreción (*Prescott LM., 5ta edición; Denyer S., 2002*). Además es el lugar donde se hallan las enzimas  $\beta$ -lactamasas responsables de la resistencia de muchos microorganismos a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Este compartimiento acuoso provee también de un micro ambiente formado por pequeñas moléculas que actúan como amortiguadores (buffer) frente a los cambios que suceden localmente, es decir que el periplasma no es un sitio estático sino un compartimiento celular dinámico que cambia en respuesta a estímulos internos y externos (*Tikhonova E. & Zgurskaya H., 2004*). El periplasma incluye oligosacáridos cargados negativamente que juegan un importante papel en la osmoregulación en las bacterias gram negativas. Este espacio parece ser iso-osmótico con el citoplasma al menos en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (*Denyer S., 2002*).

El espesor total del espacio periplásmico oscila entre 30 y 70 nm y se estima puede constituir el 20-40% del volumen celular total (*Nikaido H., 1985*).

## **2.4 Membrana externa:**

La membrana externa es una bicapa lipídica asimétrica, la capa interna está compuesta por fosfolípidos de composición similar a los de la membrana interna, en contraste, la capa externa contiene principalmente moléculas de lipopolisacárido (LPS) entre otros constituyentes (*Koebnik R. y cols., 2000*).

Además de los lípidos, en la membrana podemos encontrar diferentes tipos de proteínas, algunas atraviesan completamente la membrana “proteínas transmembrana”, como es el ejemplo de las proteínas conocidas como porinas, principales canales de incorporación de sustancias hidrofílicas menores a 700 Da., las moléculas de mayor tamaño difunden a través de “proteínas de canal específico”.

Otro tipo de proteínas son las “integrales” que parecen estar implicadas en el mantenimiento de la estructura de las membranas y de la pared bacteriana.

Las proteínas “periféricas” o de superficie, tienen la función de actuar como diana para determinadas sustancias o elementos como los fagos (*Hancock R., 1997*).

Inmersa en la membrana externa encontramos la lipoproteína de Braun, que interacciona con el peptidoglicano dándole rigidez a la estructura (*García Rodríguez JA. & Bellido Muñoz JL., 1996; Murray P. y cols., 1997*). Como mencionamos anteriormente Pal y OmpA también interaccionan de manera no

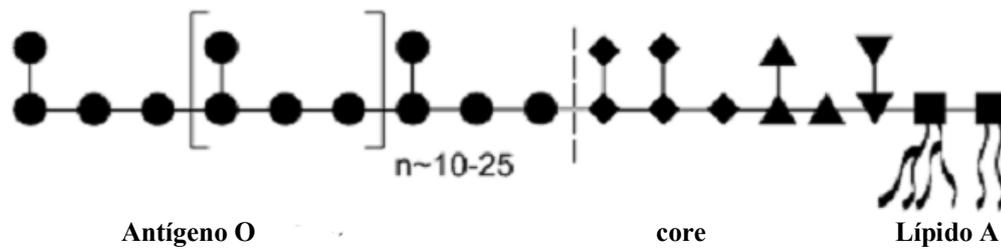
covalente con el peptidoglicano aumentando así la estabilidad. Pal es parte de las proteínas codificadas por el operon Pal/Tol, que incluyen TolA, TolB, TolQ y TolR. TolB es una proteína periplásmica, y se ha propuesto como puente de unión de los dominios C-terminal de TolA y Pal formando otra posible unión estructural entre la membrana interna y externa. Además debemos hacer mención a estas proteínas puesto que recientemente se ha demostrado que Pal y TolA son requeridas para la adecuada expresión del antígeno O del LPS en cepas de *E. coli* (Parsons LM., 2006). Pal es uno de los componentes que libera *E. coli* durante la sepsis y contribuye a la inflamación por lo que a su vez es un factor de virulencia.

### **2.4.1-Lipopolisacárido (LPS):**

Las moléculas de LPS son grandes y complejas, situadas en la hoja externa de la membrana externa y por lo tanto en contacto con el medio que rodea a la bacteria, son moléculas anfipáticas y con carga neta negativa (Denyer S., 2002). El LPS es un polianión estabilizado por cationes divalentes. La densidad de azúcares y de cadenas laterales del LPS organizan un filtro eficaz para moléculas hidrofílicas (Pagès y cols., 2004). La presencia del LPS en la membrana externa le otorga características de permeabilidad reducida respecto de membranas clásicas compuestas únicamente por fosfolípidos.

El LPS está formado por 3 regiones diferentes, como se muestra en la figura N° 4 (García Rodríguez JA., 1991; Stenutz R. y cols., 2006):

- 1- Lípido A (hidrofóbico)
- 2- Core o polisacárido central R
- 3- Cadena lateral O, antígeno O o polisacárido específico O (hidrofílico)



Referencias: GlcN (■), Kdo (▼), heptosa (▲), hexosa (◆), componentes del antígeno O (●).

**Fig. 4:** Representación esquemática del LPS de la membrana externa de bacterias gram negativas, mostrando las 3 regiones parte: antígeno O, Core y lípido A. (Modificado de Stenutz R. y cols., 2006).

**Lípido A:** región hidrófoba y lipídica del LPS, que se encuentra inserta en la membrana externa por lo que actúa como anclaje a la membrana, contiene dos derivados fosforilados del azúcar glucosamina, los grupos hidroxilos de éstos se unen a tres ácidos grasos en su mayoría 3-hidroxiácidos, cuyos grupos  $\beta$ -hidroxilos son a su vez esterificados por otros ácidos grasos (no  $\beta$ -hidroxílicos), originando la estructura característica 3-acil-oxil-acil. Por lo que el lípido A contiene seis o siete ácidos grasos en vez de los dos típicos de los fosfolípidos, y éstos son todos saturados. Algunos de estos ácidos se unen directamente al dímero de glucosamina y otros lo hacen esterificando a los 3-hidroxiácidos grasos.

Esta estructura hidrofóbica no varía considerablemente entre las bacterias gram negativas, aunque la composición de fosfatos puede si puede diferir. Es un importante componente dentro de la estructura del LPS y su delección genera incrementos en la susceptibilidad a antibióticos hidrofóbicos (Denyer S., 2002).

**Core:** es el polisacárido central que está unido al lípido A, es bastante estable entre las especies y está compuesto por una corta cadena de azúcares dos de los cuales son, el ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) exclusivo el LPS y una heptosa. La parte más exterior del Core consiste mayoritariamente por hexosas. Esta región central R presenta varios grupos aniónicos, y queda unida a la posición 6 de un resto de glucosamina del lípido A.

**Antígeno O:** es una cadena polisacáridica más o menos larga que está unida a la región central R y se extiende hacia fuera del núcleo, puede poseer diferentes azúcares dependiendo de la especie bacteriana, generalmente consiste en 10-25 unidades repetidas que contienen de 2 a 7 residuos de azúcar (*Stenutz R. y cols., 2006*). Este carbohidrato es antigénico y constituye el antígeno somático, uno de los antígenos fundamentales de las bacterias gram negativas. Su especificidad varía con el número, composición y secuencia de sus azúcares, basándose en ello la serotipificación de muchas especies bacterianas gram negativas, como es el caso del género *Salmonella*.

El antígeno O le confiere a la superficie bacteriana un carácter hidrofílico que evita la penetración de compuestos lesivos hidrofóbicos, como las sales biliares y algunos antimicrobianos, además actúa como receptor de bacteriófagos y también es importante en la respuesta inmune del hospedador (*Gabrielle S. & Reeves P., 2003*).

Los cationes juegan un rol vital en la organización y en el mantenimiento del LPS. Los iones como el sodio, potasio, calcio y sobre todo el magnesio, estabilizan la membrana, de tal manera que si eliminamos estos iones quelantes podremos disociar totalmente la membrana externa, y de lo contrario si añadimos magnesio la estabilizamos, esto es debido a que la parte proximal del sacárido del LPS tiene grupos cargados negativamente que se solapan y producen fuertes repulsiones electrostáticas entre las moléculas del LPS. Los cationes se sitúan entre ellos y evitan las repulsiones (*Nikaido H., 1985*).

**Funciones del LPS y papel en la resistencia a antimicrobianos:** El LPS es importante por varias razones, una es la de defensa frente al sistema inmune del hospedador, puesto que la bacteria puede cambiar la naturaleza de las cadenas laterales O para evitar la acción de los anticuerpos producidos por el hospedador, pero además contribuye a la carga negativa de la superficie bacteriana, ya que el polisacárido central contiene azúcares cargados y fosfato (*Bond P.J. & Sansom M., 2004*) que le confieren a esta molécula una apreciable carga electrostática negativa a pH neutro que junto a los cationes divalentes calcio y magnesio también facilitan la estabilización de la estructura de la membrana. Además el lípido A puede actuar como endotoxina, por lo que es responsable de la toxicidad y del shock séptico que se desarrolla en algunas de las infecciones producidas por bacterias gram negativas.

El LPS posee una estructura compleja y se ha observado que cambios en ésta pueden modificar la velocidad de difusión de los antimicrobianos a través de la membrana.

Muchas de las bacterias gram negativas son resistentes a ciertos antibióticos anfipáticos e hidrofóbicos porque no pueden penetrar la membrana externa, se observó que mutaciones en el LPS que hacen que se pierdan la mayoría de los azúcares de la región del Core (mutantes rugosas), pueden incrementar la permeabilidad de la membrana a estos compuestos y por lo tanto estas cepas mutantes son más susceptibles a compuestos hidrofóbicos como novobiocina, rifampicina y eritromicina (*Nikaido H., 2005*), esto puede deberse a que hay menores interacciones entre las moléculas de LPS (*Rocque Warren J. y cols., 1988; Peterson A. y cols., 1987*) o a que la capa externa de la membrana externa tenga un nivel incrementado de fosfolípidos que generan una membrana más permeable que lo normal (*Nikaido H., 2005*), asimismo en estas cepas mutantes no se observan incrementos en la susceptibilidad a compuestos hidrofílicos, incluso en la bibliografía se mencionaron casos donde se incrementaba la resistencia a compuestos como penicilina, ampicilina, cefalotina y tetraciclina. Esto último puede deberse a que estas cepas mutantes presentan una expresión disminuida de las porinas de su membrana externa (*Nikaido H. & Vaara M., 1985*). Se ha descrito que es necesario un cierto nivel de síntesis del lípido A para una adecuada síntesis, transporte o ensamblado de los trímeros de porina F en la membrana externa (*Nurminen M. & Vaara M., 1997*), se ha demostrado que la síntesis de un polisacárido con oligosacáridos defectuosos en el Core, no altera la síntesis de OmpA, pero sí reduce la de OmpF y OmpC (*Ried G. y cols., 1990*).

Mutaciones en los genes que codifican al LPS contribuyen a la resistencia intrínseca a antimicrobianos, diversos estudios sugieren que cambios en la región O del LPS hacen que cambie la carga y estructura del polisacárido externo con un concomitante incremento en la resistencia a ciertos antibióticos. Dichos cambios se producen generalmente en respuesta a la presión selectiva que ejercen los antimicrobianos que llevan a mutaciones en los genes responsables de la síntesis y ensamblado del LPS en la membrana externa. Este tipo de cambios se piensa que disminuyen la unión de antimicrobianos catiónicos, conduciendo a la resistencia a Polimixina B (*Gootz Thomas D., 2006*).

Asimismo se ha observado que en cepas mutantes resistentes a las nuevas quinolonas, de carácter más hidrofílicas que las anteriores, es de vital importancia la hidrofobicidad de la membrana externa, que está también determinada por el tipo de lipopolisacárido presente. Diferentes evidencias asocian los cambios en la estructura del LPS como un factor que contribuye a variar la sensibilidad a antimicrobianos como las quinolonas (*Tavio MM. y cols., 1999; Chenia HY. y cols., 2006*).

#### **2.4.2-Proteínas:**

Las proteínas que se encuentran en la membrana externa (OMPs) de las bacterias gram negativas, generalmente son diferentes a las que encontramos en la membrana citoplasmática y además poseen poca diversidad, pero estas proteínas se hayan en gran número por lo que constituyen el 50% de la masa de la membrana externa (*Koebnik R. y cols., 2000*), estas incluyen proteínas integrales de membrana, que como mencionamos anteriormente son esenciales para el mantenimiento de la integridad y selectiva permeabilidad de las membranas bacterianas, proteínas de canal específico, proteínas integrales y proteínas periféricas.

La proteína mas abundante en las enterobacterias es la lipoproteína de Braun (7.200 Da) y se encuentra en un gran número de copias con una función fundamentalmente estructural (*Osborn MJ., 1980*). Otras proteínas como la OmpA y las porinas también se expresan en niveles altos, mientras que la síntesis de otras puede ser inducida si fuera necesario, como las porinas PhoE y LamB, además encontramos proteínas componentes de sistemas de transporte, proteínas involucradas en la biogénesis de pilis y flagelos, con funciones enzimáticas (proteasa OmpT y fosfolipasa A), etc. (*Koebnik R. y cols., 2000*).

Las OMPs también juegan un importante rol en la patogénesis bacteriana y están involucradas en la adaptación de bacterias patógenas a diferentes condiciones ambientales, como a la presencia de antimicrobianos, la acción bactericida del suero, de sales biliares en el intestino, etc. (*Lin Jun y cols., 2002*).

Haciendo mención a algunos de los mecanismos en los que están involucradas las proteínas de membrana externa (OMPs):

- la OmpT es una proteasa asociada a membrana que cuya función es degradar a péptidos antimicrobianos cortos (AMPs) fuera de la célula. Estos péptidos catiónicos (AMPs) se encuentran presentes en diferentes especies, desde insectos

hasta mamíferos y pueden contactar directamente y distorsionar la membrana de la bacteria penetrando a través de la bicapa lipídica y conducir a la muerte celular, de manera que las bacterias gram negativas han desarrollado estrategias para evadir estos compuestos, una como mencionamos es la degradación de los AMPs por medio de la producción de una proteasa (OmpT en *E. coli*), la otra estrategia es por medio de la modificación de la superficie celular para prevenir la unión de los AMPs o disminuyendo la permeabilidad de la misma, como por ejemplo se puede modificar al lípido A para cambiar la fluidez de la membrana externa.

- Las OMPs se asocian también a la múltiple resistencia a antimicrobianos, pues forman parte de los sistemas de eflujo activo por los que es posible expeler fuera de la célula sustancias tóxicas. Como ejemplo podemos mencionar a TolC en *E. coli*, que analizaremos con más detalle en los próximos capítulos.

- Las OMPs también están involucradas en la resistencia al suero, pues las bacterias gram negativas han desarrollado múltiples estrategias para protegerse de los efectos bactericidas del complemento. La OmpX de *E. coli* pertenece al grupo de proteínas integrales de membrana que no sólo juega un importante papel en la adhesión e invasión sino que también promueve la resistencia bacteriana a los efectos bactericidas del complemento. Recientemente se ha demostrado que la sobre expresión de OmpX conduce a una menor expresión de OmpC y OmpF y disminuye la susceptibilidad a betalactámicos y otros antibióticos en cepas de *E. coli* (Viveiros M., 2007).

- La bilis es producida por el hígado y almacenada en la vesícula biliar para ser utilizada en la digestión de comidas y grasas en el intestino delgado, esta está compuesta por las sales biliares que funcionan como detergentes sobre las membranas de las enterobacterias, produciendo la muerte de ellas. Por lo que para evadir los efectos tóxicos de la bilis y adaptarse al lugar donde viven desarrollaron mecanismos de resistencia donde la membrana externa juega un importante rol. Las OMPs están involucradas en dicha resistencia puesto que contribuyen a una menor permeabilidad de estas sales a través de la membrana externa cuando la bacteria disminuye la expresión de las porinas en dicha membrana como es el caso de OmpF y OmpC en *E. coli*, o también participando en el mayor eflujo de las mismas fuera de la célula, puesto que también son componentes de los sistemas de expulsión de múltiples drogas como los sistemas de eflujo AcrAB-TolC y EmrAB-TolC en *E. coli* (Lin Jun y cols., 2002).

- En años recientes se han relacionado algunas de estas proteínas de membrana externa con los mecanismos de patogenicidad bacteriana. Así, las proteínas OmpC y OmpF de *E. coli* pueden actuar como modulinas al estimular la síntesis de citosinas (Henderson B. y cols., 1996; Williams K. y cols., 2000).

#### **2.4.2.1-Proteínas mayores en la membrana externa de *Escherichia coli*: OmpF y OmpC**

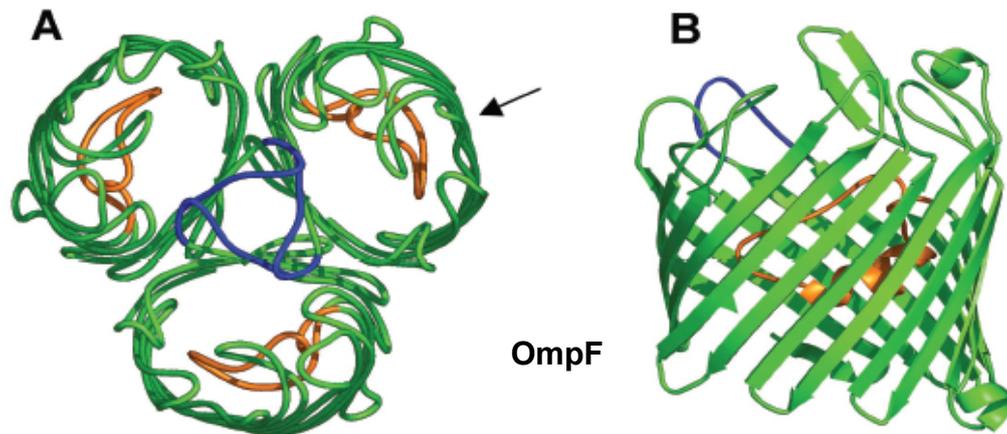
Son proteínas transmembrana situadas en la membrana externa de las bacterias gram negativas, y forman canales de difusión no específicos, pero selectivos puesto que permiten el paso de solutos pequeños (hasta 600 daltons) e hidrófilos, incluyendo la mayoría de los nutrientes (García Rodríguez JA. & Bellido Muñoz JL., 1996).

*Escherichia coli* produce tres porinas triméricas conocidas como: OmpF, OmpC y PhoE. Estas porinas presentan preferencias de sustratos en cuanto a la carga y al tamaño, las porinas OmpF y OmpC prefieren cationes sobre los aniones, mientras que la PhoE presenta mayor afinidad por los sustratos aniónicos. Además el tamaño de los poros que forman es diferente, oscila entre 1 y 1,2 nm, aunque puede llegar a 2 nm en el caso de la OmpF de *Pseudomonas aeruginosa* o en la OmpG de *E. coli* K12 (Fajardo DA. y cols., 1998; Mirsa R. & Benson SA., 1989).

La OmpF posee un poro ligeramente mayor (1,2 nm) al que produce la OmpC (1,1nm). Las porinas están formadas por trímeros de proteínas (Fig. 5A), en el que cada monómero tiene un peso molecular comprendido entre 32 y 48 kDa. Cada uno de estos monómeros consta de un canal cuyo poro se abre, por el lado extracelular, sobre la superficie externa de la membrana externa; posteriormente dicho canal se dirige hacia el centro del trímero de proteína, al nivel medio de la membrana externa, donde confluyen los tres canales que provienen de cada uno de los tres monómeros, en un único canal central que continúa su curso hasta desembocar, por el otro extremo del trímero de proteína, en la superficie de la hoja interna de la membrana externa, es decir, en el espacio periplásmico por donde aparece como un poro sencillo. Cada monómero es un auténtico canal acuoso que permite el paso de múltiples sustancias, desde iones hasta antibióticos. La difusión de los antibióticos a través de la membrana externa depende del número de moléculas de porinas presentes, de la naturaleza de dichas porinas en la que la composición en aminoácidos (carga y polaridad) condiciona fuertemente la arquitectura, y del

carácter funcional de la porina. Este carácter depende sobre todo de la composición del bucle L3 que determina el diámetro del canal que forma el poro, propiedades electrostáticas y deja pasar determinadas moléculas en función de su tamaño, su carga y su hidrofobicidad (*Vidal S. y cols., 2005; Nikaido H. & Vaara Marti, 1985; Koebnik R. y cols., 2000*), la diferencia de selectividad entre OmpF por cationes y de PhoE por aniones se debe a que PhoE presenta un residuo de Lisina en esta zona que es sustituida por una glicina en OmpF (*Wonpil Im & Benoît R., 2002*).

Mediante análisis cristalográfico se observó que los monómeros de porinas atraviesan la membrana como cilindros  $\beta$ , los que consisten en una serie de 16 cadenas  $\beta$  antiparalelas (figura 5B), con 8 loops cortos del periplásmicos y 8 loops largos del lado de la superficie celular que le confieren una significativa estabilidad y rigidez a la estructura (*Wonpil Im & Benoît R., 2002; Alcanraz A., 2004*). El contacto entre los monómeros es estabilizado por interacciones hidrofóbicas y polares (*Nikaido H., 2003*). Los extremos amino y carboxilo de las porinas se encuentran sobre el lado periplasmático, resultando en un número par de segmentos transmembrana. Las hebras transmembrana están conectadas por vueltas “turns” cortas (entre 1 y 12 residuos) en el lado periplasmático, en cambio los lazos o loops que conectan las hebras del lado externo son generalmente más largos (entre 2 y 46 residuos). En el caso de la porina OmpF y PhoE de *E. coli*, el lazo 3 es especialmente largo (33 residuos) y se pliega sobre el barril de manera de producir el cierre o estrechamiento del canal. Este lazo contribuye significativamente a las propiedades de permeabilidad del poro, como límite de exclusión y selectividad. De esa manera las características de este lazo, así como también de la zona de constricción del canal, pueden definir la preferencia de sustratos del mismo.



**Fig. 5:** *A: representación esquemática de la estructura de la OmpF en Escherichia coli. La flecha señala uno de los tres monómeros. B: figura donde se muestran las cadenas beta antiparalelas de la estructura de la OmpF (Nikaido H., 2003).*

### Otras porinas:

Pero además de las proteínas mayores, en la membrana externa de algunas cepas de *E. coli* también es posible encontrar otras porinas. Podemos mencionar como ejemplos la OmpG aislada de *E. coli K-12* que presenta características inusuales, puesto que primero pierde el loop 3 característico de las clásicas porinas triméricas, segundo presenta un canal inusualmente grande, y además se piensa que existe como monómero con estructura de barril  $\beta$  de 16 hebras transmembrana en la membrana externa, se supone que este gran poro es para el transporte de moléculas de oligosacáridos de mayor tamaño (Fajardo DA. y cols., 1998) ; otra porina caracterizada en *E. coli* es la OmpW, de sólo 191 residuos de aminoácidos (21 kDa) y pertenece a una familia de porinas de funciones biológicas aún desconocidas, aunque se supone es usada por la colicina como receptor (Pilsel H. y cols., 1999) y se sospecha que brindaría protección a la célula frente al estrés (Hong H. y cols., 2006).

## **Biosíntesis y regulación de las porinas OmpF y OmpC en cepas de *Escherichia coli***

La síntesis de las porinas está regulada por numerosos genes cuya expresión, a su vez, depende de las condiciones del medio en el que se encuentren las bacterias. Se sabe que la porina PhoE sólo se expresa en condiciones de privación del fosfato, puesto que el gen que la codifica *phoE* pertenece al regulón fosfato, en cambio la expresión de OmpF y OmpC suele estar multirregulada. Como se mencionó anteriormente *E. coli* es un comensal del tracto gastrointestinal del hombre y animales, donde la concentración de sales biliares oscila entre 4 y 16 mM. Las bacterias tienen que reducir el influjo de estas moléculas a la célula, debido a que tienen acción detergente sobre sus membranas.

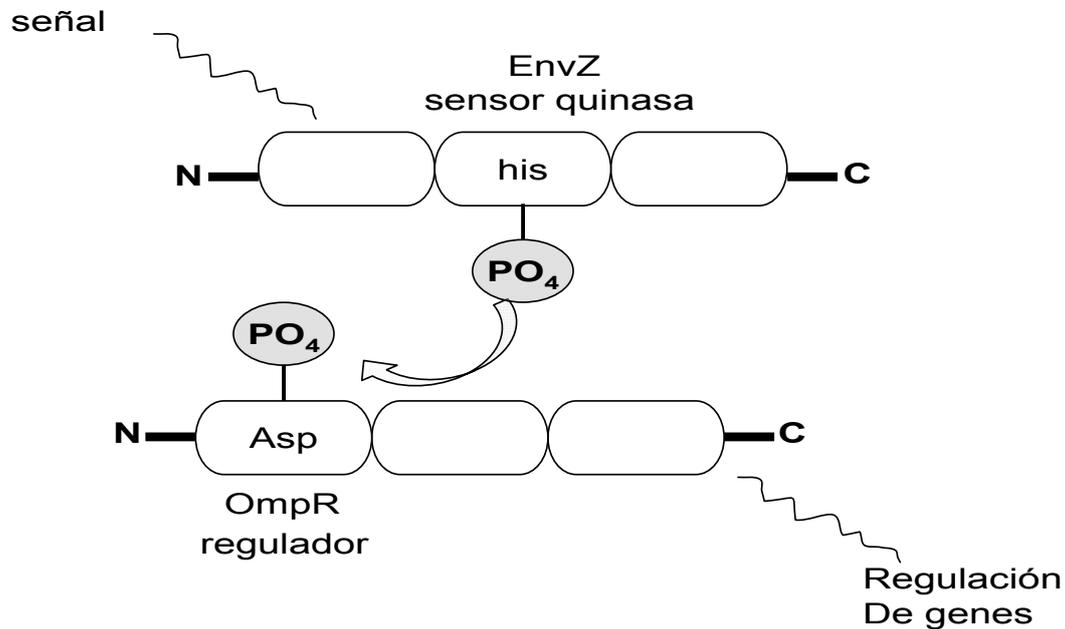
En estas condiciones de alta osmolaridad y alta temperatura, se ve favorecida la expresión de la porina C por sobre la porina F, puesto que la primera produce un poro de menor diámetro que la segunda (*Nikaido H., 2003*). La expresión de OmpF por el contrario se ve incrementada cuando las condiciones del entorno son de baja temperatura y baja osmolaridad, ya que así la bacteria se puede beneficiar del ingreso de nutrientes del entorno a la célula por medio de esta porina (*Nikaido H. & Vaara M., 1985*).

La expresión de estas porinas está controlada por diferentes condiciones ambientales, como ser el nivel osmótico, la temperatura, la anaerobiosis y el pH del medio.

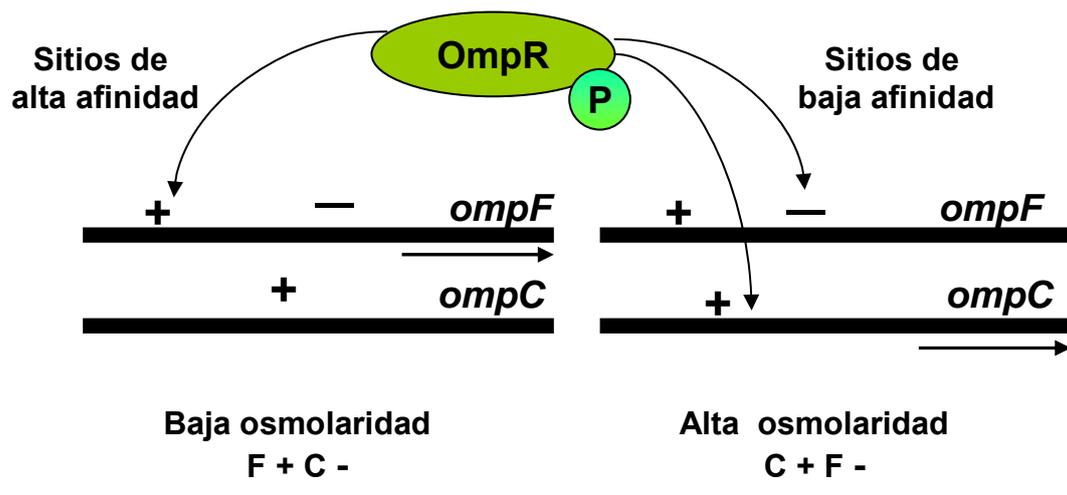
La regulación por presión osmótica involucra una proteína transmembrana asociada a la membrana interna EnvZ, que pertenece al sistema de dos componentes EnvZ-OmpR. EnvZ es una histidina quinasa bifuncional con actividad quinasa-fosfatasa y monitorea cambios en la osmolaridad del medio externo, cuando la osmolaridad del medio es alta, transfiere un grupo fosfato de alta energía a OmpR, esta fosforilación produce cambios en la conformación de OmpR y activa la capacidad de esta proteína citoplasmática para interactuar con sus genes blancos y así incrementar su transcripción, entre ellos se encuentran *ompF*, *ompC*, *tppB*, *fadL*, *flhDC*, y *csgD* (*Goh Ee-Been y cols., 2004; Rosner JL. y cols., 1991; Ferrario M. y cols 1995*). EnvZ también posee actividad fosfatasa, capaz de remover el grupo fosfato de OmpR-P (fosforilado), de manera que este

intercambio de actividades quinasa/fosfatasa en respuesta a los cambios ambientales es el responsable de controlar los niveles celulares de OmpR-P.

(Goh Ee-Been y cols., 2004).



**Fig. 6A:** Esquema de la fosforilación de OmpR en el residuo de Aspártico-55 presente en su extremo amino terminal, por medio del grupo fosfato presente en el residuo de histidina-243 presente en el extremo C-terminal de EnvZ (Srividhya KV. & Krishnaswamy S., 2004).



**Fig. 6B:** Esquema de la regulación de las porinas OmpF y OmpC en *E. coli* en función de la osmolaridad del medio.

Como se esquematiza en la figura 6A, en condiciones de alta osmolaridad la proteína EnvZ se autofosforila en el residuo de histidina-243 situado en el dominio quinasa C-terminal y luego le transfiere eficientemente este grupo fosfato al extremo N-terminal de OmpR, en el residuo de aspartato-55, formando un complejo EnvZ-OmpR. Es decir que en condiciones de alta osmolaridad la activada quinasa de EnvZ supera a la fosfatasa y por lo tanto la concentración de OmpR-P aumenta. OmpR-P se une no sólo a los sitios de alta afinidad presentes en *ompF* sino también a los de baja afinidad (Fig. 6B). La interacción con estos últimos conducen a la represión de *ompF* y por lo tanto la expresión de OmpF se ve interrumpida. Además OmpR-P interacciona con los sitios de baja afinidad presentes en *ompC*, por lo que se ve incrementada su transcripción y por ende la expresión de la porina C en la membrana, en cambio cuando la osmolaridad del medio es baja, la actividad fosfatasa de EnvZ es superior a la actividad quinasa, en estas condiciones hay relativamente poca cantidad de OmpR-P en la célula, por lo que se unen a los sitios de alta afinidad para OmpR-P presentes en *ompF*, incrementando así su transcripción y por lo tanto la expresión de la porina F en la membrana externa (Nikaido H., 2003; Srividhya KV. & Krishnaswamy S., 2004).

En cambio la regulación de la expresión de las porinas por la temperatura involucra otro mecanismo, en condiciones de alta temperatura se produce un incremento en la transcripción de un ARNm denominado *micF*, este ARN es complementario al ARNm que codifica a la porina OmpF, por lo que al unirse a él, se inhibe la traducción y por ende no se sintetiza la OmpF. Aunque *micF* también se encuentra incrementado en condiciones de estrés oxidativo y en presencia de salicilato.

En el intestino *E. coli* además de la osmolaridad se enfrenta a un ambiente de anaerobiosis, por que lo se observó que esta última modifica la osmoregulación de las porinas OmpF y OmpC. En condiciones de anaerobiosis la OmpC se expresa en mayor nivel aún cuando sea baja osmolaridad del medio, sin embargo en la represión de la porina F la actividad osmótica juega un papel más importante que la que desempeña la anaerobiosis. Esta regulación se produce también por la activación de OmpR, pero por otra proteína “AcrB” cuya funciones es registrar las condiciones de anaerobiosis del medio (Nikaido H., 2003; Matsubara M. y cols., 2000) y así permitir a la bacteria crecer en diferentes condiciones ambientales desfavorables.

En cuanto al pH del medio, podemos observar que cuando es ácido, aproximadamente 5,2, la producción de OmpF se reprime y se incrementa la de OmpC. Esta regulación es muy compleja y depende también de la fuente de carbono del medio, se supone que el mecanismo también es por medio de la fosforilación de OmpR en este caso por el acetil fosfato. Si bien la porina OmpC tiene un poro un tanto menor que el de la porina F, no debería suponer mucha diferencia en el influjo de protones, lo que se supone es los protones que ingresan serían neutralizados en el periplasma por medio del  $\gamma$ -aminobutirato un compuesto que proviene de la decarboxilación del glutamato en el citoplasma, y que actuaría como buffer, entonces el papel de la porina C sería el de retener a estos protones en el periplasma (Nikaido H., 2003).

También cabe hacer mención a otros sistemas que se describen en la bibliografía que también intervienen en la regulación de OmpF y OmpC. Recientemente se describió un sistema de dos componentes CpxA-CpxR que regula la expresión de porinas, este sistema responde a las diferentes condiciones asociadas al estrés que sufre de la envoltura celular, tal como pH alcalinos y superproducción de proteínas secretadas y también a la adhesión de células a las superficies. La regulación de la expresión de las porinas asociadas al estrés de la envoltura también está controlado por otro factor independiente denominado  $\sigma^E$ . Mientras que la activación de  $\sigma^E$  disminuye la expresión de *ompF* y *ompC*, la activación del operón *Cpx* resulta en una disminución en la expresión de *ompF* y un incremento en la expresión de *ompC* (Batchelor E. y cols., 2005).

Asimismo se observó que la síntesis de porinas se veía influenciada por la presencia de diferentes compuestos químicos presentes en el medio, el más conocido es el salicilato (Rosner JL. y cols., 1991), aunque se han caracterizado otros como diazepam, antimicrobianos, etc. (Tavío MM. y cols., 2004), pero se sabe que la regulación de las porinas en estos casos es porque se están involucradas alguna de las proteínas regulatorias que pertenecen a la familia XylS-AraC de activadores transcripcionales como son MarA, SoxS y Rob. Este mecanismo será comentado en el capítulo de mecanismos intrínsecos de resistencia: *operón marRAB*.

## **Papel de OmpF en la resistencia a antimicrobianos en *E. coli*:**

Como se mencionó anteriormente los solutos hidrofílicos atraviesan la membrana externa por medio de las porinas, preferentemente por OmpF. Como norma general se considera que un tamaño voluminoso, la carga negativa y un aumento de la hidrofobicidad retrasan la penetración de los antibacterianos en los microorganismos gram negativos a través de los canales de las porinas (*Hancock R., 1987*). Por otro lado, las moléculas hidrofóbicas parecen utilizar una ruta alternativa de difusión a través de lipopolisacáridos (*Chapman JS, 1988; Nikaido H., 1993*).

Algunos autores han demostrado que la hidrofobicidad de los compuestos parece tener relevancia tanto en gram positivos como en gram negativos, mientras que el elevado peso molecular es un factor limitante sólo para los microorganismos gram negativos, además la velocidad de difusión de estos antibacterianos a través de OmpF, varía con la distribución de la carga en la molécula del antimicrobiano (*Bazile S., 1992*).

Por lo que la ausencia o disminución de OmpF en la membrana externa de *E. coli* contribuye a disminuir la sensibilidad de la célula bacteriana a diferentes antimicrobianos que utilizan como vía de entrada, tales como tetraciclinas, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, quinolonas hidrofílicas, rifampicina, aminoglicósidos, etc. (*Cohen SP. y cols., 1988; George AM. y cols., 1995; Hooper DC. y cols., 1987; Nikaido H., 1989*).

### **Antibióticos $\beta$ -lactámicos:**

Si se comparan las formas zwitteriónicas y monoaniónicas de cefalosporinas y penicilinas podemos observar que en *E. coli* las drogas zwitteriónicas atraviesan la OmpF de 50 a 60 veces más rápido que las monoaniónicas que tienen un peso molecular similar (*Vidal S. y cols., 2005; Nestorovich EM. y cols., 2002*), por eso la velocidad de difusión a través de OmpF es mayor para ampicilina y cefalexina (drogas zwitteriónicas), que para cefuroxima-cefotaxima (monoaniónicos) y ceftazidima (dianiónico-monocatiónico) y ceftriaxona (dianiónico) (*Nitzan Y. y cols., 2002*). Se observó que antibióticos como ampicilina y amoxicilina (zwitteriónicas) poseen alta afinidad por la OmpF mientras que azlocilina, carbenicilina y piperacilina interaccionan débilmente con ella, por lo que tienen la menor velocidad de difusión a través de OmpF, y son consideradas inefectivas en

los tratamientos de infecciones producidas por *E. coli* (Nestorovich EM. y cols., 2002; Danelon C. y cols., 2006). Cuanto más hidrofóbico es el antibiótico  $\beta$ -lactámico menos efectivo es contra *E. coli*. (Nikaido H. y cols., 1983). Asimismo muchos de los  $\beta$ -lactámicos penetran más rápidamente a la célula por OmpF que por OmpC, como es el caso de la cefoxitina (Hiraoka M., 1989). Diversos estudios comprueban que en las bacterias Gram negativas la alteración de la permeabilidad por medio de un menor influjo de antibióticos a través de las porinas es una de las causas de resistencia a los antimicrobianos que utilizan esta vía de ingreso como ser los  $\beta$ -lactámicos, por lo que las mutantes deficientes en la porina F seleccionadas en el laboratorio son de 2-4 veces más resistentes a penicilinas y 2-8 veces a cefalosporinas (cefazolina, cefalotina, cefaloridina, cefoxitina, cefpirome) (Chapman J. & Georgopapadakou N., 1988; Jaffe A. y cols., 1982; Sawai T., 1982; Tavío MM. y cols., 1999), asimismo la pérdida de esta porina contribuye a incrementar la resistencia a carbapenemes como meropenem e Imipenem (Cornaglia G., 1992) observándose también una disminución en la sensibilidad 2-4 veces para estos fármacos cuando *E. coli* pierde OmpF (Poirel L. y cols., 2004; Sawai T., 1982). A su vez la carencia de la porina F ocasiona un incremento de la resistencia de hasta 4 veces para antibióticos monobactámicos como el aztreonam (Hiraoka M., 1989). Cuando OmpC y OmpF están disminuidas, las cepas de *E. coli* son hasta 32 veces más resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, mientras que la pérdida de la porina OmpC no modifica significativamente la CMI a estos antibióticos (Jaffe A. y cols., 1982).

Conviene destacar que cepas mutantes de *E. coli* con fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos “Mar” (del inglés “*multiple antibiotic resistant*”) expresan resistencias mediadas por cromosomas a una gran variedad de antimicrobianos hidrofóbicos e hidrofílicos estructuralmente no relacionados. Entre los cambios en la membrana externa que experimentan estas cepas mutantes encontramos que OmpF se encuentra reducida de una manera importante. Esto significa que en la reducción de OmpF también intervienen mutaciones en el operón *marRAB*, que hacen que *E. coli* adquiera resistencia a diferentes antibióticos, entre ellos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas. La activación de este operón lleva a que se produzcan resistencias cruzadas con otros antimicrobianos estructuralmente no relacionados. Asimismo el operon *marRAB* puede ser inducido por diferentes

compuestos como el salicilato, diazepam y benzoato de sodio entre otros, se ha observado que sometiendo a la cepa *E. coli* AG100 (OmpF +) a compuestos como salicilato 10mM, diazepam 0,25mM y benzoato de sodio 10mM, que son inductores de dicho operon, hacen que *E. coli* pierda la porina F y el patrón de resistencia que obtenido es comparable al de la cepa AG112 que es una cepa mutante de *E. coli* derivada de la AG100 pero carente de OmpF (Tavío MM. y cols., 2004).

### **Quinolonas:**

Pero la pérdida de la porina F además afecta la sensibilidad de otros antimicrobianos, el papel fundamental que ejercen los canales de las porinas en la difusión de quinolonas a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas según el tamaño y la carga característica de las quinolonas hidrofílicas, quedó respaldado por la observación de que varios mutantes que mostraban resistencias a estos agentes, tenían en común la reducción del número de OmpF, lo que demuestra que las quinolonas hidrofílicas deben entrar en la célula bacteriana, al menos en parte, a través del canal de la porina OmpF. Se ha descrito que la pérdida de porinas contribuye a incrementar de 2 - 8 veces la CMI (concentración inhibitoria mínima) para quinolonas como ácido nalidíxico, norfloxacin en cepas de *E. coli* (Tavío MM. y cols., 2004, Cohen S. y cols., 1989), aunque lo más frecuente es encontrar que la sensibilidad disminuye 2-4 veces respecto a la cepa origen (Tavío MM. y cols., 1999; Chapman J. & Georgopapadakou N., 1988). Para las cepas de *E. coli* que expresan fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos se observa que la resistencia a quinolonas se incrementa de 2 a 4 veces. Las quinolonas son fármacos que pertenecen a un grupo de agentes antibacterianos sintéticos usados para el tratamiento de varios tipos de infecciones tanto en humanos como animales y son de uso muy frecuente en el tratamiento de infecciones producidas por *E. coli*.

Estos fármacos ejercen su acción al penetrar en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos de las porinas o de la capa de los lipopolisacáridos (Nikaido H., 1993). Una vez en el interior de la célula actúan inhibiendo las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, formando un complejo ternario entre quinolona, enzima y ADN bloqueando el proceso de replicación del ADN (Hawkey PM., 2003) además al no poder

compactarse el ADN bacteriano se produce como resultado una carencia de espacio en el citoplasma bacteriano incapaz de contener la estructura del ADN sin enrollar.

Si bien los niveles de resistencia a las quinolonas por alteración en la permeabilidad por pérdida de OmpF son bajos (*Hawkey PM., 2003*), suelen considerarse como el primer paso en una serie de eventos que llevan a que las cepas de *E. coli* muten y adquieran valores de resistencia clínicamente significativos.

### **Tetraciclina:**

La Tetraciclina es un antibiótico bacteriostático que ejerce su efecto al poder unirse a la unidad 30S ribosómica y detener la síntesis proteica. Este fue uno de los antibióticos más usados entre los años 1950 y 1960 para tratar muchas infecciones producidas por bacterias gram negativas, pero hoy su uso o la de sus derivados están limitados puesto que se ha observado la aparición de resistencia en muchas de las bacterias clínicamente importantes.

Este antibiótico es de carácter lipofílico e ingresa a la célula asociado a iones magnesio por difusión a través de OmpF, en el espacio periplásmico se disocia de dicho ión liberando a la molécula de tetraciclina sin carga, un compuesto poco hidrofílico que es capaz de difundir por la membrana citoplasmática para llegar a su sitio de acción (*Chopra I. & Roberts M., 2001*). Por lo que uno de los mecanismos de resistencia es por la alteración de la OmpF limitando así el alcance de su sitio blanco. Diferentes estudios demuestran que la pérdida de esta porina en cepas de *E. coli* disminuye la sensibilidad de 4 a 16 veces para la tetraciclina (*Speer B. y cols., 1992; Thanassi D. y cols., 1995*) mientras que otros trabajos describen que el incremento en la resistencia es de 2 veces (*Sawai T., 1982; Tavío MM. y cols., 1999*).

### **Cloranfenicol:**

El cloranfenicol es otro fármaco que inhibe la síntesis proteica, éste se une a la subunidad 50S ribosómica, las cepas de *E. coli* con fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos que pierden la porina F también manifiestan resistencia cruzada a este fármaco viéndose disminuida la sensibilidad de 4 a 8 veces en comparación con la cepa origen (*Cohen S. y cols., 1988*).

La pérdida de la porina F en las cepas con fenotipo de múltiple resistencia a drogas, contribuye a incrementar la resistencia a diversos antibióticos como  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, a otras quinolonas, rifampicina, puromicina, etc., que ingresan a la célula preferentemente difundiendo por esta porina, sin embargo hay que tener presente que en estas cepas además la resistencia se debe a que se hiperexpresan diferentes sistemas de eflujo que expelen al exterior muchos de estos fármacos.

Asimismo las cepas de *E. coli* pueden expresar simultáneamente varios mecanismos de resistencia, teniendo entonces que evaluar el aporte de los otros mecanismos en el desarrollo de esta múltiple resistencia a antibióticos, como por ejemplo la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas, la modificación de las Proteínas de unión a penicilina (PBPs), la expresión de diferentes sistemas de eflujo activo, etc.

#### 2.4.2.2- TolC

Es una porina de membrana externa, implicada en una amplia variedad de funciones como influjo de colicin, secreción de  $\alpha$ -hemolisina y de factores de virulencia (*Baucheron S. y cols., 2005; Sharff A. y cols., 2001*), se la involucra en el transporte de las enterotoxinas estables al calor STI y STII de *E. coli* (*Yamanaka H., 2001*) así como en el eflujo de compuestos tóxicos para la bacteria como son los antimicrobianos (*Sharff A., 2001*) y en la regulación de porinas, además se postula que podría estar involucrada en la división cromosómica y en el súper enrollamiento del ADN. (*Augustus A. y cols., 2005, Greg G. & Rajeev M., 2001*).

TolC estructuralmente, es un homotrímero, que a diferencia de OmpF y OmpC, forma un solo canal o túnel que permite el paso de moléculas de mayor diámetro, hasta los 35 Å aproximadamente (*Augustus A. y cols., 2005*). TolC posee dos dominios separados, el segmento insertado en la membrana externa está compuesto por cadenas  $\beta$  mientras (40 Å) y la región que se extiende dentro del periplasma consiste primariamente por 12  $\alpha$ -hélices por monómero (100 Å) (*Touzé T. y cols., 2004; Koronakis V., 2003*). Ambos dominios forman un poro de 140 Å, y a diferencia de las porinas cada monómero constituye 1/3 de la estructura. (Fig. 7) (*Koronakis V., 2003; Eswaran J., 2004*). Se ha caracterizado un dominio ecuatorial por medio del cual interacciona con la proteína periplasmática cuando forman los complejos proteicos de expulsión activa de compuestos tóxicos (*Andersen C. y*

*cols.*, 2001) En la tabla 2 se enumeran algunas de las características estructurales de TolC en comparación con OmpF y OmpA.

Se ha demostrado que TolC es un componente indispensable para la actividad de la principal bomba de eflujo en AcrAB en *E. coli*, pero se presupone que esta porina no sólo interaccionaría con este sistema, sino que estaría involucrada en la interacción con diferentes tipos de translocasas de membrana interna dependiendo del sustrato que deba ser expulsado (*Recio-Fernández J. y cols.*, 2004).

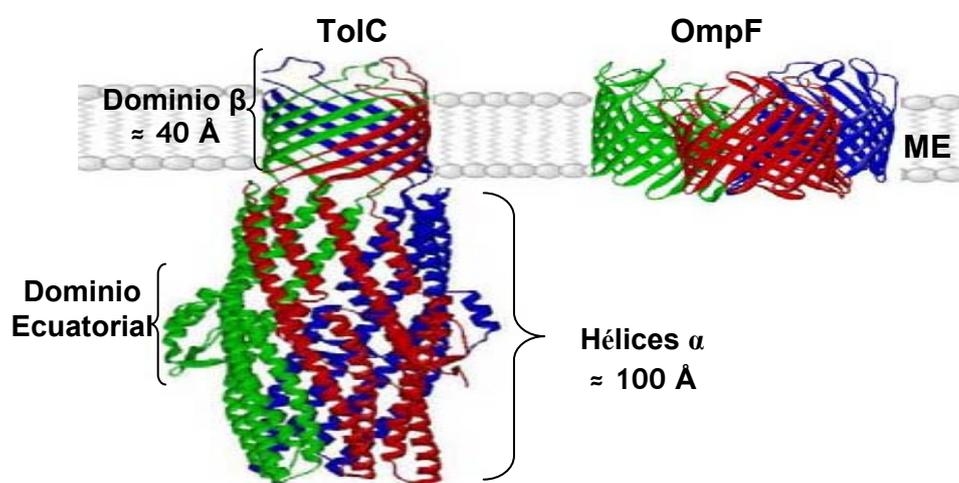
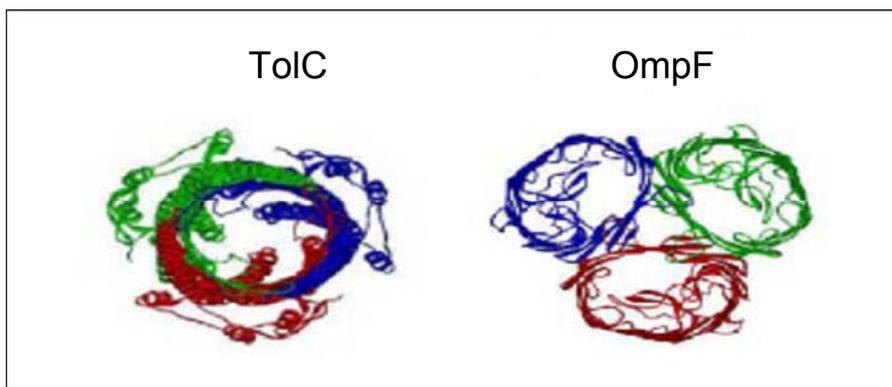
En *E. coli* los 5 sistemas RND (familia Resistencia-Nodulación-División): AcrAB, AcrEF, AcrD, MdtEF, MdtABC necesitan de TolC para sus funciones, como así también los dos sistemas MFS (Superfamilia Facilitadores Mayores): EmrAB, EmrKY y un sistema de eflujo de la familia ABC (ATP dependiente): MacAB (*Michán C. y cols.*, 2003; *Nishino K. y cols.*, 2003). Ver capítulo de *Sistemas de Eflujo: papel de TolC y sistemas de eflujo en la resistencia a múltiples antibióticos*.

En la tabla 1 se muestran algunos de los sistemas de eflujo de *E. coli* que interaccionan con la porina TolC y los sustratos correspondientes (*Koronakis V. y cols.*, 2004).

TolC podría ser un blanco en el desarrollo de inhibidores de sistemas de eflujo para bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos (*Baucheron S. y cols.*, 2005).

**Tabla 1:** *Sistemas de eflujo dependientes de TolC en Escherichia coli. MI: membrana interna, ME: membrana externa (Koronakis V. y cols., 2004)*

SUSTRATOS	SISTEMA DE EFLUJO (PROTEÍNAS DE ME Y MI)
Acriflavina, azitromicina, $\beta$ -lactámicos, sales biliares, Colato, Cloranfenicol, Cristal Violeta, Ciprofloxacina, Desoxicolato, bromuro de etidio, eritromicina, Ácidos grasos, fluoroquinolonas, ácido fusídico, ácido Nalidíxico, Novobiocina, Rifampicina, Tetraciclina, SDS, Triton X-100	AcrAB (RND)/TolC AcrEF (RND)/TolC
Cationes lipofílicos, CCCP, ácido Nalidíxico	EmrAB (MFS)/TolC
Macrólidos	MacAB (ABC)/TolC



**Fig. 7:** Estructura de las porinas TolC y OmpF en *E. coli* (Koronakis V., 2003)  
ME: membrana externa.

**Tabla 2:** Propiedades estructurales de TolC, OmpF y OmpA en *E. coli*. pS: conductancia en picoSiemens medida con 1M KCl o NaCl; n/a: no analizado (Koronakis V., 2003)

Propiedades	TolC	OmpF	OmpA
Largo (Å)	14	35	57
Radio (Å)	17,5	15,5	13
Número de poros	1	3	n/a
Número de monómeros	3	3	1
Cadenas β por monómero	4	16	8
Conductividad (pS)	80	840	n/a

## **TolC y el papel en la tolerancia a los solventes orgánicos**

Desde la revolución industrial la producción y uso de químicos se ha incrementado notablemente. Como consecuencia, se sintetizaron diferentes productos y químicos como herbicidas, insecticidas que se han introducido en el medio ambiente. Otros productos son los solventes orgánicos o combustibles que llegan a la biosfera por pérdidas durante el almacenaje, accidentes o por medio de la evaporación de los mismos. Todos estos compuestos tienen efectos tóxicos o carcinogénicos.

La toxicidad de un solvente se correlaciona con el logaritmo del coeficiente de partición del solvente en una mezcla octanol-agua ( $\log P_{ow}$ ). Solventes con un  $\log P_{ow}$  menor a 4, como el benceno, tolueno, octanol, xileno y estireno son extremadamente tóxicos para los microorganismos, pues estos se acumulan en la membrana citoplasmática y alteran la estructura de la misma. La principal función de la membrana es actuar como barrera de permeabilidad, regulando el pasaje de los solutos entre la célula y el medio externo, y es importante también en la transducción de energía. Los solventes orgánicos dañan la membrana perjudicando funciones vitales, como ser pérdida de iones, metabolitos, lípidos, proteínas, disipan también el gradiente de pH y el potencial eléctrico y además inhiben la función de diversas proteínas de la membrana.

Pero la toxicidad de un solvente no sólo depende de la toxicidad inherente del mismo, sino también de la tolerancia intrínseca que poseen las diferentes especies y cepas bacterianas. Por ejemplo la mayoría de los microorganismos son sensibles a los solventes con  $\log P_{ow}$  entre 2 y 3.3, sin embargo existen cepas de *Pseudomonas* que son resistentes a altas concentraciones de solventes como tolueno, xileno y estireno. (*Koronakis V. y cols., 2004*).

### **Eflujo activo de compuestos tóxicos por procesos dependiente de energía:**

Los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos para expulsar y detoxificar a las células y así poder subsistir ante situaciones de estrés como es la de crecer en un medio que contiene solventes orgánicos. Un grupo importante de estos mecanismos comprometen a los sistemas de eflujo de múltiples drogas (MDR). Dentro de los MDR, los sistemas de eflujo pertenecientes a la familia RND son cruciales para la tolerancia a los solventes orgánicos.

Las cepas de *E. coli* son en general muy sensibles a la mayoría de los solventes orgánicos, y la mayoría de ellas sólo sobreviven en presencia de solventes con un  $\log P_{ow}$  mayor o igual a 4, como el hexano (Koronakis V. y cols., 2004).

Muchos de los estudios utilizan a la cepa JA3100 de *E. coli* (genotipo: *F leuB trpC thr lac thi rpsL hsdS*) como cepa origen, esta cepa puede tolerar el hexano pero no puede crecer en presencia de ciclohexano, además la expresión de la OmpF en su membrana no esta sujeta a la osmoregulación por cloruro sódico (Asako y cols., 1997; Aono R. y cols., 1998). En estos trabajos se observó que cepas de *E. coli* JA3100 resistentes a ampicilina y cloranfenicol mostraban también tolerancia al ciclohexano ( $\log P_{ow}$  3.44). Estos resultados fueron los primeros indicios de la correlación existente entre la múltiple resistencia a antibióticos y la tolerancia a solventes orgánicos (Ramos J. y cols., 2002). Asimismo se realizaron diferentes estudios con cepas de *E. coli* resistentes a solventes orgánicos, que mostraron ser a su vez mutantes con fenotipo Mar (múltiple resistencia a antibióticos), algunas de ellas con mutaciones en *marR* (Hayashi S. y cols., 2003). En estas cepas la hiperexpresión del operón *marRAB*, produce a un aumento en la síntesis de la proteína MarA, que como se describirá posteriormente produce una disminución en la síntesis de la porina F (OmpF) y a un incremento en la expresión de sistemas de eflujo, entre ellas AcrAB (Oethinger M., 1998). Pero a pesar de que los niveles de OmpF disminuyen en las cepas mutantes Mar, éstos no están relacionados con la tolerancia a solventes orgánicos (Asako H., 1999).

Se observó que la exposición de *E. coli* a compuestos inductores del operón *marRAB* como el salicilato o a compuestos cíclicos redox inductores del sistema *soxRS* también incrementan la tolerancia a solventes orgánicos (Asako H. y cols., 1997), asimismo en otros estudios se observó que la sobre-expresión de los genes *marA*, *soxS* y *robA* en cepas de *E. coli* hipersensibles con delección del locus *mar*, restablecía la tolerancia al hexano y permitía su crecimiento en presencia de dicho solvente (White D. y cols., 1997). Se puede deducir entonces que la hiperexpresión de los genes *marA*, *soxS* y *robA* en cepas de *E. coli* además de generar resistencia de bajo nivel a múltiples antibióticos, están implicados de alguna manera en la tolerancia al ciclohexano. En estas cepas se pudo observar también que se regulaba positivamente el gen *tolC* (Aono R. y cols., 1998) relacionándose la sobre expresión de AcrAB-TolC con la resistencia a los solventes orgánicos (Hayashi S., y cols.,

2003; Aono R. y cols., 1998; Kobayashi K., 2001). En estudios más recientes se ha establecido que los diferentes sistemas de eflujo que interaccionan con TolC son los que están involucrados en la tolerancia a los solventes orgánicos donde TolC sería el elemento indispensable (Tsukagoshi N & Aono R., 2000).

Si bien TolC es el componente esencial en la maquinaria responsable de la tolerancia a solventes orgánicos, el incremento en la expresión de esta porina en la membrana externa por si solo no es efectivo, puesto que la tolerancia a los solventes orgánicos es un proceso dependiente de energía, se deben expresar además las otras proteínas (traslocasas y de fusión) para formar bombas de eflujo similares al complejo AcrAB-TolC (Aono R. y cols., 1998).

Los tres activadores transcripcionales MarA, SoxS y Rob pueden independientemente producir tolerancia a los solventes orgánicos en cepas de *E. coli*, pero todos requieren de AcrAB-TolC (White D. y cols., 1997).

Debido a la estrecha relación que existe entre la tolerancia a los solventes orgánicos y el incremento en el eflujo, es que la tolerancia a solventes puede ser usada como un marcador orientativo de la presencia de cepas con fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos (Aono R. y cols., 1998), asimismo como TolC es indispensable para que se manifieste la tolerancia al ciclohexano, esta medida además sirve como marcador orientativo de la hiperexpresión de esta porina de membrana externa.

**Pero cabe mencionar a los otros mecanismos propuestos en la bibliografía que pueden estar involucrados en la tolerancia a los solventes orgánicos:**

- **Biotransformación**
- **Rigidificación de la membrana celular**
- **Alteración de la superficie celular**
- **Formación de vesículas**

**1-Biotransformación:** Es decir el metabolismo de los compuestos tóxicos en otros que posean menor toxicidad. A pesar de que por medio de este mecanismo se pueda reducir la toxicidad de un compuesto, es la de menor importancia, pues se ha visto que un número importante de los microorganismos tolerantes no pueden metabolizar estos compuestos.

**2-Rigidificación de la membrana celular:** Por alteración de la composición fosfolipídica. La fluidez de la membrana de la bacteria se ve afectada por la

presencia de estos solventes, por lo que se ponen en marcha diferentes respuestas para tratar de reducir estos efectos, una de ellas es la isomerización *cis* a *trans* de los ácidos grasos insaturados, llevada a cabo por una enzima isomerasa. Esta constituye una respuesta a corto plazo. La respuesta a largo plazo involucra incrementos en el porcentaje de ácidos grasos saturados con respecto a los insaturados. Como consecuencia de estas dos respuestas la membrana tiende a hacerse más densa y compacta. Pero estos mecanismos constituyen más un mecanismo global de defensa que una estrategia específica para tolerar los solventes orgánicos. Además cepas de *Pseudomonas* no alteran el porcentaje de ácidos grasos saturados-insaturados en presencia de solventes orgánicos.

También pueden alterarse las cabezas polares de los fosfolípidos para alterar la rigidez de la membrana. Aunque este último mecanismo está menos estudiado.

**3-Alteración de la superficie celular:** Haciendo la célula menos permeable. El lipopolisacárido (LPS) es el principal constituyente de la membrana externa de las bacterias gram negativas y es considerado un mecanismo de defensa. In vitro se observó que la adición de iones magnesio y calcio a medios de crecimiento que poseían solventes orgánicos aumentaba la sobrevivencia de las bacterias presentes. Se presupone que estos cationes divalentes unen electrostáticamente a moléculas de LPS polianiónicas y así reducen la repulsión electrostática, generando una membrana más rígida y más compacta. Sin embargo no hay evidencia concluyente de que el LPS reduce el acceso de los solventes orgánicos al interior celular.

**4-Formación de vesículas:** Que remuevan dichos solventes. Recientemente se ha citado que cepas de *Pseudomonas sp.* tolerantes producen vesículas cuando son expuestas a tolueno. Se postula que estas vesículas son una respuesta específica para remover el tolueno de las cepas. Las vesículas consisten en fosfolípidos, LPS, y pequeñas cantidades de proteínas. Sin embargo aún no hay certeza de que la función de estas vesículas sea la de expulsar los solventes del citoplasma de dichas cepas.

### 2.4.2.3-Proteínas de canal específico

Además de los canales inespecíficos formados por las porinas, la membrana externa contiene canales formados por otras proteínas que constituyen sistemas de transporte específicos de alta afinidad para que las moléculas de mayor tamaño puedan difundir a través de la membrana. En la tabla 3 se exponen las más importantes en las cepas de *E. coli* (Nikaido H. & Vaara M., 1985; Stanier RY. y cols, 1991; Nikaido H., 2003).

LamB es una proteína transmembrana con un peso molecular de 47,4 kDa. Su composición en aminoácidos no es particularmente hidrofóbica y al igual que las porinas forma trímeros estables con estructura de hoja  $\beta$  con una asociación no covalente al peptidoglicano (Nikaido H., 1992). *E. coli* necesita de estos transportadores puesto que la velocidad con la que los nutrientes ingresan a la célula a través de las porinas OmpF y OmpC es directamente proporcional a la concentración del nutriente en el medio, y si la concentración es baja como sucede con la maltosa el ingreso es mínimo, por lo que este azúcar comenzará a degradarse en el intestino por las amilasas presentes. Por medio de estos transportadores específicos *E. coli* es capaz de incorporar a la célula fuentes de carbono importantes. LamB le confiere a *E. coli* no sólo la incorporación específica de maltosa sino que facilita el influjo de una gran variedad de carbohidratos cuando éstos existen en bajas concentraciones en el medio ambiente.

Un homólogo de LamB es ScrY, codificado por plásmidos que permite a las cepas de *E. coli* y *Salmonella* la utilización de sucrosa como fuente de carbono. Pero como siempre estos transportadores permiten el paso de más azúcares además de la sucrosa, como glucosa, fructosa, arabinosa, maltosa, lactosa, rafinosa y maltodextrinas.

Otros canales específicos que encontramos en *E. coli* son los Tsx (receptores del fago T6). Está pequeña proteína produce al ingreso de nucleósidos a la célula. La FadL en *E. coli* es aparentemente monomérica de mayor tamaño y se identificó como una proteína de membrana externa necesaria para la utilización de ácidos grasos de cadena larga como fuente de carbono.

Los sideróforos o la vitamina B12 son compuestos demasiado grandes como para pasar por el poro de las clásicas porinas de *E. coli*, por lo que estos

microorganismos utilizan para ello un sistema de transportadores denominados TonB (Koebnik R. y cols., 2000, Higgs P. y cols., 2002).

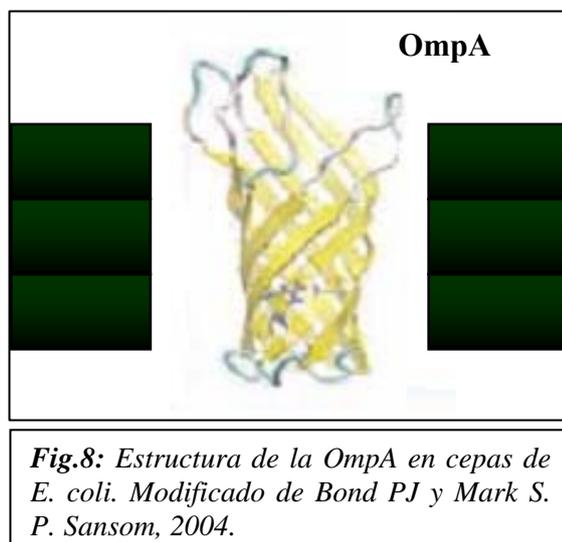
**Tabla 3:** Resumen de las características estructurales y funcionales de algunas de las porinas canal específico más importantes en *E. coli*.

Estructura y función	proteína	Especie bacteriana
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Específica para la entrada de maltosa y maltodextrinas</li> <li>•Maltoporina inducida por maltosa</li> <li>•Lugar de absorción del fago <math>\lambda</math></li> <li>•Diámetro d poro: 1,4 nm PM = 47 kDa</li> </ul>	<b>LamB</b>	<i>Escherichia coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Específica para la entrada por difusión de nucleósidos.</li> <li>•Lugar de absorción del fago T6</li> </ul>	<b>Tsx</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Específica para la entrada por dilución de ferricromo.</li> <li>•Lugar de absorción de los fagos T1 y T5</li> </ul>	<b>TonB ( FhuA)</b>	

#### 2.4.2.4- OmpA

OmpA es otra proteína monomérica (Fig.8) transmembrana muy abundante en la membrana externa, aproximadamente 100.000 copias por célula. Posee dos dominios, el N-terminal para anclarse a la membrana y el C-terminal de localización periplásmica (Koebnik R. y cols., 2000).

No es una porina y no parece tener las funciones que normalmente se le atribuyen a ellas , pero no ha sido definida con claridad su función fisiológica, sin embargo las cepas mutantes que carecen de esta proteína producen una membrana externa más frágil e inestable, por lo que parece que OmpA contribuye de algún modo a mantener la integridad



**Fig.8:** Estructura de la OmpA en cepas de *E. coli*. Modificado de Bond PJ y Mark S. P. Sansom, 2004.

estructural de la membrana externa y por ende estabiliza la forma de la bacteria (Nikaido H., 1991; Viveiros M., 2007 ), puesto que aparentemente hace de unión entre la esta y la capa de peptidoglicano.

Además parece ser necesaria en la conjugación mediada por el plásmido F para estabilizar el conjunto. No obstante la proteína OmpA inhibe la conjugación cuando se añade conjuntamente con el LPS. Se piensa que funciona como receptor para los fagos K3, M1, Ox2, TuII.

Cuando la proteína OmpA de *E. coli* se calienta a 100 °C, en presencia de SDS, su peso molecular aparente en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida se incrementa desde 28 kDa a 32 kDa. La adición de LPS a la OmpA calentada causa su renaturalización en la forma compacta y de migración rápida; aunque el LPS no es absolutamente necesario en este proceso puesto que el mismo fin se consigue en presencia de 0,3 M de NaCl.

En la proteína OmpA de *E. coli* la secuencia de residuos de aminoácidos de la posición 176 a 187 es la siguiente: Ala-Pro-Val-Val-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ma-Pro, la cual es muy semejante a la de la región “bisagra” de las inmunoglobulinas (Nikaido H. & Vaara M., 1985).

La proteína de membrana externa integral X (OmpX) de *E. coli* proviene de una familia altamente conservada de proteínas que promueven la adhesión y entrada de la bacteria a las células de mamíferos. Estas proteínas tienen un rol en la resistencia en contra del ataque del sistema de complemento humano. Estudios de su estructura cristalina muestran que tiene una misma topología beta-plegada de OmpA, aunque hay diferencias en el número de puentes de hidrógeno internos y su disposición (Vogt J. & Schulz G., 1999). También se le asocia un papel en la reasistencia antibiótica, puesto que se observó que la sobre expresión de OmpX en *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* condujo a una reducción de la expresión de las porinas principales, y por ende se encontró disminuida la susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y otros antibióticos (Dupont M. y cols., 2004; Viveiros M., 2007).

En la tabla N° 4 se comparan algunas características de OmpA con al OmpF y OmpX de *E. coli*.

**Tabla 4:** Análisis comparativo entre OmpA y otras porinas de *E. coli* (Koebnik R. y cols., 2000). ME: membrana externa, PG: peptidoglicano.

proteína	OmpA	OmpX	OmpF
<b>Función</b>	<b>unión física entre la ME y el PG</b>	<b>neutralización de las defensas del huésped</b>	<b>difusión de iones y otras moléculas pequeñas</b>
<b>Bacteriófagos</b>	<b>K3, M1, Ox2, Tull</b>	-	<b>K20</b>
<b>Bacteriocinas</b>	<b>Colicin K colicin L</b>	-	<b>Colicin N</b>
<b>estado oligomérico</b>	<b>monómero</b>	<b>monómero</b>	<b>homotrímero</b>
<b>Tamaño del dominio de membrana</b>	<b>171 residuos</b>	<b>148 residuos</b>	<b>340 residuos</b>
<b>Número de cadenas <math>\beta</math> transmembrana</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16</b>

### 2.4.3-Papel de la membrana externa en la permeabilidad y resistencia a antimicrobianos

Una de las funciones más importantes que tiene la membrana externa es la de barrera protectora, evitando o disminuyendo la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar la bacteria, pero también es más permeable a moléculas pequeñas como glucosa y otros monosacáridos, y esto se debe a la presencia de las porinas. La membrana externa a su vez evita la pérdida de constituyentes como las enzimas periplásmicas.

Algunos antimicrobianos, los de carácter más hidrofílico, como los  $\beta$ -lactámicos, pueden ingresar a la célula por difusión pasiva a través de las porinas, otros utilizan mecanismos de difusión facilitada y además existe un tercer sistema de penetración de sustancias llamado mecanismo de penetración autoactivada, que involucra compuestos policatiónicos, como los aminoglicósidos, las polimixinas y los péptidos policatiónicos naturales, éstas moléculas interactúan con los sitios de unión de los cationes divalentes situados en la superficie de las moléculas del LPS

y, debido a que tienen una afinidad por estos sitios de 2 a 4 veces mayor que la de dichos cationes, los desplazan competitivamente de su sitio. Esto induce una distorsión de la estructura de la membrana externa y la consecuente permeabilización de dicha membrana para una amplia variedad de compuestos, incluyendo moléculas hidrófobas, diversos antibióticos e incluso la lisozima (Hancock R., 1997; Nguyen Van JC. & Gutmann L., 1994).

Pero en la permeabilidad además están involucrados otros factores como la carga iónica del compuesto, la hidrofobicidad así como también el potencial de la membrana:

**El efecto de la carga iónica** es importante para la difusión a través de la membrana. Se ha descubierto que los solutos con carga negativa, atraviesan los canales de las porinas OmpF y OmpC de *E. coli* mucho más lentamente que las sustancias catiónicas; sin embargo, ocurre todo lo contrario al atravesar la porina PhoE, cuya producción está inducida por la carencia de fosfato. (Nikaido & Marti Vaara, 1985).

**Con respecto al efecto de la hidrofobicidad** se ha llegado a la conclusión de que la permeabilidad está en relación inversa a la hidrofobicidad del soluto. Es decir que cuanto más hidrofóbica es la sustancia, menor es la permeabilidad a través de la membrana. La relación varía, por supuesto, dependiendo del tamaño de la molécula, del tipo de porina y diámetro de su canal, de la especie bacteriana, e incluso de si la porina en cuestión pertenece a una célula viva o a un liposoma (Nikaido H. & Vaara M., 1985).

**El efecto del campo eléctrico** es interesante, pues se ha observado que aplicando diferencias de potencial de 130-140mV a membranas planas reconstituidas a partir de membranas externas, se puede conseguir el cierre de todos los canales de porinas, lo que indica que dicho canal está controlado por voltaje como en las porinas mitocondriales, también conocidas como VDAC (*voltage-dependent anion channel*) (Nikaido H. & Vaara M., 1985).

La alteración de la permeabilidad de la membrana externa las cepas de *E. coli* pueden adquirir resistencia a diversos compuestos entre ellos los antimicrobianos y así aumentar su supervivencia en ambientes de hostilidad. Uno de los mecanismos de resistencia es el de disminuir la entrada de estos agentes a la célula, de manera que no puedan interactuar con su sitio de acción y así no ejerzan su efecto. Como se mencionó anteriormente los compuestos más hidrofílicos utilizan las porinas

como vía de ingreso, por ende varios géneros de enterobacterias como resultado de la terapia clínica con estos antimicrobianos seleccionan cepas mutantes deficientes de porinas (*Cohen SP. y cols., 1989; Everett JM. y cols., 1996; Heisig P. y cols., 1996; Hirai K. y cols., 1986; Hirai K. y cols., 1986; Hooper DC. y cols., 1986; Jacoby GA. & Sutton L., 1985; Mortimer P. & Piddock L., 1993*), asimismo la bacteria puede expresar sistemas de expulsión activa que ayudan a expeler a los antimicrobianos que ingresan a la célula por las otras vías. Estos sistemas están formados por 3 proteínas, una de ellas en la membrana citoplasmática que actúa como bomba energética de baja especificidad, otra es una proteína de membrana externa (OMP) generalmente TolC y el tercer componente es una proteína periplásmica cuya función es la de unión o interacción entre las dos primeras. Por medio de estos sistemas de eflujo la bacteria puede adquirir resistencia a múltiples antibióticos como las fluoroquinolonas muy usadas en la terapéutica médica, pero estas bombas no sólo expelen al exterior antimicrobianos sino también otros compuestos que puedan ser tóxicos para la célula como son los solventes orgánicos (ciclohexano), colorantes, desinfectantes, etc.

Como podemos observar la membrana externa está íntimamente relacionada con los sistemas que la bacteria pone en juego para poder evadir la terapéutica antimicrobiana, así como para aumentar su supervivencia en ambientes en donde las condiciones externas les son desfavorables. Estos mecanismos serán comentados con más detalles en los capítulos sucesivos.

**3.1 Introducción****3.2 Tipos de resistencia****3.2.1- Resistencias cromosómicas****3.2.2- Resistencias extracromosómicas****3.3 Mecanismos generales de resistencia a antimicrobianos****3.3.1- Clasificación general de los antimicrobianos****3.3.2- Inactivación del antibiótico****3.3.3- Alteración de las barreras de permeabilidad  
(Entrada disminuida)****3.3.4- Incremento en el eflujo activo de los antimicrobianos****3.3.5- Alteración de la diana o lugar de acción del antibiótico****3.1 Introducción:**

En la segunda mitad de este siglo, el uso de agentes antimicrobianos ha contribuido sustancialmente a reducir la morbilidad y mortalidad de las enfermedades infecciosas; sin embargo, la selección de bacterias con resistencia natural y la adquisición y diseminación de mecanismos de resistencia por parte de cepas inicialmente sensibles a estos fármacos ha contribuido al aumento continuo de la prevalencia de microorganismos resistentes.

La resistencia a los antimicrobianos puede ser definida como una “condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antimicrobiano”. En los bacilos gram-negativos es un motivo de gran preocupación puesto que la aparición de resistencias a los antimicrobianos es muy rápida, incluso a los más modernos como cefalosporinas de tercera y cuarta generación y fluorquinolonas, todos ellos muy usados en los tratamientos farmacológicos de las infecciones producidas por estos microorganismos (*Philippon A. y cols., 1990*).

## 3.2 Tipos de resistencia bacteriana a antimicrobianos:

La resistencia bacteriana a antimicrobianos puede ser inducida o favorecida por factores ambientales o deberse a causas dependientes del microorganismo:

- **Resistencia ambiental o resistencia fenotípica:** es la debida a factores físico-químicos que pueden determinar que un antimicrobiano sea inactivo frente a una bacteria; así por ejemplo las concentraciones altas de NaCl favorecen la expresión de resistencia de estafilococos a isoxazolpenicilinas. Un cambio fenotípico implica a la mayoría de las células y no es hereditario.

La resistencia mas importante se debe a causas exclusivamente del microorganismo (**Resistencia genotípica**) entre ella podemos distinguir:

- **Natural o intrínseca:** es la que presentan algunas bacterias de forma preestablecida.

- **Adquirida:** es la debida a modificaciones en la carga genética de la bacteria y que puede aparecer tanto por mutación cromosómica como por fenómenos de transferencia de material genético por medio de plásmidos, transposones o integrones (*Dámaso D., 1990; Méndez García J., 1996*).

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede resultar de la alteración de la información genética endógena (mutación) o de la adquisición de información genética exógena.

### 3.2.1-Resistencias cromosómicas

#### **Mutación:**

Puede definirse como cualquier cambio de bases en la molécula de ADN. Se da en muy pocos individuos de la población y es letal o hereditaria, ocurre de forma espontánea, es persistente y puede ser inducida por agentes (mutágenos) físicos, como la luz UV o los rayos X, o por mutágenos (*García Rodríguez JA. & Muñoz Bellido JL., 1996*). Las mutaciones pueden ser puntuales, cuando se producen como resultado de la adición o pérdida de uno o más nucleótidos en un gen. Esto se traduce por la adición o pérdida de uno o más pares de bases y el corrimiento del marco de lectura durante la síntesis proteica, lo cual conduce generalmente a proteínas no funcionales.

Las mutaciones espontáneas suelen tener un índice bajo de aparición, del orden de un individuo por cada  $10^9$ - $10^{10}$  (*Andersson DI. & Hughes D., 1996; Drake JW. y cols., 1998*). La selección de estos mutantes puede realizarse *in vitro*

sometiendo a una población inicial, formada por un número elevado de células sensibles y otro discreto de mutantes resistentes, a la acción de un quimioterápico a una concentración determinada. Bajo estas circunstancias, las células sensibles quedarán inhibidas o morirán, mientras que las resistentes a esa concentración sobrevivirán y se multiplicarán libremente, dando lugar a una población resistente; ésta puede ser homogénea, si todas ellas tienen el mismo grado de resistencia, o heterogénea si está formada por clones con distintos grados de la misma.

Normalmente las resistencias iniciales son de bajo grado, denominándose mutantes primarias; si estas se enfrentan a concentraciones progresivamente elevadas del antimicrobiano se seleccionarán mutantes secundarias y si se continúa así el proceso se alcanzará un nivel de resistencia máximo.

Si en el primer paso se obtiene la máxima resistencia posible, se dice que la resistencia es del tipo “de un escalón”, en cambio en el segundo caso, en que se necesitan varias generaciones enfrentadas cada vez a un nivel creciente de antimicrobiano, se dice que la resistencia es del tipo “de múltiples escalones”.

*In vivo*, la dinámica de la resistencia sigue el mismo camino (Dámaso D., 1990; Méndez García J., 1996).

Las formas de expresión de las resistencias cromosómicas en una mutación pueden ser de varios tipos:

Conversión de un antimicrobiano en una sustancia inactiva mediante la acción de un enzima (Ejemplo:  $\beta$ -lactamasas).

1. Mutación y subsiguiente modificación el gen donde actúa el antimicrobiano (sitios diana). Podemos señalar las mutaciones en las regiones QRDR (*quinolone resistance determining region*) correspondientes a los genes que codifican la girasa o topoisomerasa IV que reducen la actividad de las fluoroquinolonas o las mutaciones que afectan los genes ribosomales que modifican la actividad de los macrólidos al ribosoma (Cantón R., 2006).
2. Producción incrementada de la enzima que es bloqueada por el antimicrobiano. Como ejemplo podemos mencionar la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa AmpC en *Pseudomonas aeruginosa* que afecta la actividad de ceftazidima y cefepime (Cantón R., 2006).
3. Disminución de la permeabilidad celular al antimicrobiano.
4. Hiperexpresión de los sistemas de expulsión como ser AcrAB en *E. coli*.
5. Aumento de un metabolito que antagoniza al antimicrobiano.

6. Incremento o creación de una nueva vía metabólica para prescindir del producto interceptado por el antimicrobiano.
7. Mutaciones en el promotor o genes reguladores (Ej.: *acrR*, *marR*, etc.) (Poole K. y cols., 1996; Dean A. & Didier M., 2005).

Todas las mutaciones son potencialmente letales, pero también muchos genes mutados pueden permitir la supervivencia bacteriana, siempre y cuando el nuevo requerimiento impuesto por la mutación pueda ser obtenido del ambiente exterior; por ejemplo, una mutación que impide la síntesis de un determinado aminoácido puede suplirse si el medio de cultivo contiene dicho aminoácido.

Una característica de todo mutante es que la mayoría de ellos pueden revertir a la condición de la cepa salvaje original mediante una mutación inversa. Este retorno es un retorno al fenotipo, pero no necesariamente al genotipo original ya que el efecto de la primera mutación puede ser suprimido mediante una segunda mutación en un sitio diferente del cromosoma (Dámaso D., 1990).

Se podría pensar que los antimicrobianos tienen un efecto mutagénico y que inducen la aparición de mutaciones. Sin embargo, es conocido que los mutantes resistentes se encuentran de manera natural en las poblaciones bacterianas y que este hecho es independiente de la presencia del antimicrobiano en el medio. Toda población bacteriana tiene, con una frecuencia variable, mutantes resistentes que coexisten con la población sensible mayoritaria. Bajo determinadas circunstancias, cuando se somete una población bacteriana a la acción de un antimicrobiano, los mutantes resistentes pueden hacerse dominantes al inhibirse la fracción sensible mayoritaria (Oh H. y cols. 2000; Sullivan A. y cols. 2001). Este proceso se conoce con el nombre de selección de mutantes resistentes. Diversos autores proponen que esta selección de mutantes resistentes se produce exclusivamente en un rango específico de concentraciones, denominado ventana de selección (*mutant selection window*) y a la concentración que impide el crecimiento de mutantes, concentración que previene la aparición de mutantes resistentes o CPM (*mutant prevention concentration*). El estudio de CPM tiene como finalidad predecir la posibilidad de desarrollo de resistencia y adecuar los tratamientos antimicrobianos en la práctica clínica (Cantón R., 2006).

### 3.2.2- Resistencias Extracromosómicas

Cuando la resistencia esta localizada en elementos móviles como plásmidos, transposones e integrones, se pueden transferir entre bacterias conduciendo a una gran diseminación de estos genes entre especies e incluso entre diferentes géneros de microorganismos. Dependiendo de la bacteria y del elemento móvil involucrado puede ocurrir vía transducción, conjugación, movilización y/o transformación.

#### Existen 3 formas de intercambio genético entre bacterias

1. Transformación.
2. Transducción.
3. Conjugación (factores R).

#### 1. Transformación

La transformación es el mecanismo de transferencia genética mediante el cual, el ADN es adquirido directamente del medio ambiente a partir de una bacteria que ha liberado su material genético al exterior y es recogido por la bacteria receptora. Una vez dentro de la bacteria el ADN puede mantenerse como tal cuando se trata de un elemento autónomo o bien puede quedar incluido de forma estable en el genoma bacteriano. La mayoría de las especies bacterianas no son transformables de forma natural (se dice que no son “competentes”). Las que no lo son de manera natural es necesario someterlas a un proceso para hacerlas “competentes”, entendiendo el estado de competencia como aquel en el que las bacterias permiten que el ADN se una a su superficie favoreciendo la adquisición de nuevos genes.

La diferencia esencial entre uno y otro tipo de transformación es que mientras en la transformación natural se transfiere sólo una cadena simple del ADN, en la transformación, caso de la transformación “artificial”, se transfiere el ADN con su doble cadena intacta. Es una técnica muy útil para transferir los plásmidos no conjugativos y no movilizables (*Méndez García J., 1996*).

#### 2. Transducción

La transducción es una transferencia genética mediada por bacteriófagos. Los bacteriófagos son virus parásitos de las bacterias. El material genético es transducido por un bacteriófago que se multiplica, inicialmente, sobre las bacterias donadoras y, posteriormente, se incorpora al genoma de las receptoras, las cuales, constituyen habitualmente una pequeña proporción del total de la población infectada y reciben el nombre de transductantes.

Los fagos bacterianos pueden tener dos ciclos: el primero llamado virulento o lítico en el cual éstos se multiplican dentro de la bacteria y la obligan a fabricar bacteriófagos que la lisan, invadiendo otras células al salir al exterior; el segundo ciclo recibe el nombre de lisogénico y el fago temperado; se caracteriza porque este, una vez que ha penetrado en la bacteria, se incorpora en un *locus* cromosómico de la misma, constituyéndose en profago, y se reproduce, indefinidamente, con el genoma bacteriano; en este caso la bacteria recibe el nombre de lisógena. Algunos de estos fagos llevan parte del material genético de la donadora y si este corresponde a un *locus* cromosómico de resistencia a uno o más antimicrobianos, el bacteriófago, al invadir una nueva bacteria puede pasar al estado de profago, volviéndola resistente. Este fenómeno es el único que ha podido explicar, hasta ahora, la presencia de partículas contagiosas en cepas en las que no se han demostrado otros mecanismos de transferencia, tal como ocurre con el estafilococo (*Méndez García J., 1996; Murray P.R. y cols., 1997*). Clínicamente, sólo tiene importancia en la transmisión de genes de resistencia de cocos gram-positivos, fundamentalmente *S. aureus*.

### **3. Conjugación**

La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas y es el mecanismo de intercambio de genes más importante entre las bacterias gram-negativas.

Mientras que en la transducción y en la transformación sólo se transfieren fragmentos muy pequeños del cromosoma bacteriano, en la conjugación pueden transferirse grandes segmentos del cromosoma o incluso el cromosoma entero. Para que se produzca es imprescindible el contacto físico entre las células mediante pilis y por lo tanto es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho biológico, como ocurre con las enterobacterias en el intestino. El intercambio de material genético es unidireccional, con transferencia de la información genética de las células macho a las hembras. Este proceso está usualmente codificado por plásmidos conjugativos, que pueden aislarse en gran número de bacterias gram-negativas y que incluyen miembros de más de 20 grupos de incompatibilidad. Todos los plásmidos que pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad muestran escasa homología de su ADN. La habilidad conjugativa requiere además una extensa región del ADN plasmídico (1/3 del genoma).

La conjugación está mediada por **plásmidos**. Los plásmidos son segmentos de ADN circular de doble hélice, extracromosómicos, que pueden tener un tamaño de 10 a 400 pares de kilobases, dotados generalmente de replicación autónoma y son transmisibles de forma estable en el curso de las generaciones. Su principal característica es su capacidad de replicación autónoma. Los genes que contienen no son imprescindibles para la supervivencia de la bacteria pero les confieren ventajas evolutivas; éste es el caso de los genes de resistencia, funciones metabólicas y factores de virulencia. Los plásmidos R o factores R son importantes en la patología infecciosa. Estos plásmidos confieren resistencia a antimicrobianos de familias diferentes. Asimismo es frecuente el caso de plásmidos diferentes que coexisten en la misma bacteria, lo cual añadido a la resistencia intrínseca determina la aparición de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos.

En las bacterias gram-negativas podemos distinguir entre plásmidos conjugativos y no conjugativos. Para que un plásmido sea conjugativo debe llevar además un conjunto de genes (*tra*) que son los responsables de que se produzca la conjugación de la bacteria que los hospeda, con la receptora. Los transconjugantes obtenidos adquieren las propiedades de la bacteria donadora. Los plásmidos no conjugativos rara vez codifican la resistencia a más de dos familias de antimicrobianos. Estos plásmidos no son autotransferibles ya que no codifican las funciones necesarias para esa autotransferibilidad, por lo que requieren la movilización por otro plásmido presente en la misma bacteria.

Los **transposones** son segmentos de ADN, cuyo tamaño varía de 2,5 a 20 kb., que tienen la propiedad de moverse entre los replicones bacterianos, desde una posición a otra en el genoma. No se autorreplican, están presentes en los plásmidos o en el cromosoma bacteriano y poseen la capacidad de poder abandonar esta localización inicial e insertarse en un nuevo plásmido o en un nuevo ADN cromosómico. De esta forma, puede realizarse la transferencia de material genético “saltando” de un plásmido a otro, de ADN cromosómico a un plásmido, de un plásmido a un bacteriófago, etc., en resumen de un replicón a otro. Esta forma de transferencia de la información genética recibe el nombre de transposición. Se conocen muchos transposones y recientemente, se ha comprobado que algunos de ellos pueden pasar del cromosoma de una bacteria a otra, sin ir vehiculizados por un bacteriófago o plásmido. Este tipo de transposones se han descrito en bacterias gram-positivas y se les llama transposones conjugativos.

Los transposones encontrados en bacterias se pueden dividir en tres clases: secuencias de inserción, transposones complejos y transposones asociados con fagos.

Las secuencias de inserción (SI) son los transposones más simples. Su longitud oscila entre 150 y 1.500 pares de bases y poseen repeticiones invertidas de 15 a 40 pares en sus extremos. Los elementos SI son constituyentes normales de los cromosomas bacterianos y se pueden integrar en plásmidos y genomas de fagos. Los SI sólo transportan la información genética necesaria para su propia transferencia (es decir, el gen que codifica la transposasa). Es posible detectarlos si su inserción conduce a interrupción o inactivación de genes, o si modifican la expresión de genes adyacentes.

Los transposones complejos incluyen al grupo de plásmidos de conjugación conocidos como factores R y que codifican genes de resistencia a antimicrobianos. Los plásmidos R se componen de dos partes funcionalmente distintas: el factor de transferencia de resistencia y el transposón que contiene los genes para varias clases de resistencias a los fármacos. Esos plásmidos constituyen la causa más común de resistencia activa a los antimicrobianos en las bacterias causantes de infecciones. Los transposones transportados por plásmidos de conjugación se pueden dividir en dos categorías o tipos generales.

Los transposones tipo I o transposones compuestos contienen una región central que transporta genes selectivos, por ejemplo, de resistencia a los antimicrobianos o de resistencia a sustancias tóxicas. Esa región central está flanqueada en ambos lados por dos elementos SI idénticos o casi idénticos. A este tipo pertenece el transposón Tn903 que transporta el gen que codifica la resistencia a la kanamicina.

Entre los transposones tipo II se incluyen la familia de transposones TnA. Esos transposones son bastante grandes (aproximadamente 5 kb) y no se consideran compuestos, debido a que no requieren la presencia de módulos SI para la transposición. Por el contrario, cada miembro de los transposones está unido por dos repeticiones cortas con 30 a 40 parejas de bases de longitud. La región central suele contener tres genes. Un gen codifica la resistencia a un antimicrobiano o sustancia tóxica como las  $\beta$ -lactamasas y los otros dos genes contienen la codificación de las enzimas o proteínas participantes en el proceso de transposición (transposasa, resolvasa) y su regulación (represora), así como otras características

(producción de toxinas). Los componentes de la familia TnA sólo transposan mediante una vía replicativa. El transposón Tn3, que contiene los genes necesarios para la resistencia a la ampicilina, constituye un ejemplo de transposón tipo II.

Los transposones asociados con fagos o fagos transpositivos como el Mu y el D108 son otro tipo de transposones, que usan la transposición como modo de reproducción normal. El Mu es un fago temperado cuyo ADN se integra casi al azar en el genoma del huésped después de la infección. La inserción del profago suele inactivar el gen bacteriano en el que se inserta, al interrumpir su secuencia de codificación y terminar la transcripción. También puede inactivar genes distales en el mismo operon. La inducción del profago Mu, sin embargo, no conduce a su excisión desde el ADN huésped.

Por el contrario, experimenta transposición replicativa repetida hasta muchos sitios diana diferentes en el cromosoma. En último término se produce el empaquetado del genoma del fago a partir de esas unidades localizadas en el cromosoma.

### **Proceso de replicación de los transposones**

Una característica común de la transposición es que los transposones no se mueven al azar, sino que parecen preferir ciertas secuencias diana. La longitud de las secuencias diana varía en los distintos transposones, y la secuencia diana es diferente para cada inserción o transposón particular. Durante el proceso de inserción de un transposón, la secuencia diana se duplica flanqueando al transposón por ambos lados.

La transposición se puede producir por dos mecanismos. En la transposición conservadora, el elemento transpuesto es desplazado desde su lugar de inserción original hasta una nueva localización. En el caso de la transposición replicativa, el elemento transpuesto se duplica, lo que conduce a dos copias completas integradas en orientación directa y separada por ADN del huésped bacteriano. Los transposones de la familia TnA sólo se mueven mediante transposición replicativa. En todos los casos, la presencia de un transposón puede conducir a deleciones o inversiones tras una excisión aberrante.

El término **integrón** se utilizó originalmente para describir un grupo de elementos aparentemente móviles que contenían uno o más genes de resistencia a antimicrobianos localizados en un lugar específico. Aunque los genes estructurales presentes en los integrones son mayoritariamente genes de resistencia, también es

posible la integración de otro tipo de genes que probablemente no se observan con tanta frecuencia, porque no existe la presión selectiva necesaria para ponerlos de manifiesto.

Los integrones son elementos genéticos integrados que funcionan, de forma esporádica, como unidades recombinantes en un lugar específico de la replicación, en las largas secuencias no homologas de ADN. Se han puesto de manifiesto por análisis genéticos de las secuencias de ADN contiguo a los genes de resistencia (cromosómico o plasmídico). Su papel en la transmisión horizontal de resistencias cobra mayor importancia recientemente con el descubrimiento de los superintegrones (SI) (Rowe-Magnus DA. & Mazel D., 2001). Dos características diferencian los SI de los integrones tradicionales de resistencia (RIs): el gran número de cassettes que contienen (en *Vibrio cholerae* se han descrito más de 150) y la homología observada entre los sitios *attC* de esos cassettes. Se han identificado SI entre los miembros de la familia *Vibrionaceae* (Mazel D. y cols., 1998) y algunas especies relacionadas como *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. La trascendencia de los factores R y de los plásmidos de resistencia estriba en que la mayor parte de las cepas de origen clínico, sobre todo hospitalarias, deben su resistencia a aquéllos (León Serrano J. & García Lobo JM., 1990; Méndez García J., 1996; Murray P.R. y cols., 1997).

### **Ejemplos resistencia a antimicrobianos mediada por plásmidos:**

➤ **Sistemas de eflujo:** uno de los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias son los sistemas de eflujo, que pueden ser específicos para un tipo o clase de droga o no específicos y expeler al exterior múltiples drogas no relacionadas estructuralmente (MDR). Se han observado que por ejemplo genes como *tet*, *floR*, *mefA*, *msrA*, *acrEF*, etc., que codifican para transportadores específicos, pueden diseminarse entre bacterias, al contrario de lo que ocurre con los genes que codifican para MDR que son generalmente de localización cromosómica y hasta la fecha no se ha observado que sean transferibles entre bacterias gram-negativas. Sin embargo el sistema MDR *qacA/B* se ha detectado en plásmidos que confieren múltiple resistencia a antimicrobianos en cepas algunos estafiloocos aislados de muestras clínicas (Butaye P. y cols., 2003).

**Resistencia a quinolonas:** parecía poco probable encontrar mecanismos de resistencia plasmídica a estos antibacterianos. Sin embargo en 1967, se aisló una

cepa de *E. coli* cuya resistencia a ácido nalidixico estaba mediada por un plásmido, posteriormente se aisló en cepas de *E. coli* de origen asiático. En estas cepas se ha asociado la resistencia a fluoroquinolonas con la presencia de un plásmido conjugativo denominado pMG252. El gen responsable de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (*PMQR* [*plasmid-mediated quinolone resistance*]) es llamado *qnr* y está ubicado en una zona tipo integrón (Ver con más detalle en capítulo 5: *Mecanismos de Resistencia a Quinolonas*).

➤ **Resistencia a  $\beta$ -lactámicos por enzimas Beta-lactamasas AmpC (codificadas por plásmidos):** Los genes *ampC* han sido descubiertos en plásmidos de varias especies de *Enterobacteriaceae*. Estos genes *ampC* son probablemente derivados de genes cromosómicos *ampC* de *C. freundii*, *E. cloacae* y *M. morgani*. Estos aislamientos producen grandes cantidades de  $\beta$ -lactamasa AmpC, confiriendo resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, cefamicinas, penicilinas y combinaciones de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. La expresión es usualmente de alto nivel y constitutiva.

### **3.3 Mecanismos generales de Resistencia a Antimicrobianos**

#### **3.3.1 Clasificación general de los antimicrobianos**

Los antimicrobianos son sustancias químicas de origen natural (producidas por diferentes especies de microorganismos) o sintético cuya función es suprimir el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) o destruir a los mismos (bactericidas). Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas, farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro bacteriano. A continuación clasificaremos a los antimicrobianos de acuerdo a su estructura química (Tabla N° 1) y en función de su mecanismo de acción (Tabla N° 2).

- Según estructura química:

<u>Estructura química</u>
<b>β-lactámicos:</b> penicilina y derivados, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenem, monobactámicos, inhibidores de las betalactamasas.
<b>Aminoglicósidos:</b> espectinomicina, gentamicina, ampicacina, neomicina, kanamicina, etc.
<b>Tetraciclinas:</b> oxitetraciclina, doxiciclina, tetraciclina, clortetraciclina, etc.
<b>Cloranfenicol:</b> cloranfenicol, tianfenicol
<b>Macrólidos:</b> eritromicina/nuevos macrólidos: claritromicina, roxytromicina, Azitromicina (azálido)
<b>Sulfonamidas:</b> sulfametoxazole, sulfisoxazole
<b>Diaminopirimidinas en combinación con sulfas:</b> trimetoprin
<b>Quinolonas:</b> ácido nalidíxico, pipemídico/quinolonas fluoradas: pefloxacina, Ciprofloxacina, norfloxacina, sparfloxacina, lomefloxacina.
<b>Lincosamidas:</b> clindamicina, lincomicina
<b>Derivados Nitroimidazólicos:</b> metronidazole, tinidazole, ornidazole
<b>Antimicrobianos péptidos:</b> <b>Polimixinas:</b> polimixina B y E, <b>Ciclopéptidos:</b> Bacitracina, <b>Glicopéptidos:</b> teicoplanina, vancomicina, daptomicina.
<b>Nitrofurantoína</b>
<b>Rifampicina</b>

**Tabla N° 1:** Clasificación de los antibacterianos de uso más frecuente en función de su estructura química (Jackson L. y cols., 1998).

- según mecanismo de acción:

**Mecanismo de acción de los agentes antibacterianos**

**1. Interferencia con la síntesis de la pared celular:**

β- lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactamas

Glucopéptidos: vancomicina, teicoplanina

**2. Inhibición de la síntesis de proteínas:**

-unión a la subunidad ribosomal 50S: macrólidos, cloranfenicol, clindamicina, quinupristin-dalfopristin, linezolid

-unión a la subunidad ribosomal 30S: aminoglicósidos, tetraciclina

**3. Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos:**

Inhibición de la síntesis de ADN: fluorquinolonas

Inhibición de la síntesis de ARN: rifampicina

**4. Inhibición de vías metabólicas:**

-sulfonamidas, análogos del ácido fólico

**5. Disrupción de la estructura de la membrana bacteriana:**

-polimixinas, daptomicinas

**Tabla N° 2:** *clasificación de los antimicrobianos de uso más frecuente según su mecanismo de acción. (Jackson L. y cols., 1998; Tenover F.C., 2006).*

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema que se ha ido complicando, sobre todo en las últimas décadas, porque a medida que se han ido sintetizando nuevos antimicrobianos, han ido surgiendo cepas resistentes a los mismos.

Además presupone un problema sanitario de gran importancia, por el incremento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes, el alargamiento en los tratamientos, en las mayores estancias en los hospitales y por ende en los costos.

Los microorganismos han desarrollado resistencia a antimicrobianos y agentes quimioterapéuticos por diversos mecanismos (Tabla N° 3): inactivación del fármaco por hidrólisis (Ej. β-lactamasas) o modificación enzimática (Ej. Resistencia a aminoglicósidos), alteración del sitio de acción (Ej. Mutación de la ADN girasa en la resistencia a fluoroquinolonas, producción de una transpeptidasa resistente a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes), así como también modificando la permeabilidad de la membrana externa reduciendo el influjo de antimicrobianos (Ej. Reducción de OmpF en *E. coli*) o por medio de sobre-expresar sistemas de eflujo activo que expelen al exterior diferentes

antimicrobianos (Ej. AcrAB en *E. coli*). Además se pueden alterar genéticamente rutas metabólicas específicas para que el agente microbiano no pueda provocar un efecto (mutaciones que inactivan la timidilato sintetasa, bloquean la conversión de deoxiuridilato a timidilato. Estos mutantes requieren timina o timidina exógena para la síntesis de ADN y por ende son resistentes a los antagonistas de la ruta del folato como las sulfonamidas y trimetoprima).

**Existen básicamente 4 mecanismos de resistencia:**

- **Inactivación o modificación del antibiótico:**  $\beta$ -lactámicos, Aminoglicósidos, Cloranfenicol
- **Alteración de la permeabilidad, por menor influjo a través de las porinas:**  $\beta$ -lactámicos, Cloranfenicol, Quinolonas, Tetraciclina, Trimetoprima, Eritromicina
- **Incremento en el eflujo activo de los antimicrobianos:**  $\beta$ -lactámicos, Cloranfenicol, Quinolonas, Tetraciclina, Trimetoprima, Eritromicina
- **Alteración de la diana del antibiótico:** Rifampicina, Sulfonamidas, Tetraciclina, Trimetoprima,  $\beta$ -lactámicos, Estreptomina, Eritromicina, Clindamicina, Quinolonas o **Síntesis de dianas alternativas** : trimetoprima y sulfonamidas

**Tabla 3:** *Mecanismos de resistencias y antimicrobianos afectados (Hawkey PM., 2000; Normark BH. & Normark S., 2002).*

**En los bacilos gram-negativos a los mecanismos de resistencia los podemos clasificar en 4 grupos (Gootz T., 2006):**

- Inactivación del antimicrobiano por enzimas endógenas
- Mutación en genes estructurales o regulatorios del sitio de acción
- Alteración de la membrana externa que lleva a una disminución en la permeabilidad de la droga
- Eflujo de la droga por medio de sistemas de eflujo activo.

**3.3.2- Destrucción e Inactivación del antimicrobiano:**

Mediante la producción de enzimas, las bacterias son capaces de modificar los antimicrobianos catalizando su destrucción o convirtiéndolos en derivados inactivos. Es la principal forma de resistencia a los antimicrobianos más utilizados en clínica como  $\beta$ -lactámicos y aminoglicósidos.

Son ejemplos de esta la producción de  $\beta$ -lactamasa,  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro, eritromicina esterasa y enzimas modificadoras de aminoglicósidos, cloranfenicol, lincosamidas y estreptograminas.

Otra vía para inactivación del antimicrobiano es la modificación enzimática del mismo, este es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos codificadas por plásmidos, entre las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetil transferasa (AAC), fosfatidil transferasa (APH) y adenil transferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglicósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30S ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas.

El cloranfenicol pierde afinidad por el ribosoma debido a la modificación que realiza una enzima de localización intracelular, cloranfenicol acetil transeferasa (CAT), generalmente codificada por plásmidos, suele ser inducible en las bacterias gram-positivas y constitutiva en las gram-negativas. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S.

Otros antimicrobianos como macrólidos y tetraciclinas pueden ser inactivados por modificaciones enzimáticas, aunque generalmente éste no es el principal mecanismo de resistencia

### **3.3.3- Alteración de las barreras de permeabilidad:**

- **Entrada disminuida:**

En estos casos el antimicrobiano no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar su diana.

Se deben tener en cuenta diferentes factores como ser:

- La permeabilidad de la membrana externa:

La membrana externa está claramente definida en los microorganismos gram-negativos. Esta bicapa lipídica es relativamente impermeable a solutos lipofílicos, como la tetraciclina, que solamente la puede atravesar utilizando los canales que forman las porinas (*Thanassi D. y cols., 1995*). La membrana externa posee una precisa organización estructural de manera que constituye una efectiva barrera intrínseca para la penetración de diversos agentes nocivos incluidos los antimicrobianos, al mismo tiempo que permite la eficiente difusión de nutrientes hacia la célula bacteriana.

- La permeabilidad de la membrana interna:

Otra forma de resistencia de la bacteria consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antimicrobiano hacia el interior de la célula, la presencia de una capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para compuestos hidrofóbicos.

- La presencia de Porinas:

Las porinas son proteínas mayores presentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas, y funcionan como canales de difusión formando poros que son fundamentales para el metabolismo bacteriano ya que facilita el intercambio de sustancias entre la bacteria y el exterior. Estas proteínas permiten el paso de sustancias de acuerdo al tamaño y carga eléctrica. Algunos antimicrobianos utilizan estas porinas para penetrar en el interior bacteriano, de forma tal que el transporte de los mismos está influenciado por la cantidad de porinas presentes en la membrana externa de dichas bacterias. La modificación de la estructura y función de las porinas, como resultado de una mutación o cambio del material genético de la bacteria, alteran la permeabilidad de la pared y generan una disminución del paso del antimicrobiano constituyéndose así en un importante mecanismo de resistencia a los mismos. La resistencia a algunas cefalosporinas, ácido nalidíxico y otras quinolonas tiene relación con este fenómeno.

### **3.3.4- Incremento en el eflujo activo de los antimicrobianos**

- **Eflujo activo**

Posiblemente el eflujo activo represente una de las grandes vías por las que se origina resistencia, pues evitan que se produzca la concentración terapéutica del antimicrobiano dentro de la célula. Por medio de este bombeo, las bacterias expulsan al exterior productos residuales o que resultan tóxicos o letales para ellas, dentro de los que se encuentran los agentes antibacterianos.

Este mecanismo de resistencia bacteriana es debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas, que mediante una fuente de energía acoplada, pueden reducir la concentración del antimicrobiano promoviendo la extracción activa del mismo desde el citoplasma al medio extracelular. La sobre expresión de estas bombas de eflujo lleva a que las bacterias gram-negativas expresen resistencia a más de un tipo de antimicrobiano (fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos) (*Viveiros M. y cols. 2007*).

Estas proteínas están involucradas tanto en la resistencia intrínseca como en la adquirida y confieren resistencia a diferentes antimicrobianos como tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, y  $\beta$ -lactámicos, así como a antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario. Como por ejemplo el principal sistema de eflujo en *E. coli* AcrAB-TolC (Tenover Fred C., 2006; Viveiros M. y cols. 2007), sin embargo en esta enterobacteria se han caracterizado al menos nueve sistemas de eflujo activo protón dependientes involucrados en la resistencia de dos o más antimicrobianos; los genes que codifican para dichos sistemas son: *emrE*, *acrEF* (*envCD*), *emrAB*, *emrD*, *mdfABC*, *tehA*, *acrD* (Homólogo de *acrB*) y *yhiUV* (Viveiros M. y cols. 2007), mientras que en *P. aeruginosa* se describen cuatro sistemas de eflujo principales: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, y MexEF-OprN (Tenover F.C., 2006).

### **3.3.5- Alteración de la diana o lugar de acción del antimicrobiano:**

Estos mecanismos de resistencia se refieren a las modificaciones producidas en una estructura o vía metabólica sobre la que ejercen su acción, bien por incremento de la concentración de una sustancia competitiva, o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas lo que impide que el antimicrobiano ejerza su acción.

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50S, 30S ribosomales, etc.

De esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, confieren resistencia a los  $\beta$ -lactámicos dado que las PBPs (proteínas de unión a penicilinas) son las dianas de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Pueden surgir por alteraciones en las PBPs que muestran una menor afinidad por el antimicrobiano, síntesis de nuevas PBPs sin modificarse la afinidad de las originales o por una combinación de los anteriores mecanismos. Las alteraciones de las PBPs son adquiridas y casi siempre se deben a mutaciones cromosómicas. Ejemplo: la cepa *P. aeruginosa* apareció resistente a ampicilina por disminución de la afinidad de su PBP3 (Godfrey A.J. y cols., 1981) y más tarde a imipenem por alteración de la PBP2 (Pechère J.C., 1988).

En bacterias gram-negativas la enzima ADN girasa parece ser el blanco preferido de las quinolonas mientras que la topoisomerasa IV lo es en las bacterias

gram-positivas (Hooper DC., 2000; Hawkey PM., 2003). De manera que no es casual que la alteración de las subunidades de estas enzimas sea el principal mecanismo de resistencia encontrado en aislamientos clínicos, mutaciones en el gen *gyrA* que codifica la subunidad A de la ADN girasa (GyrA) es el más común en la resistencia a quinolonas por bacterias gram-negativas (Yoshida H. y cols., 1990, Tavío MM. y cols., 2000 ), mientras que mutaciones en *parC*, el gen que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV (ParC) es más comúnmente encontrado en los gram-positivos (Sanders CC., 2001). También se han observado mutaciones que afectan la subunidad B (GyrB) de la ADN girasa o la subunidad E de la topoisomerasa IV (ParE) son menos comunes de encontrar y generalmente son secundarias a las mutaciones en las otras 2 subunidades. Las mutaciones en las regiones equivalentes en las proteínas ParC o ParE se asocian con altos grados de resistencia a estos fármacos (Vila J. y cols., 2006; *Antimicrobianos en medicina*; Sanders CC., 2001; Kern WV. y cols., 2000).

Un mecanismo similar se presenta para sulfonamidas y trimetoprima donde se presentan modificaciones de la sintetasa de hidopteorato y dihidrofolato reductasa.

La resistencia por alteraciones en los ribosomas puede surgir por mutación o por la acción de enzimas codificados en el cromosoma, plásmidos o transposones

La rifampicina actúa sobre la subunidad 13 de la ARN polimerasa, inhibiendo la extensión del ARN durante la síntesis. La resistencia a rifampicina se presenta cuando cambios en un aminoácido de esta subunidad alteran la unión del antimicrobiano a la ARN polimerasa. Esta resistencia es común en enterobacterias.

Respecto a las demás estructuras ribosomales encontramos modificaciones a nivel de múltiples subunidades como 30S, 50S. Sitios de acción de aminoglicósidos, lincosamidas, macrólidos y tetraciclinas. El mecanismo de resistencia ribosomal a gentamicina, tobramicina y amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido S12 de la subunidad 30S.

# 4

## RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS

### Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos en cepas de *Escherichia coli*:

#### 4.1 Introducción

#### 4.2 Mecanismo de acción de los antibióticos $\beta$ -lactámicos

#### 4.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos

##### 4.3.1 - Producción de $\beta$ -lactamasas

##### 4.3.2 - Alteración de la permeabilidad de la membrana por pérdida o disminución de las porinas de la membrana externa

##### 4.3.3 - Sistemas de flujo activo

##### 4.3.4 - Alteración de los sitios dianas: proteínas de unión a penicilina)

### 4.1 Introducción

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son un grupo de compuestos bactericidas de origen natural o semisintético, usados en el tratamiento de una variedad de infecciones bacterianas producidas por microorganismos gram-negativos y gram-positivos. Estos antibióticos se caracterizan por presentar en su estructura química un anillo  $\beta$ -lactámico que posee afinidad por enzimas que participan en la síntesis de la pared celular bacteriana, de manera que al inhibirlas, lo que impiden es la síntesis de la barrera de peptidoglicano de la pared celular bacteriana. (Fig. 1)

Clasificación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos:

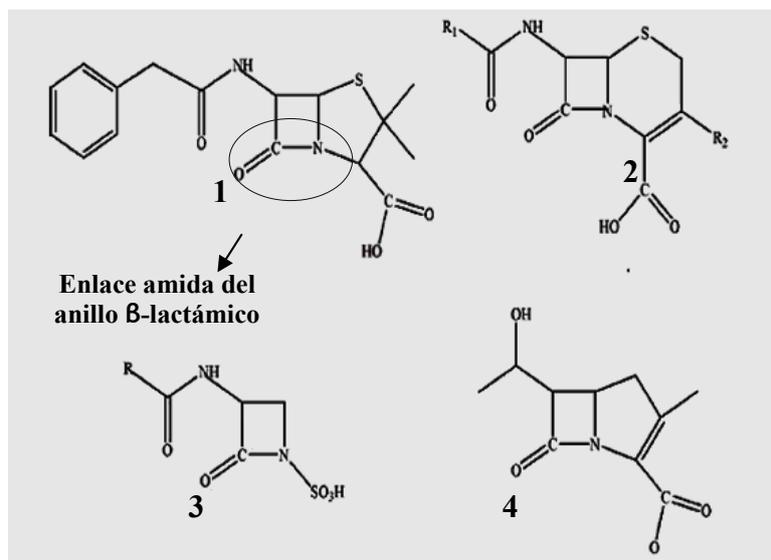
- Penicilinas: penicilina, amoxicilina, cefalexina, ticarcilina, piperacilina
- Cefalosporinas: Primera generación: cefazolina, cefalexina, cefradina, cefalotina. Segunda generación: cefaclor, cefamandol, cefuroxima. Tercera generación: cefoperazona, ceftibuteno, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima. Cuarta generación: cefepime.
- Cefamicinas: cefoxitina

- Monobactams: aztreonam
- Carbapenems: imipenem y meropenem
- Inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

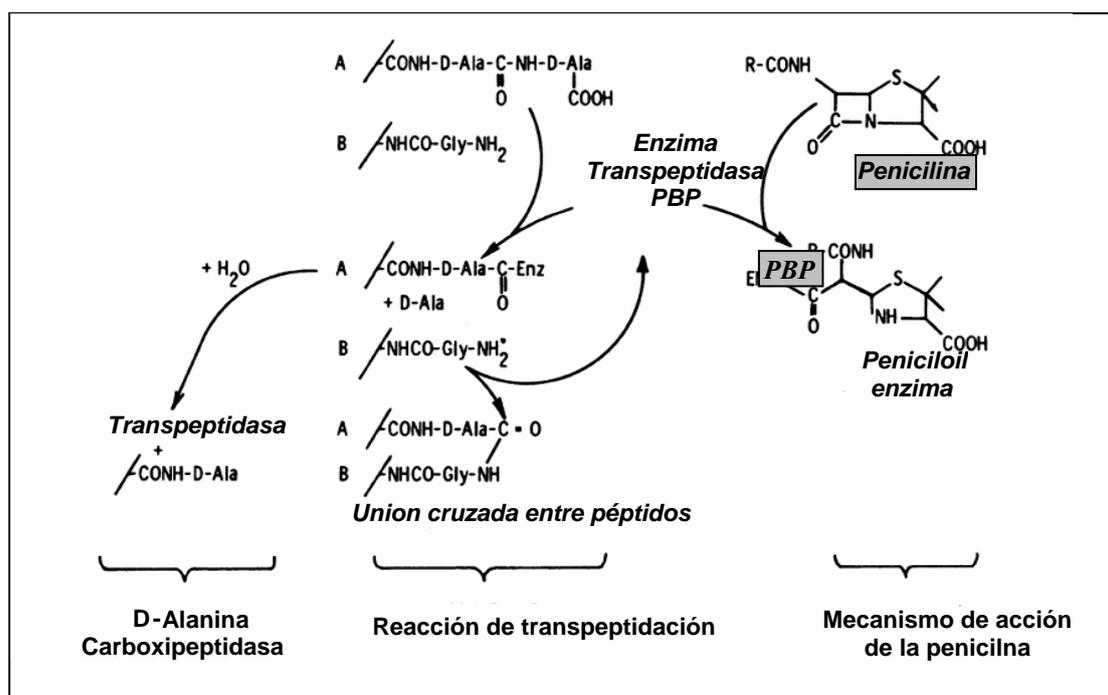
#### 4.2 Mecanismo de acción de los antibióticos $\beta$ -lactámicos

La pared celular es esencial para la supervivencia bacteriana, es la responsable de mantener la forma de la célula así como de la protección frente a diversos factores de externos (*Blumberg PM. & Strominger JL., 1974; Babic M. y cols., 2006*). La pared posee una estructura compleja, semirígida, formada por cadenas polipeptídicas compuestas por unidades de N-acetilmurámico intercaladas por otras de N-acetilglucosamina, de manera que estos péptidos cortos se entrecruzan con otros, confiriendo una gran rigidez a la estructura (*Babic M y cols, 2006*). El paso final de la síntesis del peptidoglicano, la transpeptidación, que ocurre en el periplasma en las bacterias gran negativas, se facilita por unas enzimas asociadas a la cara externa de la membrana citoplasmática conocidas como “*penicillin binding proteins*” (PBPs, proteínas de anclaje o unión a penicilinas) (*Blumberg PM. & Strominger JL., 1974*).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son análogos de la D-alanil-D-alanina, el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera de peptidoglicano que se está formando. La similitud estructural que existe entre los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y la D-alanil-D-alanina facilita su anclaje al sitio activo de las PBPs. El núcleo  $\beta$ -lactámico de la molécula se une irreversiblemente a las PBPs. Esta unión irreversible evita el paso final (la transpeptidación) de la formación de la barrera de peptidoglicanos, interrumpiendo la síntesis de la pared celular. (Fig.2) Es posible, además, que la inhibición de los PBPs (mediante dicha unión irreversible), haga también que se activen enzimas autolíticas de la pared celular bacteriana (*Blumberg PM. & Strominger JL., 1974*).



**Fig. 1:** Estructura química de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos: 1-penicilina G, 2-cefalosporina, 3-monobactam, 4-carbapenem (Babic M. y cols, 2006).



**Fig. 2:** Mecanismo de acción de la penicilina sobre la reacción de transpeptidación en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Blumberg PM. & Strominger JL, 1974).

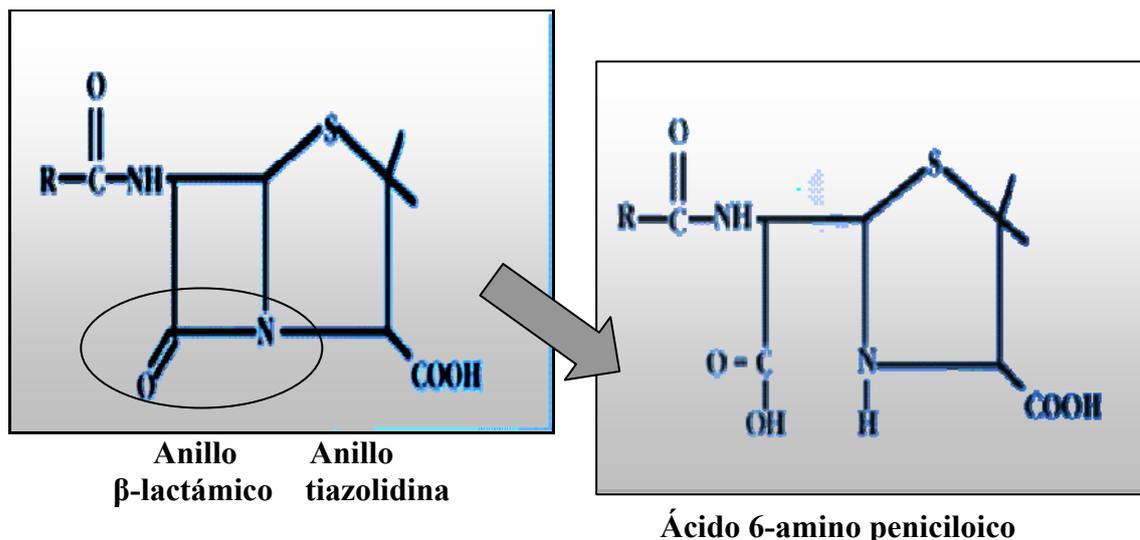
### 4.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos:

A los mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos los podemos clasificar en (*Tenover Fred C., 2006; Owe Källman y cols., 2003*):

- Mecanismos enzimáticos de inactivación del antibiótico por medio de  $\beta$ -lactamasas
- Reducción de la permeabilidad por pérdida o disminución de la cantidad de las porinas (OMP) de la membrana externa
- Sistemas de eflujo
- Alteración de la diana: alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBP)

#### 4.3.1 - Producción de $\beta$ -Lactamasas

Actualmente la producción de enzimas constituye el principal mecanismo de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, sobre todo en las bacterias gram-negativas. Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas catalíticas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos, rompiendo el enlace amida, dando como resultado un antibiótico inactivo que pierde la capacidad de unirse a las PBPs (proteínas de unión a penicilina) y por ende es incapaz de inhibir la síntesis de la pared celular (*Babic M. y cols., 2006; Weber DJ. y cols., 1999; Keith SK. y cols., 2000*), como se muestra en la Figura 3. La mayoría de estas enzimas son monoméricas con pesos moleculares que oscilan entre 23 y 44 kDa, aunque algunas de ellas existen como dímeros o tetrámeros (*Walsh TR. y cols., 2005*). En bacterias gram-negativas estas enzimas se localizan en el periplasma mientras que en las gram-positivas son extracelulares (*Georgopapadakou NH., 1993*).



**Fig. 3:** Actividad de las  $\beta$ -lactamasas: Rotura del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico (Walsh TR. y cols, 2005).

La localización de los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas es variable, pudiendo localizarse en el cromosoma, en plásmidos, o en transposones, aunque recientemente se han encontrado en integrones. De esta manera pueden ser transferibles entre las diversas especies bacterianas (Babic M. y cols., 2006; Weber DJ. y cols., 1999; Keith SK. y cols., 2000; Livermore DM. & Woodford N., 2000; Paterson DL. & Bonomo RA., 2005).

La producción de  $\beta$ -lactamasas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducibles (sólo en presencia de un  $\beta$ -lactámico). En los gram-negativos las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas son constitutivas, mientras que las cromosómicas pueden ser constitutivas o inducibles.

La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas suele hacerse en base a esquemas propuestos por Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler RP., 1980; Bush K., Jacoby G., Medeiros A., 1996).

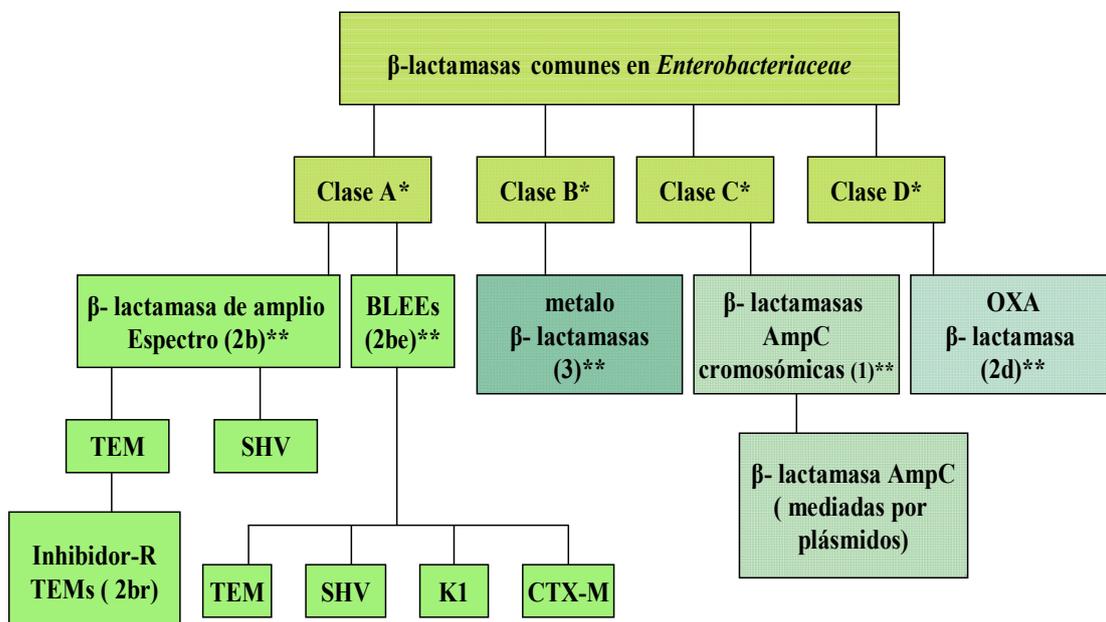
Ambler propuso una clasificación molecular que reconoce 4 clases, designadas de A a D, donde A, C y D comprenden serín- $\beta$ -lactamasas, que poseen una serina en su sitio activo; mientras que las de clase B son metalo- $\beta$ -lactamasas, cuya actividad depende de la presencia de zinc en su sitio activo, como cofactor metálico para su actividad (Walsh TR. y cols., 2005; Bush K, Jacoby G, Medeiros A., 1996; Rasmussen BA & Bush K., 1997) (Tabla 1).

Bush, Jacoby y Medeiros proponen una clasificación fenotípica en la cual designan 4 grupos, 1 a 4, según el perfil de sustrato y la susceptibilidad a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam (Tabla 1). Dentro de algunos grupos, como son el 2 y el 3 se han establecido subgrupos, para permitir una mejor caracterización, y en la Tabla 2 se clasifican las betalactamasas más frecuentemente encontradas en la familia *Enterobacteriaceae*.

**Tabla 1:** Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas (Helfand MS. & Bonomo RA. 2005). \* BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

Clasificación funcional Bush, Jacoby-Medeiros		Clasificación Molecular Ambler	Atributos de las $\beta$ -lactamasas
Grupo	Subgrupo		
1		C	AmpC $\beta$ -lactamasas en bacterias gram-negativas. Los genes a menudo son cromosómicos, pero pueden ser codificados en plásmidos. Confiere resistencia a todos los tipos de $\beta$ -lactámicos excepto los carbapenemes (a menos que se combinen con cambios en las porinas). No son inhibidas por el ácido clavulánico.
2		A, D	La mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico (a menos que se indique lo contrario).
	2 <sup>a</sup>	A	Incluyen penicilinas estafilocócicas y enterocócicas. Confiere alta resistencia a las penicilinas.
	2b	A	$\beta$ -lactamasas de amplio espectro, incluyen TEM-1 y SHV-1 primordialmente de bacterias gram-negativas.
	2be	A	Las BLEEs* confieren resistencia a las penicilinas, oxyminocefalosporinas y monobactámicos.
	2br	A	$\beta$ -lactamasas tipo TEM (IRT) y una tipo SHV que son resistentes a los inhibidores.
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la oxacilina, inhibidas moderadamente por el ácido clavulánico.
	2e	A	Cefalosporinas.
	2f	A	Enzimas que hidrolizan los carbapenemes con serina en la zona activa.
3	3 <sup>a</sup> , 3b, 3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a los carbapenemes y todos los tipos de $\beta$ -lactámicos excepto los monobactames. No son inhibidas por el ácido clavulánico.
4		?	Penicilinasas misceláneas que no caben en otros grupos. No son inhibidas por el ácido clavulánico.

**Tabla 2:** Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas más frecuentes en la familia Enterobacteriaceae. \* Clasificación de Ambler \*\* Clasificación de Bush (Babic M. y cols., 2006).



**Tabla 3:** Cuadro orientativo del tipo de  $\beta$ -lactamasas a que podrían estar presente en una cepa bacteriana según el patrón de susceptibilidad antibiótica (Babic M. y cols., 2006).

Tipo de Beta lactamasa	Patrón de susceptibilidad				inhibidores (susceptible)	
	Ceftazidima	Cefotaxima	Cefoxitina	Impipenem	Ácido clavulánico	EDTA
BLEE	R	R	S	S	SI	NO
AmpC	R	R	S, R	S	NO	NO
<b>Carbapenemasa</b>						
CLASE A	R	R	S	R	SI, NO	NO
CLASE B	R	R	S, R	R	NO	SI
CLASE D	R	R	S, R	R	NO	NO

### **β-lactamasas AmpC:**

Son enzimas de clase C de Ambler (grupo 1 en la clasificación de Bush) con actividad cefalosporinasa, y pobremente inhibidas por ácido clavulánico y contribuyen a la resistencia a β-lactámicos en patógenos gram-negativos, particularmente en la familia *Enterobacteriaceae* y pueden ser de codificación cromosómica o plasmídica. Estas enzimas han mostrado actividad contra la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima), cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) y monobactamas (aztreonam). Usualmente se mantienen susceptibles a carbapenem y cefalosporinas de cuarta generación (cefepime y ceftiprome). Sin embargo la expresión de AmpC junto a la pérdida de la OmpF pueden producir resistencia a los carbapenem en cepas de *E. coli* (Poole K., 2004).

### **β-lactamasas AmpC cromosómicas**

Estas AmpC están codificadas por los genes *ampC* que se encuentran típicamente en los cromosomas de la mayoría de *Enterobacteriaceae* (con excepción de *Salmonella* spp. y *Klebsiella* spp.).

Como la mayoría de las enterobacterias, *E. coli* y *Shigella* spp. producen AmpC, pero en estos casos la expresión es constitutiva, no inducible (no presentan el gen regulatorio *ampR*) y producen generalmente niveles insignificantes de esta enzima, pero a pesar de ello contribuyen a la resistencia intrínseca de estas especies (Mazzariol A. y cols., 2000; Petrosino JF. y cols., 2002). La inactivación del gen *ampC* hace a las células de *E. coli* más sensibles, predominantemente para cefalotina, cefaloridina, cefamandol, cuyas CMI con respecto a la cepa salvaje disminuyen en un factor de 8, 4, 4 respectivamente, en cambio la CMI disminuye 2 veces para penicilina G, ampicilina, cefazolina, cefoxitina, cefuroxima y cefsulodin, y no se observa efecto sobre cefepime, ceftiprome, ceftriaxona, carbenicilina, ceftazidima, cloxacilina, e imipemen (Mazzariol A. y cols., 2000). Sólo de forma ocasional se producen mutaciones a nivel del locus promotor o atenuador o ambos que llevan a que se produzcan cantidades importantes de estas enzimas (cepas hiperproductoras). Estas cepas suponen menos del 2 % (Livermore D., 1995; Coudron PE., 2000). A pesar de la baja frecuencia se observó que las cepas de *E. coli* que sobre expresan esta enzima pueden incrementar la resistencia hasta 256 veces a ampicilina, 128 veces a cefotaxima y cefoperazona, 64 veces a

cefalotina, ceftazidima, cefoxitina y aztreonam, no encontrándose variación en la sensibilidad a imipenem y meropenem (*Livermore D., 1995*).

Las bacterias que poseen estas enzimas son resistentes a las penicilinas, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefoxitina, cefotetan, ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima, excepto a cefepime y ceftiprome, débilmente hidrolizados por esta enzima. Pero si en estas bacterias se combina la hiperproducción de AmpC con la pérdida de las porinas en la membrana externa, también pueden resultar resistentes a los carbapenemes.

Cabe mencionar también que en los últimos años han surgido variantes de estas cefalosporinas, denominadas  $\beta$ -lactamasas AmpC de espectro ampliado (ESAC) caracterizadas por la eficiente actividad hidrolítica sobre oximiinocefalosporinas incluyendo cefepime y ceftiprome (*Mammeri H. y cols., 2006*).

Al contrario de lo que ocurre en *E. coli*, en algunas especies de enterobacterias como en *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* la producción de altos niveles de  $\beta$ -lactamasas AmpC es debido a la inducción que ejercen algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos (los antibióticos  $\beta$ -lactámicos varían de inductores muy fuertes a no-inductores).

**Especies de enterobacterias que producen  $\beta$ -lactamasas inducibles** (*Livermore D., 1995*):

- *Citrobacter freundii*
- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter spp.*
- *Hafnia alvei*
- *Morganella morganii*
- *Proteus vulgaris*
- *Providencia spp.*
- *Proteus penneri*

Pero la expresión de AmpC también puede ser alterada por otros compuestos influyendo por lo tanto en la sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Además de se ha descrito que existe una disminución de la producción de la  $\beta$ -lactamasa AmpC-cromosómica en cepas que expresan el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos.

En este sentido, se ha descrito que el salicilato, además de inducir del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos, reduce la expresión de la enzima AmpC en cepas de la especie *Morganella morganii* llevando a un incremento en la sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aún cuando la expresión de las porinas este reprimida. Recientemente se ha observado que compuestos como el 2,4 dinitrofenol otro inductor del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos y la ciprofloxacina también disminuyen la síntesis de AmpC en cepas de *Citrobacter freundii*. (Tavío MM. y cols., 2004, Tavío MM. y cols 2005).

Otros autores también asociaron una menor expresión de AmpC asociada al desarrollo de fenotipos estables de múltiple resistencia intrínseca tal como se ha descrito en cepas de *Citrobacter freundii* (Tavío MM. y cols., 1999) y *Pseudomonas aeruginosa* (Masuda N. y cols., 2001).

Trabajos previos han sugerido que cambios en los niveles citoplasmáticos de diversos precursores de la síntesis del peptidoglicano podrían estar asociados con la expresión de homólogos de MarA, y esto podría explicar el porque se encuentra disminuida la síntesis de AmpC en las cepas con fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos (Tavío MM. y cols., 2004).

Sin embargo, los sistemas de eflujo también podrían jugar un papel al expulsar a algunos sacáridos y/o péptidos precursores de la pared celular, reduciendo así la síntesis de la  $\beta$ -lactamasa AmpC como Masuda y cols., 2001 han sugerido.

Independientemente de la causa, hay una relación entre el desarrollo de fenotipo de fenotipo de múltiple resistencia y la disminución de la expresión de  $\beta$ -lactamase AmpC, pero se requerirán más estudios que clarifiquen el mecanismo de represión de síntesis de AmpC por los inductores *marRAB* (Tavío MM. y cols., 2004).

### **$\beta$ -lactamasas AmpC mediada por plásmidos**

En la pasada década emergió un nuevo problema en las bacterias entéricas: se encontraron enzimas  $\beta$ -lactamasas AmpC codificadas por plásmidos. La presencia de estas  $\beta$ -lactamasas AmpC en patógenos como *Klebsiella*, *Proteus* y *Salmonella* que anteriormente no portan el gen *ampC* llevaron a descubrir la existencia de plásmidos que portan los genes codificantes para esta enzima. Estos derivan de los

genes cromosómicos presentes en otros bacilos gram-negativos como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y especies de *Aeromonas* (Pai H. y cols., 2004)

El número de infecciones causadas por bacterias gram-negativas productoras de  $\beta$ -lactamasas AmpC se ha incrementado durante los últimos 10 años (Padilla E. y cols., 2006). El fenotipo se caracteriza por resistencia a penicilinas, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, monobactams, cefalosporinas de espectro extendido como cefoxitina, cefotetan y ceftazidima (Babic M. y cols., 2006; Pai H. y cols., 2004). Los únicos  $\beta$ -lactámicos activos en estos casos son los carbapenems (imipenem, meropenem y ertapenem) y cefalosporinas Zwitteriónicas (cefepime y ceftirome) (Padilla E. y cols., 2006), sin embargo la cooperación con otros mecanismos de resistencia (alteración de la permeabilidad) hacen que la susceptibilidad a dichos antimicrobianos pueda verse disminuida pudiendo llegar a producir cepas resistentes a los mismos. En la tabla 5 se muestran algunos ejemplos de  $\beta$ -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos.

**Tabla 4:**  $\beta$ -lactamasas cromosómicas AmpC y su expresión en enterobacterias. (Livermore D., 1995)

Organismo	Nombre	Clase	Bush clasificación	Modo de expresión			
				inducible	constitutiva		
					mínima	moderada	media
<i>E. coli</i>	AmpC	C	1	-	●	-	○
<i>Shigella</i>	AmpC	C	1	-	●	-	○
<i>Enterobacter spp.</i>	AmpC	C	1	●	○	-	◐
<i>C. freundii</i>	AmpC	C	1	●	○	-	◐
<i>M. morgani</i>	AmpC	C	1	●	-	-	◐
<i>Providencia spp.</i>	AmpC	C	1	●	○	-	○
<i>Serratia spp.</i>	AmpC	C	1	●	-	-	○

●: normal modo de producción, ◐: frecuentes variables entre países, hospitales (se observan en el 10- 50 % de los aislamientos), ○: raras (menos del 10 %), -: desconocidas o solo algún informe aislado

**Tabla 5:** Ejemplos de  $\beta$ -lactamasas AmpC encontradas en elementos móviles (Livermore M., 2006).

CLASE	FUENTE	EJEMPLOS
CIT	<i>Citrobacter freundii</i>	CMY-2 a 7, LAT-1,3,4
ENT	<i>Enterobacter spp.</i>	ACT-1, MIR-1
FOX	<i>Aeromonas spp.</i>	FOX-1 A 5
MOX	<i>Aeromonas spp.</i>	MOX-1, -2, CMY-1, y 8
DHA	<i>Morganella morganii</i>	DHA-1, -2
ACC	<i>Hafnia alvei</i>	ACC-1

#### 4.3.2 - Alteración en la permeabilidad de la membrana por pérdida o disminución de las porinas de la membrana externa

En los bacilos gram-negativos, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos deben atravesar la membrana externa para alcanzar los sitios diana anclados a la membrana interna, la composición de esta membrana dificulta la entrada de moléculas hidrofílicas.

La entrada de estos antibióticos tiene lugar de forma pasiva a través de canales no específicos llamados porinas, porque al ser de naturaleza hidrófila no pueden atravesar la bicapa lipídica por simple difusión. Las principales porinas descritas en *E. coli* son OmpF y OmpC. El tamaño del antimicrobiano y del poro generado por las porinas son factores que influyen en la difusión del mismo por dichos canales, en *E. coli* se ha comprobado que antibióticos como ceftazidima, ceftriaxona y cefoperazona que difunden bien a través de la porina OmpF lo hacen mucho peor a través de la porina OmpC, que es de menor diámetro (Fuminobu Y. & Hiroshi N., 1985).

En trabajos realizados con cepas mutantes de *E. coli* que sobre-represan AmpC, se observó que la pérdida de OmpF y OmpC contribuye a incrementar de 8 a 16 veces la resistencia a cefalosporinas, mientras que la pérdida de OmpF sólo incrementa la CMI de 2 a 4 veces. En dicho estudio se emplearon cepas de *E. coli* hiperproductoras de AmpC y carentes de OmpF, al valorar los niveles de resistencia a las cefalosporinas encontraron variación en los diferentes aislamientos a pesar de estar relacionados clonalmente.

En estas cepas la actividad  $\beta$ -lactamasa y pérdida de la OmpF son factores que contribuyen a la resistencia pero no son mecanismos suficientes para explicar el fenotipo de resistencia observado, por lo que además deben existir otros

mecanismos que contribuyan al mismo como por ejemplo alteración en la expresión de PBPs o incremento en el eflujo activo (*Martinez Martinez L. y cols., 2000*).

Por lo tanto la disminución en el número, modificación o pérdida de las porinas produce una alteración en la permeabilidad celular y pueden ser una causa de resistencia o un factor que contribuya a la misma.

La disminución de la porina OmpF puede darse por ejemplo por mutaciones en el gen *ompF* observado que cepas mutantes de *E. coli* que adquieren niveles significativos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (*Nikaido H., 2003*). Asimismo en las cepas de *E. coli* que expresan el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos, también se observa una reducción en la cantidad de la porina OmpF de la membrana externa junto a la activación de sistemas de eflujo, por lo que manifiestan un incremento en la resistencia a una amplia variedad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente como a tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, quinolonas y  $\beta$ -lactámicos.

Un estudio realizado con cepas de *E. coli* ha descrito que la pérdida de la porina F no produce grandes incrementos en la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos como meropenem e imipenem (de 2 a 4 veces), sin embargo cuando a *E. coli* se la transforma con un plásmido codificante de CphA ( $\beta$ -lactamasa), la pérdida de las porinas se asocia a un incremento mayor en la resistencia a dichos antibióticos (de 8 a 32 veces), sin embargo la presencia de dicha enzima no varía significativamente la sensibilidad a las cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) en comparación con las cepas no transformadas, dejando ver también la poca afinidad de estos antibióticos por las CphA metalo-betalactamasas (*Cornaglia G., 1992*)

Si bien los incrementos en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos por alteración en la permeabilidad suelen ser moderados, es importante señalar que los microorganismos pueden desarrollar paralelamente otros mecanismos de resistencia como la producción de  $\beta$ -lactamasas y de esta manera alcanzar niveles de resistencia que suelen ser clínicamente relevantes (*Sabiha Y. Essack, 2001*).

**Ver capítulo 2: Papel de OmpF en la resistencia a antimicrobianos en *E. coli*.**

### 4.3.3 - Sistemas de eflujo activo

Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de eflujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. Los sistemas de eflujo están divididos hasta la fecha en 5 familias:

- Transportadores tipo ABC (ATP- binding cassette)
- Facilitadores mayores (MFS)
- Resistencia-Nodulación-División (RND)
- Staphylococcal (o Small) multidrug resistance (SMR)
- Extrusión de múltiples drogas y compuestos tóxicos (MATE).

Los miembros de la familia RND, la mayoría exclusivamente cromosómicos, están ampliamente distribuidos entre las bacterias gram-negativas, y aparentemente son los sistemas que más contribuyen a incrementar la resistencia bacteriana a muchos de los antimicrobianos usados en la práctica médica.

En las bacterias gram-negativas los sistemas de eflujo activo contribuyen a disminuir la sensibilidad a estos antibióticos, pero esta resistencia también se ve influenciada por el tipo de  $\beta$ -lactámico y la naturaleza y actividad de las  $\beta$ -lactamasas presentes en la cepa.

El sistema de eflujo AcrAB-TolC se expresa constitutivamente en *E. coli* y es responsable de la resistencia intrínseca a los  $\beta$ -lactámicos en esta cepa. Este sistema bombea hacia fuera algunos  $\beta$ -lactámicos que poseen múltiples grupos cargados y que experimentalmente han mostrado no atravesar la membrana citoplasmática. Recientemente, el examen de la estructura de AcrB reveló la posibilidad que los transportadores RND puedan bombear hacia fuera sustratos desde el periplasma. Estos datos indican que el sistema AcrAB-TolC puede transportar  $\beta$ -lactámicos del periplasma al medio externo por la proteína externa de membrana TolC (*Nishino K. y cols., 2003*).

A su vez la resistencia observada en *E. coli* a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se ve afectada cuando se sobre-expresa el principal sistema de eflujo AcrAB, afectando sobretodo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aquellos que poseen sustituyentes lipofílicos (*Mazzariol A. y cols., 2000*). Cuando se inactivan los genes que codifican para MexAB en *P. aeruginosa* o para AcrAB en *E. coli*, se observa que en *P. aeruginosa* disminuye la sensibilidad para ceftriaxona, cefoperazona, azlocilina, y carbenicilina en un factor de 8 a 128 mientras que en *E.*

*coli* disminuye para ampicilina y benzilpenicilina en un factor de 2 a 4 (Nikaido H., 1998).

Se hicieron estudios con cepas mutantes *acr* midiendo la susceptibilidad para diferentes  $\beta$ -lactámicos, resultado que la CMI de las cepas que no expresan AcrAB disminuía hasta 100 veces para aquellos antibióticos más lipofílicos como ser nafcilina y cloxacilina, mientras que la sensibilidad para los  $\beta$ -lactámicos con cadenas laterales más hidrofílicas (cefazolina, penicilina N) no se vio demasiado alterada en comparación con las cepas que sí expresaban AcrAB (Nikaido H., 1998).

En otros estudios también se ha observado que la inactivación de *acrAB* en cepas de *E. coli* hace que disminuyan las CMI en un factor de 128 para cloxacilina, 512 para Oxacilina, 32 para Mezlocilina, 16 para piperacilina y cefuroxima, 4 veces para carbenicilina y cefoxitina, 2 veces para penicilina G, cefaloridina y cefoperazona. La CMI para cefsulodin, ceftriaxona, cefmetazole, ceftazidima, cefazolina, cefepime, cefpirome e imipenem no varió en estas cepas en comparación con la cepa origen de *E. coli* (Mazzariol A. y cols., 2000). Todos estos trabajos demuestran que AcrAB tiene como sustrato preferencial los  $\beta$ -lactámicos con cadenas laterales más lipofílicas y que el imipenem es un pobre sustrato de este sistema de eflujo.

Recientes estudios manifiestan que la resistencia a cefuroxima en cepas de *E. coli* (resistentes al ciclohexano) se redujo 2 veces por medio de inhibidores de eflujo (MC-207.110), lo que sugiere que otros mecanismos de eflujo también contribuyen a la resistencia (Poole K., 2004; Kallman O., 2003).

El compuesto L-fenilalanina-L-Arginina- $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N o MC-207,110) fue el primer inhibidor caracterizado para las bombas RND de *P. aeruginosa* (Ueada O., 2005; Giske GC. y cols., 2005; Mamelli L., 2005) pero además tiene actividad sobre los transportadores RND de diversas especies bacterianas (Lee A. y cols., 2000) entre ellos el sistema AcrAB-TolC en *E. coli* (Lomovskaya O., 2001), además se observó que los inhibidores CCCP y MC-207,110 también disminuían de 2 a 4 veces la CMI a cefalexina en *B. fragilis* (Ueada O., 2005). Las bombas RND utilizan la energía del gradiente protónico transmembrana para la expulsión de drogas. Aquellos compuestos que interrumpen este gradiente son considerados inhibidores de los sistemas de eflujo, sin embargo es importante resaltar que el modo de acción de MC-207,110 no se basa en esta interrupción, observándole a su

vez un efecto adicional llamado “habilidad de permeabilizar la membrana externa bacteriana” (Lomovskaya O., 2001).

La sobre expresión del sistema de eflujo AcrAB-TolC también se observa en cepas de *E. coli* con fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos, que como se mencionó anteriormente contribuye a incrementar la resistencia a diversos antimicrobianos no relacionados estructuralmente, entre ellos los  $\beta$ -lactámicos (Ma D y cols., 1995; Okusu H. y cols., 1996), pero en *E. coli* además de AcrAB existen otros sistemas de eflujo protón dependiente pertenecientes a la familia RND que también interaccionan con la proteína de membrana externa TolC y que están involucrados en la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como ser: AcrEF, AcrD, MdtEF, MdtABC. Los mejores sustratos de estos sistemas también son los antimicrobianos con cadenas laterales más lipofílicas. Experimentalmente se observó que cuando se inactiva *tolC* en cepas de *E. coli*, aunque se sobre expresen estos sistemas de eflujo RND, la CMI para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no se ve alterada en comparación con la cepa origen sensible, demostrando que TolC es el elemento indispensable en el desarrollo de la resistencia para los antibióticos sustratos de estos sistemas de eflujo (Kunihiko N. y cols., 2003).

Por otro lado hasta el momento los sistemas de eflujo EmrAB y EmrKY de la familia MFS y MacAB de la familia ABC aunque también interaccionan con TolC, parecen no intervenir en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en cepas de *E. coli*, puesto que las CMIs para antibióticos como ampicilina, oxacilina cloxacilina, nafcilina, carbenicilina, sulbenicilina, cefuroxima, cefamandole, cefotaxima, cefmetazole, aztreonam y faropenem no se vio alterada por la sobre expresión de estos sistemas de eflujo. Aunque en realidad faltan estudios de la influencia de este tipo de sistemas sobre la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (Kunihiko N. y cols., 2003).

#### **4.3.4 - Alteración del sitio diana**

Las principales dianas de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son grupo de enzimas conocidas colectivamente como PFPs o PBPs (*penicillin-binding-proteins*) llamadas así porque se fijan de forma covalente e irreversiblemente a la penicilina, estas proteínas están mayoritariamente ancladas a la membrana interna y poseen sus sitios activos disponibles en el espacio periplásmico. Las funciones de las PBPs en realidad son bastante diversas e incluyen actividad transpeptidasa, transglicosidasa, y carboxipeptidasas. Estas enzimas son las responsables del

armado, regulación y mantenimiento de la estructura del peptidoglicano y son importantes en los procesos de diferenciación y división celular (*Massova I. & Mbashery S., 1998*).

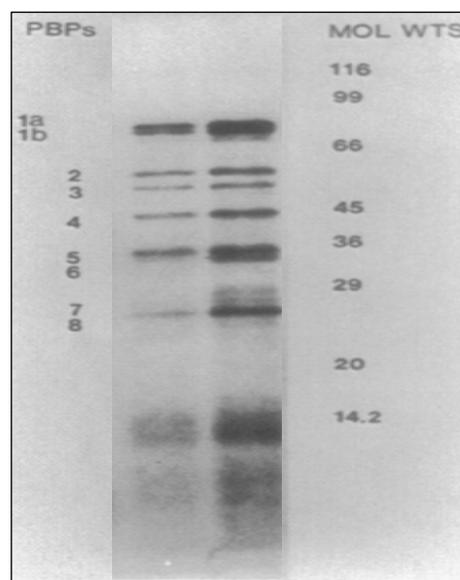
Las bacterias tienen múltiples PBPs y se las suele clasificar en dos grupos de acuerdo a los pesos moleculares en:

1- PBPs de alto peso molecular (HMW PBPs)

2- PBPs de bajo peso molecular (LMW PBPs)

En la tabla 6, figura 4 se clasifican las PBPs de *E. coli* de acuerdo al peso molecular y la distribución de las mismas en geles de SDS-PAGE

proteína	peso molecular aparente (kDa)
PBP 1	91
PBP 2	66
PBP 3	60
PBP 4	49
PBP 5	42
PBP 6	40
PBP7	32



**Tabla 6:** *Peso moleculares de las proteínas de unión a penicilina en E. coli (Spratt Brian G., 1977.)*

**Fig. 4:**  
*Distribución de las PBPs de E. coli en gel de SDS-PAGE. (Jacoby G.H. & Young K.D., 1988)*

Las siete PBPs clásicas de *E. coli* fueron observadas en geles de poliacrilamida por *Spratt*, quien nombró a estas en orden decreciente de peso molecular como PBPs 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, y 6. Recientemente se han caracterizado cinco PBPs adicionales identificadas y autenticadas por análisis genéticos y bioquímicos, estas incluyen la PBP 7 y su artefacto proteolítico PBP 8, DacD, AmpC and AmpH y PBP 1c (*Young KD., 2001; Sabiha Y. Essack, 2001; Davies C. y cols., 2001; Denome S.A., 1999*).

## 1. PBPs de alto peso molecular (HMW PBPs):

A las PBPs de alto peso molecular a su vez se las suele clasificar de acuerdo al número de reacciones que son capaces de catalizar, siendo de clase A las bifuncionales o sea las que tienen actividad glicotransferasa-transpeptidasa y las de clase B las PBPs monofuncionales que sólo poseen actividad transpeptidasa (*Macheboeuf P. y cols., 2006*). Las HMW PBPs (PBP1, PBP2 Y PBP3) son consideradas esenciales en la supervivencia de *E. coli* pues catalizan las etapas finales de la biosíntesis del peptidoglicano y están involucradas en procesos fisiológicos como elongación, septación y mantenimiento de la forma celular (*Georgopapadakou NH., 1993*) además de ser las dianas para la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos.

Las PBP1 son enzimas son de clase A (bifuncionales) mientras que las PBP2 y PBP3 son de clase B (monofuncionales) (*Ute Meisel y cols., 2003; Young K.D., 2001*).

La PBP 1 ha sido resuelta en componentes genéticamente distintos, PBP1A, PBP1B y PBP1C, con funciones bioquímicas y fisiológicas similares, pero afinidades diferentes hacia antibióticos  $\beta$ -lactámicos (*Ute Meisel y cols., 2003; Rechenberg MV., 2000; Georgopapadakou NH., 1993*)

PBP1A y PBP1B no son esenciales para el crecimiento celular, pero las células que pierden ambas proteínas no son viables, indicando que tienen una función similar y esencial que no puede ser reemplazada por otra mureína sintasa, además las cepas mutantes que pierden alguna de estas proteínas, muestran fenotipos diferentes sugiriendo que participan en diferentes roles durante el crecimiento y división celular. Por ejemplo las mutantes sin PBP1B son más sensibles a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que aquellas mutantes carentes de PBP1A. Además se demostró que la PBP1B tiene mayor velocidad de transglicosilación y transpeptidación (*Born P. y cols., 2006*). Asimismo en cepas de *E. coli* se observó que la sobre-producción de una PBP1B inactiva conduce a la lisis de las células (*Ute Meisel y cols., 2003*). La PBP1C no ha sido completamente caracterizada (*Young K.D., 2001*).

La PBP2 es una transpeptidasa codificada por el gen *pbpA*, existente en *E. coli* en un bajo número de copias aproximadamente unas 20 moléculas por célula, y no es una diana letal para muchos de los  $\beta$ -lactámicos, pero tiene funciones en la

fase inicial de la septación y es importante para el mantenimiento del aspecto bacilar en gram-negativos (*Young K.D., 2001, Hiroyuki K. y cols., 2006*).

La PBP2 es el blanco del antibiótico  $\beta$ -lactámico amdinocillin o mecillian, que inhibe su actividad y por lo tanto las células crecen con morfología esferoideal, la misma morfología que se observa en las mutantes *pbpA* (*Vinella D. y cols., 1992*)

En bacterias gram-negativas, y particularmente en *E. coli* los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que se unen específicamente a estas proteínas, como los carbapenemes, dan lugar a la formación de células esféricas o redondeadas (*De Pedro Miguel A. y cols., 2001*). El imipenem que se une principalmente a PBP2 y posteriormente a las PBPs 1A/1B. Ésto establece una notable diferencia con las amino-penicilinas y cefalosporinas, cuyo blanco principal es la PBP3. Esta propiedad tendría la ventaja, al menos teóricamente, pues no induciría la formación de filamentos. En *E. coli*, la PBP2 es la diana principal tanto de imipenem como de Meropenem, mientras que la PBP3 demuestra una mayor afinidad por meropenem.

La PBP3 es una proteína con actividad acil transeferasa y es esencial en la división y en la síntesis de la pared celular. Esta proteína es específica y absolutamente requerida para la formación de septos en división celular (*Young K.D., 2001; De Pedro Miguel A. y cols., 2001; Hiroyuki K. y cols., 2006*). El gen que codifica para la PBP3, *ftsI* o *pbpB*, se encuentra próximo al grupo de genes requeridos para la síntesis de los precursores del peptidoglicano (por ejemplo, *murE*, *murF*, *murG*, *murC*, y *ddl*) o para la división de célula y la formación del septo (por ejemplo, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsA*, y *ftsZ*) (*Liao X., 1996*). A su vez la PBP3 es la diana preferencial de penicilinas, cefalosporinas y monobactamas, su inhibición bloquea la septación y por lo tanto, conduce a la formación de largos filamentos no septados (*De Pedro Miguel A. y cols., 2001; Spratt Brian G., 1977*). PBP3 de *E. coli* no tiene ninguna actividad transglicosilasa, por que durante la síntesis del septo de peptidoglicano, esta PBP trabajaría en conjunto con una PBP clase A, PBP1A o PBP1B o ambos que aportan la actividad la transglicosilasa (elongación de la cadena) (*Marrec-Fairley M., 2000*). Recientes estudios sugieren que la PBP3 interaccionaría con la PBP1B formando un complejo proteico que intervendría junto a otras proteínas en la división celular (*Ute Bertsche y cols., 2006*).

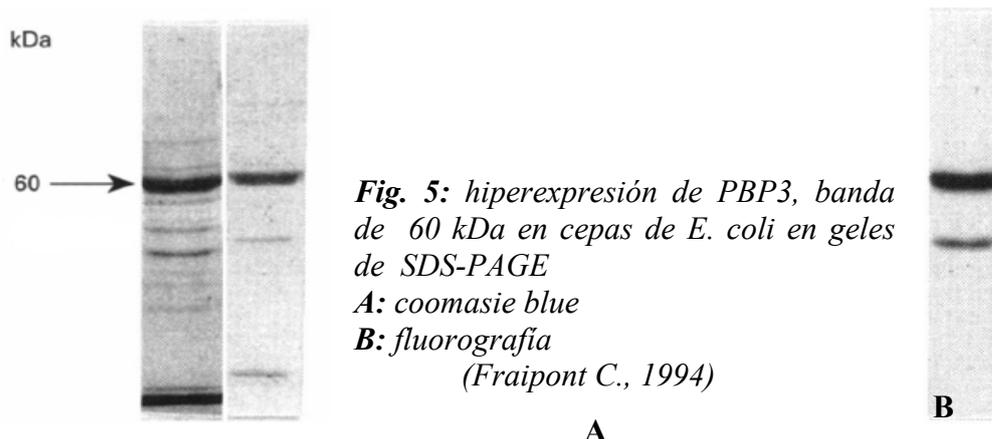
En resumen la PBP3 es esencial en la división celular y su carencia no puede ser compensada por la PBP2. La PBP2 es necesaria para la elongación y no puede ser sustituida por la PBP3. La PBP1A y PBP1B se encuentran activas

durante ambos procesos de elongación y división celular, la delección de ambas resulta letal para la célula, pero a la inversa de las otras dos PBPs esenciales, la carencia de una de ellas puede ser compensada por la otra (*Ute Bertsche y cols., 2006*).

### **PBP3 y su papel en la resistencia a antimicrobianos en *E. coli*:**

La PBP3, es codificada por el gen *pbpB (ftsI)* localizado a 1,8 min. en el mapa cromosómico de *E. coli* (*Hayashi Shigeru y cols, 1988*), y normalmente se sintetiza en bajo número de copias de 50 a 100 por célula. Esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 60 kDa (Fig. 5) y se ha comprobado que su hiperproducción no resulta nociva para *E. coli* (*Marrec-Fairley M., 2000*).

*Liao X. & Hancock R., 1997* para evaluar la afinidad de los  $\beta$ -lactámicos por las PBPs usaron un parámetro definido como  $I_{50}$  (a menor  $I_{50}$  mayor afinidad). Los resultados indicaron que los antibióticos aztreonam y ceftazidima se unen preferentemente a la PBP3 tanto en *E. coli* como *P. aeruginosa*, mientras que cefsulodin solo actúa sobre la PBP3 de *P. aeruginosa* no teniendo influencia sobre la PBP3 de *E. coli*, asimismo se observó que cefepime se une con igual afinidad a la PBP3 de *E. coli* que a la PBP1A de *Ps. aeruginosa* (*Liao X. & Hancock R., 1997; Georgopapadakou N. y cols., 1982*). Cuando estos antibióticos inhiben a la PBP3 se forman largos filamentos, puesto que lo que se inhibe es la formación de septos. Por lo que la PBP3 juega un papel importante en la sensibilidad a antibióticos de  $\beta$ -lactámicos y en la morfología bacteriana (*Pucci M. y cols., 1991*). Para investigar cual era el efecto de la sobre-expresión de la PBP3 sobre *E. coli* y *P. aeruginosa* se hicieron experimentos con cepas mutantes que sobre expresaban PBP3 y a su vez no presentaban actividad  $\beta$ -lactamasa, y se les determinó la sensibilidad a los antibióticos betalactámicos (CMI), como aztreonam, ceftazidima, cefepime comparándolos a su vez con imipenem (PBP2) y cefaloridina (PBP1), observándose que la CMI se incrementaba de 2-8 veces para los antimicrobianos target de la PBP3 (4-8 veces para ceftazidima, 2 veces para cefepime, 2 para aztreonam) mientras que la CMI para imipenem y cefaloridina permanecía inalterada en estas cepas mutantes (*Liao X. & Hancock R., 1997*). Esto quiere decir que se van a requerir concentraciones más altas de estos tres antibióticos para inhibir la sobreproducción de la PBP3 en estas cepas.



**Fig. 5:** hiperexpresión de PBP3, banda de 60 kDa en cepas de *E. coli* en geles de SDS-PAGE  
**A:** coomassie blue  
**B:** fluorografía  
 (Fraipont C., 1994)

A

B

## 2. PBPs de bajo peso molecular (LMW PBPs)

Las PBPs de bajo peso molecular, son un grupo de enzimas asociadas a membrana interna con actividad carboxipeptidasas y endopeptidasas y su papel fisiológico es menos claro, y se piensa que jugarían roles regulatorios en las últimas etapas de la síntesis del peptidoglicano (*Siligardi G. y cols., 1997*), pero no son consideradas esenciales para el crecimiento bacteriano, ni tampoco se sabe cual es su participación en el mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos, de hecho se han seleccionado mutantes de *E. coli* carentes de estas proteínas. (*Davies C. y cols., 2001; Meberg B.M. y cols, 2004; Popham D.L. & Young K.D., 2003*). Aunque en los últimos años se les esta adjudicando una mayor importancia pues nuevos estudios sugieren que estas PBPs serían necesarias para procesos como división y morfogénesis celular (*Macheboeuf P. y cols., 2006*).

A estas 7 LMW PBPs (*low-molecular-weight PBPs*): PBPs 4, 5, 6, y 7, así como DacD, AmpC, and AmpH se las divide de acuerdo a su actividad enzimática en: Tres enzimas monofuncionales con actividad carboxipeptidasa (PBP5, PBP6 y DacD), una enzima bifuncional carboxipeptidasa-endopeptidasa (PBP4), una enzima monofuncional endopeptidasa (PBP7) y dos que pertenecen a la familia clase C de  $\beta$ -lactamas (AmpC y AmpH) (*Young K.D., 2001; Nelson D.E. & Young K.D., 2001*), aunque también las puede clasificar en 3 clases de acuerdo a la secuencia, *clase A, clase B y clase C*, de manera que la PBP5 es una enzima de clase A mientras que la PBP4 es de clase C (*Hiroyuki K. y cols., 2006*).

Como se dijo anteriormente estas LMW PBPs no tienen un papel definido, no intervienen en la síntesis del peptidoglicano, sin embargo lo pueden modificar de diferente manera, la PBP5 remueve el residuo terminal D-alanina de las cadenas pentapéptidas (DD- carboxipeptidasas), y a pesar de ser la PBP más numerosa, su

pérdida no resulta letal para la célula, posiblemente porque una o varias LMW PBPs compensarían su ausencia. El que *E. coli* sobreviva en ausencia de esta PBP implica que no posee algún papel fisiológico vital para la bacteria (*Nelson D.E. & Young K.D., 2000*). Asimismo la PBP4 y la PBP7 tienen la función de romper los enlaces entre péptidos (endopeptidasas) generados por las PBPs de alto peso molecular durante la síntesis del peptidoglicano.

#### **La resistencia a $\beta$ -lactámicos mediada por PBPs puede deberse a:**

- sobre expresión de alguna de las PBPs, que obviamente requerirían una mayor concentración del  $\beta$ -lactámicos para su saturación.
- Modificación de la afinidad de alguna de las PBPs
- Deleción de genes que codifican alguna de las PBPs esenciales
- Modificación en el perfil de PBPs con sustitución de alguna de las PBPs habituales
- Síntesis de nuevas PBPs con afinidad selectiva por el sustrato fisiológico y escasa por los  $\beta$ -lactámicos

La disminución de la afinidad de las PBPs por los  $\beta$ -lactámicos es un factor responsable de la resistencia en gram-positivos (*Pechère JC., 1988*). En bacterias gram-negativas, la modificación en la afinidad de las PBP, que puede darse por mutaciones puntuales, produce resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, pero además se requiere una reducción en la permeabilidad bacteriana a dichos antibióticos para producir niveles de resistencia clínicamente relevantes.

Si bien no es muy frecuente la resistencia debido a modificación de la afinidad de las PBPs en bacilos gram-negativos, se observó que en cepas de *P. aeruginosa* aparecía resistencia a penicilina por disminución de la afinidad de su PBP3 (*Godfrey AJ. y cols., 1981*) y luego se detectó también que otras cepas de *P. aeruginosa* se hacían resistentes a imipenem durante el tratamiento con el mismo por alteración de su PBP2 (*Pechère JC., 1988*). En cepas mutantes de *E. coli* también se ha observado resistencia a cefalosporinas por alteración en su PBP3, estas proteínas presentaban cuatro diferentes sustituciones en sus aminoácidos, que conducían a una gran reducción en la afinidad por los  $\beta$ -lactámicos (*Malouin F. & Bryan LE., 1986*).

### **Rol de las PBPs en la morfología bacteriana:**

Las bacterias sintetizan un exoesqueleto rígido de peptidoglicano, y una de las diversas funciones que posee éste es la de crear y preservar la morfología de la bacteria, además este puede sufrir cambios en respuesta a diferentes factores de estrés y su eventual fragilidad o inestabilidad lleva a la lisis celular (*Macheboeuf P. y cols., 2006*). La forma de la célula puede influenciar diferentes procesos como la motilidad, adhesión a superficies, dispersión en el medio ambiente, susceptibilidad a la predación y también podría afectar el normal curso de la infección microbiana (*Meberg B.M. y cols., 2004*).

Se sugiere que las células utilizan dos sistemas para regular la forma de bacteriana. Una de ellas utiliza proteínas citoesqueléticas que se polimerizan como anillos o hélices en la cara interna de la membrana citoplasmática y aparentemente funcionan organizando y dirigiendo a las proteínas involucradas en la división y elongación celular. El segundo sistema está compuesto por enzimas específicas involucradas en la polimerización, modificación, degradación y reciclado del peptidoglicano (*Meberg B.M. y cols., 2004*).

La división celular es el mecanismo por el cual la bacteria se separa en dos células hijas por un proceso llamado septación y para la formación de dicho septo se produce un cambio en la síntesis del peptidoglicano de longitudinal a la forma transversal (Fig.5).

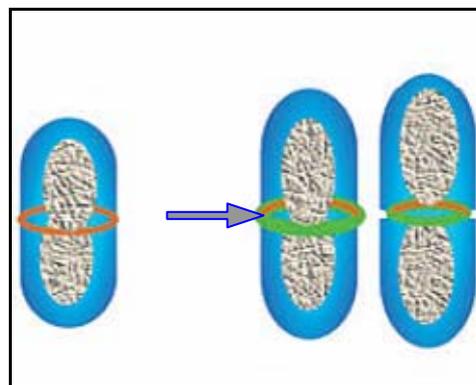
Las proteínas involucradas en la división celular cambian entre las especies bacterianas. En *E. coli*, intervienen al menos 12 proteínas en la división celular FtsZ, FtsA, ZipA, ZapA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, PBP3 (también llamada FtsI), FtsN y AmiC (*Piette A. y cols., 2004; Pastoret S. y cols., 2004*).

Se postula que el principal mecanismo de división celular está mediado por la proteína FtsZ, que forma un anillo polimérico que actúa como señal para la localización y posterior síntesis del septo del peptidoglicano, en este proceso intervienen diferentes proteínas (Fig.6). La división celular es un proceso complejo cuya regulación también involucra a múltiples reguladores transcripcionales y de esta manera la bacteria puede modular su nivel de división. Se observó que existe un mecanismo de autoinducción empleado por *E. coli* para regular la transcripción del operón *ftsQAZ* y que es activado por la proteína reguladora SdiA (*suppressor of cell division inhibitor*), que interacciona con el promotor *ftsQP2* in vivo. SdiA es

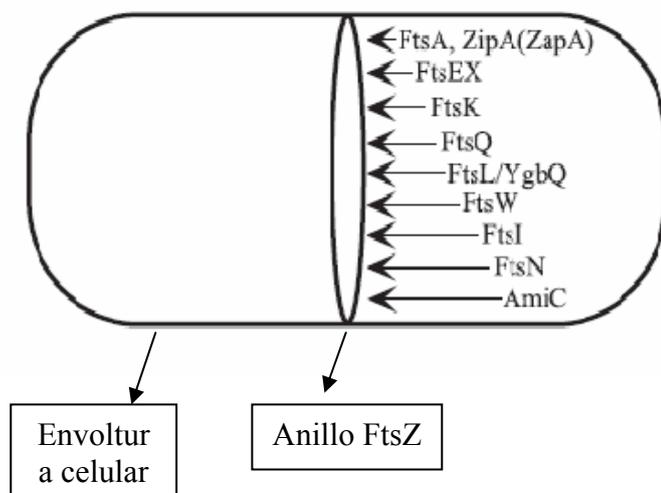
una molécula efectora producida por *E. coli* durante la transición de fase de crecimiento a fase estacionaria.

La estimulación de *ftsQAZ* lleva a que se sinteticen las proteínas FtsQ, FtsA y FtsZ que como mencionamos anteriormente están implicadas en la división celular de *E. coli* (Sitnikov D., 1996).

Cabe mencionar también que en las ciertas condiciones de cultivo de *E. coli*, la transcripción de *ftsQP2* se regula negativamente. Esta observación sugiere que los medios de cultivo ejercen un efecto condicionante en la producción de sustancias reguladoras y que las bacterias además modulan su crecimiento por medio de moléculas señales extracelulares (García-Lara y cols., 1996; Yamamoto K., 2001).



**Fig. 5:** Localización del anillo FtsZ para la posterior división de la *E. coli* en 2 células hijas (Aarsman Mirjam E.G. y cols., 2005).



**Fig.6:** Proteínas reclutadas en la formación del septo durante la división celular en *E. coli* (Wissel Mark C. & Weiss D.S., 2004)

Existen interacciones entre las proteínas involucradas en la división celular y en la síntesis del peptidoglicano (Fig. 7), recientemente se observó que la unión de

la proteína FtsZ al extremo C-terminal de FtsW refuerza la interacción de esta con PBP3, y esta unión podría ser el nexo entre la división celular y la formación del septo en las bacterias (*Datta P. y cols., 2006*).

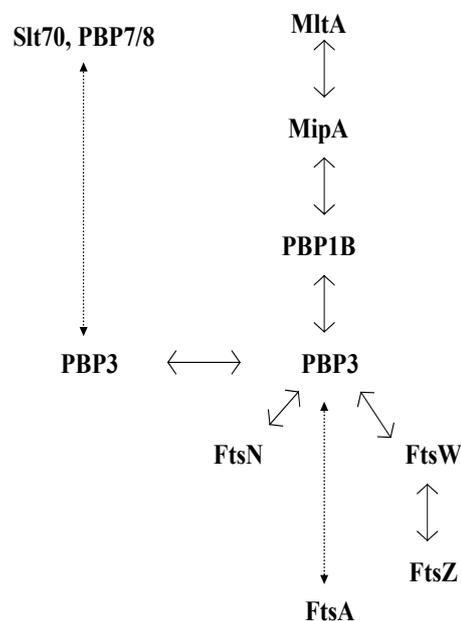
hidrolasas de la  
capa de mureína  
( glicosilasas/ endopeptidasas)

proteína estructural

mureína sintasa  
( transglicosilasa - transpeptidasa)

transpeptidasa específica de la  
división celular

proteínas necesarias  
para la  
división celular



**Fig. 7:** Interacciones entre enzimas involucradas en la síntesis del peptidoglicano y la división celular. las flechas continuas indican interacciones conocidas entre proteína – proteína, las flechas en puntos indican posibles interacciones. (*Bertsche U., 2006*)

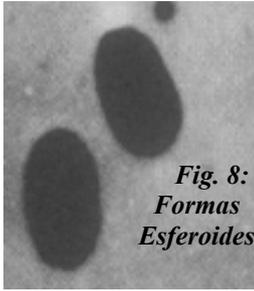
Dentro de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) podemos hacer mención a dos ellas; la PBP2 y la PBP3 (*Young K.D., 2003*) ya que juegan roles importantes en la morfogénesis de la bacteriana; la PBP2 es la que dirige la elongación celular mientras que la PBP3 actúa durante la septación, catalizando uniones cruzadas entre los péptidos del septo de peptidoglicano de la pared durante la división celular (*Piette A. y cols., 2004*). Se puede suponer entonces que el balance entre la elongación y la septación es el que establecerá el diámetro de la bacteria.

En los últimos años se han descrito formas aberrantes de *E. coli*, obtenidas por mutaciones, muchas veces generadas en tratamientos con diversas drogas, que pueden afectar la división celular, la replicación del ADN o la síntesis de su peptidoglicano (*Young K.D., 2003*).

Cuando se alteran las proteínas involucradas en la división celular como la FtsZ o las proteínas de unión a penicilina (PBP) es de esperar se obtengan formas que difieran a la forma bacilar normal de la *E. coli*.

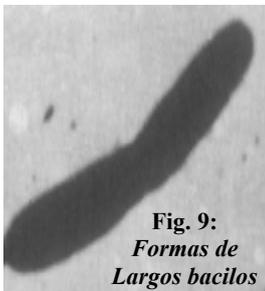
Se han observado formas ramificadas, en forma de horquilla, curvadas y espiraladas cuando se generan mutantes de *E. coli* que sobre producen la proteína FtsZ (*Young K.D., 2003*).

Asimismo se observó que mutaciones en las PBPs también modifican la forma de la bacteria, las cepas mutantes de *E. coli* carentes de la PBP 2 o que la



**Fig. 8:**  
**Formas**  
**Esferoides**

tengan inhibida por la presencia de antibióticos betalactámicos como imipenem o amdinocilina pierden la capacidad de elongarse y por ende adquieren forma redondeada (Fig.8) (Taschner P. y cols., 1988), ya que sólo esta activa la síntesis septal, este fenómeno es opuesto al que se observa cuando se inactiva la PBP3 (ya sea por inhibición ejercida en presencia de  $\beta$ -lactámicos como aztreonam, cefpirome, ceftazidima o por mutaciones) en cepas de *E. coli*, que al no poder sintetizar el septo adquieren la forma de largos bacilos (Fig.9) (Taschner P. y cols., 1988;



**Fig. 9:**  
**Formas de**  
**Largos bacilos**

Tormo A. y cols., 1986).

Hasta el momento la hiperexpresión de la PBP3 no se asocia con cambios en la morfología de las células bacterianas, incluso se han seleccionado mutantes que hiperexpresan PBP3 y tienen mutada alguna de las proteínas involucradas en la síntesis septal (FtsQ, FtsW, etc.) y no manifiestan cambios en la morfología, o se observan bacilos ligeramente mayores (Piette A., 2004).

Las alteraciones en las PBP1 no contribuyen demasiado en la morfología de la bacteria (Popham D.L. & Young K.D., 2003).

Pero además de las PBPs antes mencionadas, estudios recientes sugieren que el rol de las PBPs de bajo peso molecular (LMW PBPs), sería el de regular la morfología de la bacteria (Young K.D., 2003; Nilsen T. y cols., 2004). Se han observado grandes aberraciones morfológicas en cepas de *E. coli* que pierden las LMW PBPs, se requiere la delección de al menos 3 genes que codifiquen dichas proteínas, una de las cuales debe ser la PBP5 (Young K.D., 2003). En *E. coli*, la PBP5, una DD-carboxipeptidasa, es la que mantiene su forma bacilar de manera uniforme. (Meberg B.M. y cols., 2004; Popham D.L. & Young K.D., 2003). Por ejemplo las cepas mutantes de *E. coli* carentes de la PBP5, PBP4 y PBP7 poseen formas extraordinariamente irregulares (Young K.D., 2003), mientras que la sobreproducción de PBP5 en cepas de *E. coli* produce formas esféricas y luego lisis celular (Hiroyuki K. y cols., 2006).

Estudios recientes postulan que verdaderos cambios morfológicos se producen cuando se eliminan al menos dos funciones diferentes de la célula, es decir que en ausencia de la PBP5, la PBP4 y la PBP7 (dos endopetididasas accesorias) tendrían el papel de enmascarar la pérdida de la PBP5 y así se podría moderar la forma celular (*Popham D.L. & Young K.D., 2003; Young K.D., 2003*).

En los últimos años diferentes estudios sugieren que además de la pérdida de las PBPs, otra manera por la que se alteraría la morfología normal de las bacterias es mediante un incremento en la síntesis de algunas las PBPs. En *E. coli*, los niveles de PBP1A a PBP5 permanecen inalterados durante la fase estacionaria o se disminuyen con el tiempo, mientras que el nivel de PBP6 se encontró ser 2 a 10 más alto en células de fase estacionaria que fase exponencial de crecimiento (*Liao X., 1996*). Posteriormente se observó que en cepas de *E. coli*, un incremento en PBP6 hace que la bacteria entre en fase estacionaria, altera la composición del peptidoglicano y afecta la relación existente entre la elongación y septación, creando células mas cortas (*Popham D.L. & Young K.D., 2003*)

Se postula que el mecanismo por el cual la morfología se ve alterada es porque la delección o sobre-producción de estas proteínas alterarían el balance de sustratos que actúan vía FtsZ o afectarían las reacciones mediadas por la misma, de manera que el septo no se puede situar en el lugar adecuado llevando a divisiones anormales y por lo tanto formas aberrantes (*Nilsen T. y cols., 2004*).

**5.1 Relación estructura y actividad****5.2 Clasificación de las quinolonas****5.3 Mecanismo de acción de las quinolonas****5.4 Mecanismos de resistencia a quinolonas****5.4.1 Resistencia de tipo cromosómico****5.4.2 Resistencias basadas en el eflujo activo del fármaco****5.4.3 Resistencia por alteración en la membrana externa bacteriana****5.4.4 Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos****5.5 Otros efectos inducidos por las quinolonas: *la respuesta SOS***

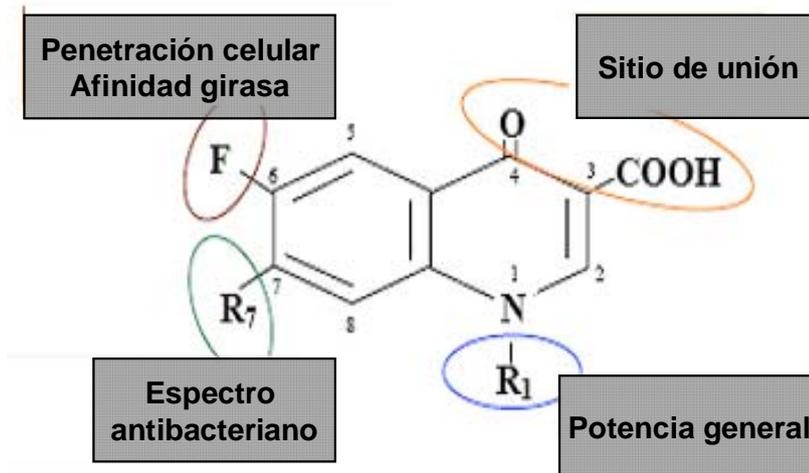
Las quinolonas son agentes antimicrobianos de síntesis química usados para el tratamiento de varios tipos de infecciones tanto en humanos como animales.

*Lesher* en 1962 durante el proceso de purificación de la cloroquina descubrió el ácido nalidíxico, que fue destinado al tratamiento de las infecciones urinarias producidas por bacterias gram-negativas. A partir de este compuesto, han surgido un conjunto de compuestos análogos con actividad antibacteriana (*Ball P., 2000*).

**5.1 Relación estructura y actividad**

La estructura química básica de estos agentes es una estructura bicíclica 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína o 4-quinolona compuesta de dos anillos, uno de tipo piridona, con un ácido carboxílico libre en la posición 3, un átomo de nitrógeno en la posición 1, y un grupo carbonilo en la posición 4 y un segundo anillo, aromático, bencénico o de otro tipo. Para que el núcleo bicíclico se active es necesario que el nitrógeno de la posición 1 incorpore una cadena lineal o cíclica (*Ball P., 2000*).

Las quinolonas poseen un esqueleto común, que determina su actividad antimicrobiana. A continuación se muestra un esquema de los principales sitios que determinan la relación entre la estructura química y la actividad de las quinolonas.



**Fig. 1:** Gráfico que muestra los principales sitios que determinan la relación estructura actividad de las quinolonas (modificado de Domagala JM., 1994).

Las sustituciones o modificaciones químicas en las distintas posiciones de estos anillos pueden modificar las características farmacológicas como la actividad frente a los tipos de bacterias.

Los grupos carboxilos C-3 y carbonilo C-4 son esenciales para la actividad bactericida, porque median la unión del complejo ADN-ADN girasa, el C-2 se encuentra muy próximo a éstos por lo que las modificaciones en este suelen ser menores, sin embargo la posición C-6 es un punto muy importante, porque la sustitución por un átomo de fluor parece estar asociada a una mayor actividad antibacteriana y a un mejor espectro de acción, respecto a otros sustituyentes como H, Cl, Br, COCH<sub>3</sub>, CN o NO<sub>2</sub>. El átomo de flúor también intensifica procesos como la penetración a través de la pared bacteriana y la inhibición de la ADN girasa. En concreto se le atribuye un aumento de la inhibición de la ADN girasa y una mayor penetración en la célula. En la posición C-7 de la molécula los sustituyentes pequeños tienen una moderada actividad biológica, mientras que aquellas quinolonas que tienen un anillo heterocíclico en esta posición presentan una mayor actividad antibacteriana. Por último se ha demostrado que la potencia antibacteriana y la estabilidad de la molécula está enormemente influida por el sustituyente en la posición N-1 (*Antimicrobianos en medicina; Appelbaum PC. & Hunter PA., 2000*).

## 5.2 Clasificación de las quinolonas

Se las suele agrupar en generaciones relacionadas con su época de aparición, estructura química y sobre todo con el espectro bacteriano (*Mella MS. y cols., 2000*).

Quinolonas de 1º generación: este grupo está representado por las quinolonas más antiguas el **ácido nalidíxico**, ácido oxolínico, cinoxacina, ácido pipemídico, rosoxacina y flumequina. Presentaban espectro reducido frente a especies de enterobacterias y no sobre especies de implicancia clínica como la *Pseudomonas* y cocos gram-positivos. Se las uso en infecciones urinarias no complicadas.

Quinolonas de 2º generación: luego aparecieron las fluoroquinolonas (FQ), entre las que se encuentra la **norfloxacin**, **ciprofloxacina**, ofloxacina, pefloxacina, enoxacina, fleroxacina, tomafloxacin, **lomefloxacina**, difloxacina y muchas otras. Estas quinolonas presentan un átomo de fluor e posición 6, que permite aumentar tanto la afinidad por sus blancos (topoisomerasa tipo II) como la capacidad de penetración al interior de la célula bacteriana, hasta 70 veces con respecto a las que no poseen fluor en esa posición y además poseen un sustituyente piperazinil o pirrolidin (diamida cíclica) en posición 7 del núcleo quinolónico. Estas quinolonas presentan mayor espectro bacteriano, mayor potencia, menor toxicidad y menos efectos secundarios

Quinolonas de 3º generación: entre las que encontramos la sparfloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, grepafloxacina, pazufloxacina, tosufloxacina, temafloxacina, balofloxacina. Presentan mayor complejidad estructural que las de 1º y 2º generación, tiene sustituyentes fluorados adicionales mejorando el espectro e acción contra cocos gram-positivos, pero algunas de ellas se han retirado del mercado por registrarse efectos tóxicos (esparfloxacina, grepafloxacina)

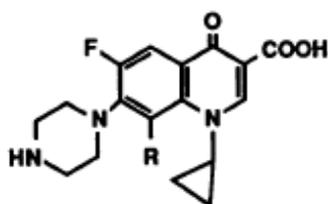
Quinolonas de 4º generación: se han sintetizado nuevos compuestos derivados de los anteriores que poseen mayor espectro de acción frente a anaerobios, abriendo la posibilidad de tratamientos de infecciones mixtas. Entre los que se pueden nombrar la clinafloxacina, trovafloxacina (retirada del mercado), difloxacina, gemifloxacina, sitafloxacina y tosufloxacina (a algunas de las quinolonas de 3º generación suelen clasificarlas también como de 4º).

*Nota: Las quinolonas marcadas son las usadas en este estudio (ver Fig. 2)*

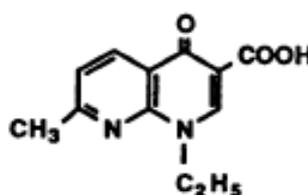
En cambio si las clasificamos de acuerdo a la estructura química básica se pueden definir cuatro grupos diferentes, según el número y la posición de los átomos de nitrógeno de la molécula, todos ellos incluidos bajo la denominación de quinolonas.

Estos grupos son los siguientes:

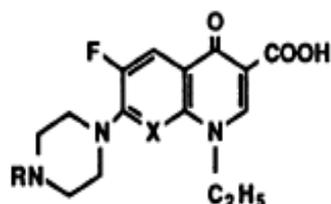
- ✓ BENZOPIRIDONAS o QUINOLONAS: Contienen un único átomo de nitrógeno en la posición 1. Es, con mucho, el núcleo más utilizado en la síntesis de quinolonas.
- ✓ NAFTIRIDINAS: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 8.
- ✓ PIRIDOPIRIMIDINAS: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1, 6 y 8.
- ✓ CINOLONAS: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 2.



Ácido Nalidíxico



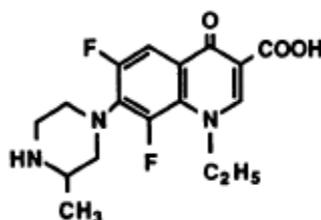
Ciprofloxacina



Norfloxacina

X = CH R = H

Lomefloxacina



**Fig. 2:** Estructura química de las quinolonas usadas en este estudio (Chu DT. y cols., 1989).

### 5.3 Mecanismo de acción de las quinolonas

Para comprender el mecanismo de acción de las quinolonas es necesario tener en cuenta que el ADN bacteriano es una molécula que para acomodarse en el interior de la célula necesita condensarse mediante superenrollamientos negativos necesarios para la replicación (*Hooper DC., 2000; Hawkey PM., 2003*), éstos generan una gran tensión torsional que tiende a liberarse mediante la reconversión de esta energía en energía mecánica que rompe los puentes de unión entre los nucleótidos de las cadenas complementarias de ADN dando lugar a desnaturalizaciones locales de la hélice de ADN. En los procesos de replicación, transcripción, o reparación del ADN suelen producirse cambios en el estado topológico del ADN y éstos suelen ser eliminados por enzimas denominadas genéricamente como topoisomerasas.

Las quinolonas ejercen su acción al penetrar en el citoplasma bacteriano mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de los canales acuosos de las porinas o de la capa de los lipopolisacáridos (*Nikaido H., 1993, Nordmann P., 2005*). Una vez en el interior de la célula actúan inhibiendo las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, formando un complejo ternario entre quinolona, enzima y ADN bloqueando el proceso de replicación del ADN (*Hawkey PM., 2003; Tran J. & Jacoby G., 2002*), además al no poder compactarse el ADN bacteriano se produce como resultado una carencia de espacio en el citoplasma bacteriano incapaz de contener la estructura del ADN sin enrollar.

#### ● Topoisomerasas:

Las Topoisomerasas son enzimas necesarias para la viabilidad de todos los organismos, puesto que controlan y modifican el estado topológico del ADN por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico (*Wang JC., 1996*).

A las topoisomerasas se las puede dividir en dos clases dependiendo de si actúan en una hélice del ADN (tipo I) o en ambas (tipo II) (*Nordmann P., 2005*). Las topoisomerasas tipo I y III son enzimas tipo I, mientras que la girasa y topoisomerasa IV son enzimas tipo II. Las topoisomerasas de tipo II son esenciales para el crecimiento bacteriano, las topoisomerasas de tipo I no lo son, puesto que su pérdida puede compensarse por alteración de los genes de las topoisomerasas de tipo II (*Ince D. & Hooper D., 2003*).

## ✓ ADN girasa o topoisomerasa II

La ADN girasa es un complejo tetramérico  $A_2B_2$  (374 kDa), formado por dos monómeros A (GyrA) y dos monómeros B (GyrB) codificados por los genes *gyrA* (2625 pb) y *gyrB* (2413 pb) estando ubicados ambos genes en el minuto 48 y 83, respectivamente del cromosoma de *E. coli* K-12 (Kevan L., 1980; Hawkey PM., 2003). La proteína GyrA presenta una cabeza amino terminal y una cola carboxi proximal. Esta proteína es de tipo hélice-giro-hélice (HTH), y adopta diferentes topologías para permitir la apertura y el cierre a través del cual debe pasar el ADN. Las proteínas GyrA (97 kDa) y GyrB (90kDa) son las dianas de las 4-quinolonas y de las cumarinas, respectivamente (Reece J. y cols. 1991).

Para que la ADN girasa ejerza su acción es necesaria la presencia de ambas subunidades y de ATP (Hawkey PM., 2003). La enzima ADN girasa es una topoisomerasa tipo II que cataliza el superenrollamiento negativo del ADN procariótico, utilizando la energía libre liberada de la hidrólisis del ATP. Así pues, la ADN girasa introduce superenrollamientos en la doble hélice dando lugar a la estructura tridimensional altamente condensada del ADN. Parece que las quinolonas inhiben la acción de la ADN girasa en la subunidad A, aunque ciertas quinolonas actúan también sobre la subunidad B. Las quinolonas al actuar sobre la subunidad A, impiden el cierre de los cortes producidos en el ADN, por lo que se inhibe su replicación (Sanders CC., 2001). En estudios anteriores, se encontró que la ADN girasa es el principal sitio de acción de las quinolonas en *E. coli*, mientras que la actividad de estos sobre la topoisomerasa IV es limitada y sería un sitio blanco secundario en esta especie (Hooper DC., 2000).

No me extenderé más en el apartado de resistencia a quinolonas por mutaciones en topoisomerasas porque ello no es objeto de este estudio.

### Mecanismo de acción de la ADN girasa en el proceso de replicación del ADN:

El proceso de superenrollamiento negativo se realiza en varias etapas. El primer paso es la interacción de la ADN girasa con el ADN de doble cadena. Seguidamente, el enzima rompe el ADN y se une covalentemente de forma transitoria a los extremos 5' libres del ADN por medio de la tirosina 122 de la subunidad GyrA. El ADN pasa a través del punto de rotura. Por último, la rotura del ADN es sellada y la ADN girasa se disocia, lo que está condicionado por la

hidrólisis de dos moléculas de ATP, y de las dos subunidades GyrB que producirían un cambio conformacional del enzima.

#### ✓ Topoisomerasa IV

La topoisomerasa IV, otra enzima de tipo II, es también un tetrámero C<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, formado por dos subunidades C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE* respectivamente (Hawkey PM., 2003). Para ejercer su acción al igual que la ADN girasa requiere la presencia de las dos subunidades y de ATP.

Esta enzima lo que hace es controlar la relajación del ADN ((Nordmann P., 2005). Resulta interesante que los aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los codificados por *gyrA* y *gyrB* (Hopkins KL., 2005). Secuencias similares se sitúan especialmente alrededor de la región conocida como región determinante en la aparición de resistencias bacterianas a las quinolonas (QRDR, del inglés quinolone resistance-determining regions).

Esta similitud en la secuencia de aminoácidos entre la ADN girasa y la Topoisomerasa IV, especialmente en las posiciones productoras de resistencia a las quinolonas de la proteína GyrA de la girasa, implica que las quinolonas pueden inhibir la actividad de la topoisomerasa IV tanto como la de la ADN girasa (Kato J. y cols., 1990; Yoshida H. y cols., 1990).

### **5.4 Mecanismos de resistencia a quinolonas**

Debido al amplio espectro de actividad que presentan las quinolonas, éstas han sido utilizadas para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones producidas por bacterias gram-negativas, entre ellas *E. coli*. De manera que las bacterias resistentes a las quinolonas aparecen en clínica como resultado del uso indiscriminado de las mismas.

Para ejercer su efecto citotóxico las quinolonas deben penetrar la membrana bacteriana para alcanzar su diana celular, ADN girasa o topoisomerasa IV, y de esta forma inducir la muerte celular. Por lo que, las resistencias a las quinolonas, pueden ser debidas a mutaciones que afecten cualquier paso de este proceso (Webber M. & Piddock L., 2001).

Se han descrito varios mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas tanto intrínsecos como adquiridos, y éstos pueden agruparse en cuatro grupos, siendo los tres primeros los más frecuentemente descritos hasta la fecha (Webber M. & Piddock L., 2001; Ince D. & Hooper D., 2003):

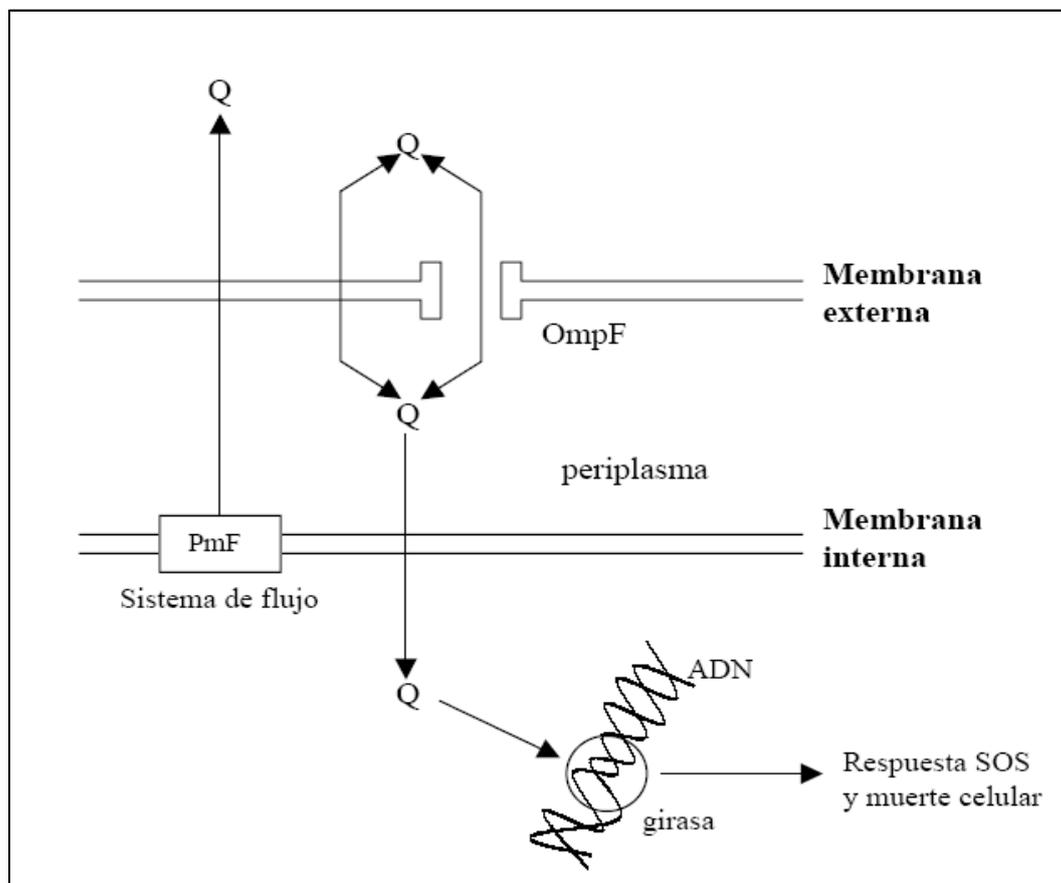
#### 4.1 Resistencia de tipo cromosómico

#### 4.2 Resistencias basadas en el eflujo del fármaco

#### 4.3 Resistencia por alteración en la membrana externa bacteriana

#### 4.4 Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

Estos mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación, si bien se considera que *in vivo* el aumento en los niveles de resistencia a las quinolonas debe ser el resultado de la acción simultánea de varios mecanismos (Fig. 3).



**Fig. 3:** Esquema de los mecanismos de resistencias a quinolonas en *E. coli* (Wojciechowski MF. y cols., 1991).

#### 5.4.1- Resistencia de tipo cromosómico

La resistencia adquirida a las quinolonas suele manifestarse mediante mutaciones cromosómicas que afectan a los genes blancos de estos antimicrobianos. En bacterias gram-negativas la ADN girasa parece ser el blanco preferido de las quinolonas mientras que la topoisomerasa IV lo es en las bacterias gram-positivas (Hooper DC., 2000; Hawkey PM., 2003). De manera que no es casual que la alteración de las subunidades de estas enzimas sea el principal mecanismo de resistencia encontrado en aislamientos clínicos, mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la ADN girasa (GyrA), es el más común en la resistencia a quinolonas por bacterias gram-negativas (Tavío MM. y cols., 1999, Yoshida H. y cols., 1990), mientras que mutaciones en *parC*, el gen que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV (ParC) es más frecuentemente encontrado en los gram-positivos (Sanders CC., 2001). Mutaciones en el dominio N-terminal de GyrA o en el extremo C-terminal de GyrB aumentan los niveles de resistencia a quinolonas, generalmente de 4 a 8 veces. En *E. coli*, las mutaciones en la topoisomerasa IV no confieren por si solas aumentos en la resistencia, pero multiplican las atribuibles a GyrA, incrementándola a su vez de 4 a 8 veces (Tran J. & Jacoby G., 2002).

También se han observado mutaciones que afectan a la subunidad B (GyrB) de la ADN girasa o a la subunidad E de la topoisomerasa IV (ParE) pero son menos comunes de encontrar y generalmente son secundarias a las mutaciones en las otras 2 subunidades (Antimicrobianos en medicina; Sanders CC., 2001; Kern WV. y cols., 2000).

Esta modificaciones se producen en determinadas secuencias de aminoácidos, en ciertas regiones de las topoisomerasas, denominadas regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (“*quinolone Resistance determining regions*” o QRDRs). Estas regiones están comprendidas entre los aminoácido 67 y 106 en GyrA, siendo los aminoácidos 83 y 87 los más frecuentemente involucrados. Las sustituciones más comúnmente encontradas en la ADN girasa de *E. coli* son: Ser83Phe, Ser83Leu (Li Xian-Zhi, 2005), Asp87Asn (Tavío MM. y cols., 1999; Li Xian-Zhi, 2005), Ser83Ala, Ala83Val (Tavío MM. y cols., 1999). Similares regiones QRDR se encuentran en regiones análogas en ParC (Nakamura S., 1997; Wolfson JS. & Hooper DC., 1989).

En el proceso de selección de resistencia, las mutaciones producidas en los genes que codifican la principal enzima blanco generan resistencia a las quinolonas, sin embargo en pasos sucesivos se producen mutaciones que afectan también a los genes codificantes de la segunda diana, y como resultado de estas dobles mutaciones se obtienen cepas con altos niveles de resistencia a quinolonas (*Oethinger M. y cols., 2000, Hooper DC., 2000*).

Como mencionamos anteriormente las mutaciones en *gyrA*, son las primeras mutaciones visibles dentro de una cadena de eventos que conduce a mayores niveles de resistencia a quinolonas, pero dentro de eventos suelen producirse mutaciones en otros genes, como en el operón *marRAB*. Como se mencionó en capítulos anteriores cuando se sobre expresa *marA*, las cepas de *E. coli* expresan incrementos en la resistencia a diferentes antimicrobianos no relacionados estructuralmente, entre los que encontramos a las quinolonas. Si bien los niveles de resistencia a fluoroquinolonas producidos por la sobre-expresión de *marA* son menores a los obtenidos por mutaciones puntuales en *gyrA*, cuando ambas mutaciones se manifiestan al mismo tiempo se observan efectos multiplicativos en la resistencia a las mismas (*Oethinger M. y cols., 2000*).

Una mutación adicional puede producirse en genes que codifican sistemas de eflujo activo (*Yang S. y cols. 2003*). Se observó que las cepas de *E. coli* adquieren los mayores niveles de resistencia a fluoroquinolonas cuando además de las mutaciones anteriores (*gyrA, marRAB*) sobre-expresan el sistema AcrAB, su principal sistema de eflujo activo (*Oethinger M. y cols., 2000*).

#### **5.4.2- Resistencia basada en la expulsión activa de los fármacos**

Las quinolonas, difunden hacia el citoplasma de la célula, ya sea a través de las porinas o por difusión pasiva atravesando la bicapa lipídica, pero estas vías de acceso pueden ser contrarrestadas por un mecanismo de transporte transmembrana protón-dependiente, que tiende a expulsar las quinolonas al medio externo, evitando su acumulación citoplasmática.

Si bien las mutaciones en los genes codificantes de los blancos son el principal mecanismo de resistencia a quinolonas, se observó que cuando a cepas de *E. coli* se les deleccionaba el gen *acrAB*, por más que posean dichas mutaciones, éstas disminuían marcadamente la resistencia a fluoroquinolonas, demostrando así

el importante papel que tiene dicho sistema de eflujo activo como mecanismo de resistencia (*Oethinger M. y cols., 2000*).

En *E. coli*, el principal sistema de eflujo es AcrAB-TolC, esta bomba expelle una gran variedad de fármacos desde el interior celular al medio externo, incluyendo las quinolonas, presumiblemente a través del canal TolC de la membrana externa (*Nikaido H. & Zgurskaya HI., 2001; Nikaido H., 1996*). Cuando el sistema Acr se sobre expresa puede incrementarse el eflujo de los antimicrobianos, contribuyendo así a una mayor resistencia de *E. coli* a las quinolonas (*Ellington MJ., 2006*).

Este sistema está sujeto a varios niveles de regulación, es modulado por su represor ArcR y por reguladores globales como las proteínas MarA, SoxS, Rob o SdiA. El locus *acrAB* suele considerarse como parte de los regulones *mar*, *sox*, *rob* y *sdiA* (*Olliver A. y cols., 2004*), de manera que alteraciones en el sistema regulatorio MarA, SoxS, Rob y SdiA pueden causar incrementos en la resistencia a quinolonas (*Nordmann P., 2005*).

Las cepas de *E. coli* con mutaciones en *acrR* o en los locus *mar* (múltiple resistencia a antimicrobianos), *sox* y *rob* o bien la sobre-expresión de *sdiA* tienen aumentada la expresión de los genes *acrA* y *acrB*. Por lo tanto es de esperar que las cepas de *E. coli* que expresan el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos presenten resistencia a quinolonas no sólo debido a una disminución en la entrada de las quinolonas a la célula por pérdida de las porinas sino por un aumento en la salida del fármaco a través de estas bombas de expulsión (*Jellen-Ritter AS. & Kern WV., 2001*).

Existen otros sistemas de eflujo en *E. coli* homólogos a *acrAB* que también podrían estar involucrados en la resistencia a quinolonas (*YhiV*, *acrEF* y *acrD*) (*Webber M. & Piddock L., 2001*). Se observó que la sobre expresión de AcrAB, MdfA o NorE, que pertenecen a diferentes familias de transportadores, producen un incremento de 3 a 6 veces en la resistencia a fluoroquinolonas y que la sobre-expresión simultanea de un sistema perteneciente a la familia RND (como es AcrAB) y un sistema tipo MFS (como es MdfA) producen incrementos multiplicativos sobre al resistencia a drogas. La sobre-expresión simultanea de AcrAB y MdfA en cepas de *E. coli* incrementa de 8 a 11 veces la resistencia a norfloxacin y ciprofloxacina, similar a lo que ocurre cuando se sobre-expresa AcrAB y NorE donde el incremento fue de 7 a 11 veces. Pero la resistencia a

algunas fluoroquinolonas como ofloxacina, levofloxacina y sparfloxacina no se vio afectada por la sobre-expresión de ninguno de estos tres sistemas activos de expulsión, indicando que estos medicamentos no son buenos sustratos de dichos sistemas de eflujo activo (Yang S. y cols., 2003).

#### **5.4.3- Resistencia por alteración en la membrana externa bacteriana**

Las mutaciones en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas o QRDRs en las enzimas girasa o topoisomerasa IV no son los únicos mecanismos que desarrollan los microorganismos frente a la acción de estos agentes bactericidas, pues la resistencia a quinolonas puede estar condicionada por los procesos de transporte a través de la membrana.

Las quinolonas hidrofílicas, atraviesan la membrana de las bacterias gram-negativas a través de los poros de las porinas OmpF y OmpC. Así los cambios de permeabilidad de la membrana externa generados por alteración tanto en la cantidad como en la naturaleza de las porinas, generan resistencias a quinolonas de bajo nivel (Hawkey PM., 2003).

Las variaciones en las porinas pueden generarse como resultado de alteraciones en los genes que codifican (*ompF*) o regulan (*micF*) a las porinas, a través de las que difunden las quinolonas más hidrofílicas como las fluoroquinolonas (Mitsuyama J. y cols., 1992). Se han observado que mutantes de *E. coli* resistentes a quinolonas hidrofílicas tenían a su vez reducción en el número de porinas OmpF en la membrana externa (Cohen SP. Y cols., 1989), sin embargo la sensibilidad de las cepas de *E. coli* permanecía sin variaciones en cepas carentes de la OmpC (Hirai K y cols., 1986). Se observó que la pérdida de OmpF contribuye a aumentar la resistencia de 2 a 4 veces a aquellas quinolonas que utilizan esta vía de ingreso como norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, etc. (Hirai K. y cols., 1986).

Las moléculas hidrofóbicas en cambio pueden utilizar una ruta alternativa de difusión a través de la bicapa lipídica gracias a su capacidad de quelación del magnesio, que se encuentra en la membrana externa estabilizando el lipopolisacárido (Nikaido H. y cols., 1993; Chapman JS. & Georgopapadaku NH., 1988). Asimismo se observó que las mutantes deficientes de LPS (rugosas) eran más susceptibles a las quinolonas hidrofóbicas que las cepas origen, sugiriendo que el pasaje de las quinolonas a través de la membrana externa no esta limitada por las

porinas (*Mitsuyama J. y cols., 1992*). Diferentes evidencias asocian cambios en la estructura del LPS como un factor que contribuye a variar la sensibilidad a las quinolonas (*Tavío MM. y cols., 1999; Chenia y cols., 2006*). Los datos sugieren que cuanto más alta es la hidrofobicidad de la quinolona, mayor es la actividad antibacteriana contra las mutantes deficientes de LPS. Las diferencias en la susceptibilidad, entre estas mutantes y la cepa origen, se observaron cuando los compuestos hidrofóbicos tenían coeficientes de partición mayores a 2.0, tales como ácido nalidíxico. Sin embargo la sensibilidad a las quinolonas más hidrofílicas como norfloxacin y ciprofloxacina no se vieron afectadas por cambios en la estructura del LPS (*Hirai K. y cols., 1986*).

Estos datos sugieren que la alteración en la estructura del LPS de la membrana externa afecta la permeabilidad de quinolonas hidrófobas tales como el ácido nalidíxico.

Las cepas de *E. coli* que expresan fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos presentan resistencias cruzadas con una gran variedad de antimicrobianos hidrofílicos e hidrofóbicos no relacionados estructuralmente, entre ellos las quinolonas y aunque en estas cepas se han observado bajos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, éstos se suelen considerar como los primeros pasos en el desarrollo de mayores niveles de resistencia clínicamente significantes (*Goldman JD. y cols., 1996*). Asimismo otros estudios mostraron que cepas de *E. coli* con elevada resistencia a las fluoroquinolonas aisladas de muestras clínicas, expresaban el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos e incremento en la tolerancia a los solventes orgánicos (*Kern WV. y cols., 2000*).

Las mutaciones que afectan la permeabilidad confieren bajos niveles de resistencia a las quinolonas, pero favorecen a aparición de resistencias cruzadas a otros antimicrobianos no estructuralmente relacionados (*Cohen SP. y cols., 1989; Maneewannakul K. & Levy SB., 1996*) y suelen considerarse como el primer paso en una serie de eventos que llevan a que las cepas supervivientes muten y adquieran valores de resistencia clínicamente significativos.

#### **5.4.4- Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos**

El primer caso de resistencia mediada por plásmidos fue identificado en 1994 en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* de origen urinario en Birmingham (Estados Unidos) (*Nordmann P., 2005*), pero este tipo de resistencia, si bien es poco

frecuente, se la evidenció también en diferentes enterobacterias como en *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* (Corkill J. y cols., 2005). Con este hallazgo, y siendo relativamente nuevo, se abrió una nueva era en los mecanismos de resistencia a quinolonas.

El gen responsable de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR [plasmid-mediated quinolone resistance]) es llamado *qnr* o *qnrA* y está ubicado en un plásmido en una zona tipo integrón. El producto de este gen es una proteína de 218 aminoácidos conocida como QnrA cuya función es proteger a la ADN girasa y topoisomerasa IV (Ellington MJ., 2006; Nordmann P., 2005; Corkill J. y cols., 2005) de la inhibición por quinolonas (Li Xian-Zhi, 2005; Cheung T. y cols., 2005).

QnrA pertenece a una familia de proteínas con presentan repeticiones pentapeptídicas. Este tipo de proteínas, si bien han sido caracterizadas en diferentes especies bacterianas, son particularmente comunes en las cianobacterias y presentan una estructura apropiada para la interacción entre proteínas (Nordmann P., 2005). Pero además de QnrA se han caracterizado otras variantes como QnrB en cepas de *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, y QnrS en *Shigella flexneri* es QnrB y QnrS comparten el 40% y 59% respectivamente con la secuencia aminoacídica de QnrA (Nordmann P., 2005).

Se observó que la presencia del plásmido pMG252 (portador del gen *qnr*) incrementa de 4 a 8 veces la resistencia a ácido nalidíxico y a otras fluoroquinolonas (Tran J. & Jacoby G., 2002; Martínez Rodríguez JM. y cols., 2003), incluso en otros estudios se citaron incrementos de 32 veces (Robicsek A y cols., 2005), sin embargo estos incrementos son insuficientes para convertir cepas de *Enterobacteriaceae* de susceptibles a resistentes a quinolonas, pero la importancia de este gen *qnrA* es que facilita la selección de cepas mutantes con mayores niveles de resistencia (Robicsek A y cols., 2005).

Si bien la presencia de este plásmido produce incrementos en la resistencia a quinolonas, en otros trabajos se observó que las cepas “Qnr positivas de origen clínico” poseían mayores niveles de resistencia que las “Qnr positivas transconjugantes”, y esto es debido a que la resistencia plasmídica complementa a los demás mecanismos de resistencia que posee la bacteria como mutaciones en *gyrA* o *gyrB*, pérdida de porinas o alteración en los sistemas de eflujo teniendo un efecto adicional sobre la resistencia manifiesta por dichas cepas clínicas (Tran J. & Jacoby G., 2002; Nordmann P., 2005).

También son especialmente importantes otros dos miembros de la familia de pentapéptidos. Uno es McbG, un componente que protege a la bacteria de la microcina B17 (MccB17). Las microcinas son pequeñas proteínas inhibitorias ( $\leq$  10 kDa), que son codificadas por plásmidos bacterianos y difieren en el mecanismo de acción (Jacoby G., 2003). MccB17 es un péptido modificado post-transcripcionalmente que bloquea la replicación del ADN y puede como las quinolonas inhibir a la ADN girasa. En este mecanismo están involucrados al menos tres genes: *mcbE* y *mcbF* (involucrados en el eflujo de este pentapéptido hacia el exterior celular) y *mcbG* (que protege a la célula de microcinas externas). Se observó que las cepas bacterianas que portan un plásmido con los genes *mcbEFG* incrementan de 2 a 8 veces los niveles de resistencia a ciertas fluoroquinolonas como la sparfloxacina (Tran J. & Jacoby G., 2002). Asimismo se observó que cepas de *E. coli* que portaban el plásmido pMG277 (plásmido portador de *mcbG*) incrementaban la resistencia a sparfloxacina, pero no afectaban la susceptibilidad a ciprofloxacina o ácido nalidíxico, también se vio que las cepas que poseían el plásmido pMM39 (portador de los genes *mcbABCDEFGG*) mostraban disminuida en 2 veces la sensibilidad a sparfloxacina (Jacoby G., 2003).

Un segundo miembro de esta familia, descrito más recientemente, es MfpA (una proteína clonada de *Mycobacterium smegmatis*) que puede contribuir a la resistencia a quinolonas usando sistemas de eflujo (Nordmann P., 2005). Se ha descrito que los plásmidos que codifican para dicho pentapéptido pueden incrementar hasta 4 veces los niveles de resistencia a ciprofloxacina (Tran J. & Jacoby G., 2002). QnrA comparte el 19,6% y 18,9% de homología con McbG y MfpA respectivamente (Nordmann P., 2005).

Es de destacar que diversas cepas de enterobacterias “*qnrA* positivas” a su vez expresan  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido inhibidas por ácido clavulánico (ESBLs) como SHV-5, SHV-7, VEB-1 (Nordmann P., 2005), SHV-12 (Corkill J. y cols., 2005), CTX-M (Cheung T. y cols., 2005) o han sido asociadas a  $\beta$ -lactamasas plasmídicas AmpC (Corkill J. y cols., 2005). Si bien el número de cepas estudiadas hasta la fecha sigue siendo bajo y no se ha encontrado una base genética que vincule a ambos mecanismos, existe un considerable nivel de asociación entre éstos que podrían en un futuro explicar en parte la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y a fluoroquinolonas que expresan muchas de las enterobacterias (Nordmann P., 2005; Lavigne Jean-Philippe y cols., 2006).

Si bien en la actualidad las cepas de enterobacterias *qnr* positivas son poco frecuentes (menor al 2 %) (*Corkill J. y cols., 2005*), la posibilidad de la localización de este gen *qnr* dentro de plásmidos y/o integrones puede facilitar la diseminación por transferencia horizontal entre las cepas y por ende puede contribuir en un futuro a la diseminación de la resistencia a fluoroquinolonas (*Hopkins KL. y cols., 2005; Li Xian-Zhi, 2005; Poirel L. y cols., 2006; Poirel L. y cols., 2005; Mammeri H. y cols., 2005*).

### **5.5 Otros efectos inducidos por las quinolonas: la respuesta SOS**

La primera acción de las quinolonas en la acción bactericida es la inhibición de la síntesis del ADN debido a la interacción del fármaco con la ADN girasa bacteriana. Dicha interacción genera lesiones en el ADN, lo que induce la respuesta SOS como consecuencia de este efecto.

El sistema SOS es un regulón integrado por más de 30 genes que responde a lesiones en el ADN. La expresión de dichos genes no es constitutiva, sino inducida por un gran número de lesiones existentes y tienen como objetivo el codificar proteínas involucradas en la reparación del ADN, recombinación, mutagénesis y mantener la viabilidad celular, hasta que el daño haya sido completamente reparado (*Piddock L. & Wise R, 1987*). Con la activación de estos genes se consigue reparar las lesiones generadas por las quinolonas y garantizar la supervivencia de la célula (*Dmitry V. y cols., 1998*).

La inducción de este sistema SOS empieza cuando la replicación del ADN es bloqueada y se acumulan regiones en el ADN de cadena sencilla (ssADN) que actúan como señal inductora de la respuesta SOS. Se cree que la proteína RecA reconoce dichas secuencias de ssADN y formaría un complejo ternario con el ssADN y un nucleósido trifosfato, lo que provocaría un cambio conformacional reversible de la proteína RecA. De este modo RecA pasa a la forma activa RecA\* que posee actividad coproteásica (*Palejwala VA. y cols., 1995; Wojciechowski MF. y cols., 1991*). La coproteasa RecA\* interacciona con LexA y promueve la autohidrólisis produciéndose una rotura entre los residuos Ala-84 y Gly-85 del dominio carboxi terminal (*Wojciechowski MF. y cols. 1991*).

Una vez que se han reparado las lesiones disminuye la cantidad de RecA\*, se incrementa la de LexA activa y el sistema vuelve a estar reprimido.

# 6

## MÚLTIPLE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Operón *marRAB* y *soxRS*

### A. Operón *marRAB*

#### 6.1 Introducción

#### 6.2 Estructura y función del operón *mar*

#### 6.3 MarR

##### 6.3.1- Familia MarR/SlyA

##### 6.3.2- Características estructurales de la proteína MarR

##### 6.3.3- MarR y la regulación del operón *mar*

#### 6.4 MarA

##### 6.4.1- Familia XylS/AraC

##### 6.4.2- MarA y la regulación del operón *mar*

##### 6.4.3- Características estructurales de MarA

#### 6.5 MarB y MarC

### B. Operón *soxRS*

### C. Otras proteínas regulatorias homólogas a MarA y SoxS: Rob

### A. Operón *marRAB*

#### 6.1 Introducción

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria que se hospeda en diferentes ecosistemas y hospedadores. Esta bacteria entérica sobrevive en ambientes ricos en agentes nocivos como sales biliares, detergentes y ácidos grasos (Fralick J., 1996). En orden a satisfacer sus necesidades de supervivencia ante diferentes condiciones ambientales, esta especie presumiblemente ha desarrollado diferentes locus regulatorios que controlan las respuestas ante dichas situaciones de estrés como cambios de temperatura, pH, estrés oxidativo, bajos niveles de oxígeno y fuentes de energía, presencia de solventes orgánicos, antimicrobianos, desinfectantes entre otros (Barbosa T. & Levy SB., 2000).

Algunos de estos sistemas regulatorios son Mar, SoxRS, SOS, OxyR y Fur que tienen la capacidad de producir una respuesta global por activación o represión de múltiples genes en el cromosoma bacteriano (Barbosa T. & Levy SB., 2000; Michán C. y cols., 2002).

Hasta hace algún tiempo, la múltiple resistencia a antimicrobianos era sólo atribuida a la adquisición de plásmidos, transposones o integrones. Pero en los últimos años se han descubierto evidencias de la existencia de sistemas intrínsecos que confieren múltiple resistencia a antimicrobianos (*Randall LP. & Woodward MJ., 2002; Alekshun M. & Levy SB. 1997*). El primero de estos sistemas cromosómicos “locus *mar*” fue descrito por primer vez en *E. coli*, aunque posteriormente se ha identificado en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia* y especies de *Enterobacter*. Muchas de estas especies comúnmente halladas en el ambiente extra-hospitalario y la mayoría de ellas patógenas para el hombre y animales (*Randall LP. & Woodward MJ., 2002; Barbosa T. & Levy SB., 2000; Goldman J. y cols. 1996*).

El operón *mar* es esencial para la adquisición del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos (fenotipo Mar) en muchas especies de bacterias.

Se observó que cuando se hacía crecer a cepas de *E. coli* en medios de cultivo conteniendo concentraciones subinhibitorias de cloranfenicol o tetraciclina, podían desarrollar cepas mutantes que expresaban bajos niveles de resistencia tanto a los agentes selectivos, como a rifampicina, ácido nalidíxico, puromicina, ampicilina, cefalotina, penicilina G y a minociclina. A estas mutantes con frecuencia de mutación entre  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  se las denominó “Mar” por la múltiple resistencia que mostraban a diferentes antimicrobianos. Sin embargo cuando a estas mutantes “Mar” se las sometía a continuos pases en la misma o mayor concentración del antimicrobiano se observaba que incrementaban sus niveles de resistencia a los antimicrobianos citados (*Randall LP. & Woodward MJ., 2002, Goldman J. y cols., 1996; Alekshun M. & Levy SB., 1997*).

El operón *mar* está involucrado en la respuesta adaptativa de las bacterias frente a antimicrobianos, así como a diferentes situaciones posibles en el medio ambiente, como los cambios de temperatura, pues su expresión es mayor a 30°C que a 37°C (*Alekshun M. & Levy SB. 1997*).

La sobre-expresión del operón *mar* (inducido en respuesta a estímulos ambientales o por mutaciones naturales debido a la presión selectiva ejercida por antimicrobianos) conduce a que las cepas expresen el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos.

Diferentes estudios llevados a cabo hasta la fecha demuestran que este operón está implicado en la resistencia a diversos antimicrobianos no relacionados estructuralmente como cloranfenicol, cefalosporinas, tetraciclina, ácido nalidíxico, fluorquinolonas, penicilinas, puromicina, rifampicina, así como en la resistencia a desinfectantes, a solventes orgánicos como el ciclohexano, y a compuestos derivados del estrés oxidativo.

Aunque las cepas con este fenotipo expresan bajos niveles de resistencia a diversos antimicrobianos no relacionados estructuralmente, conservan el potencial de mutar espontáneamente para adquirir mayores niveles de resistencia.

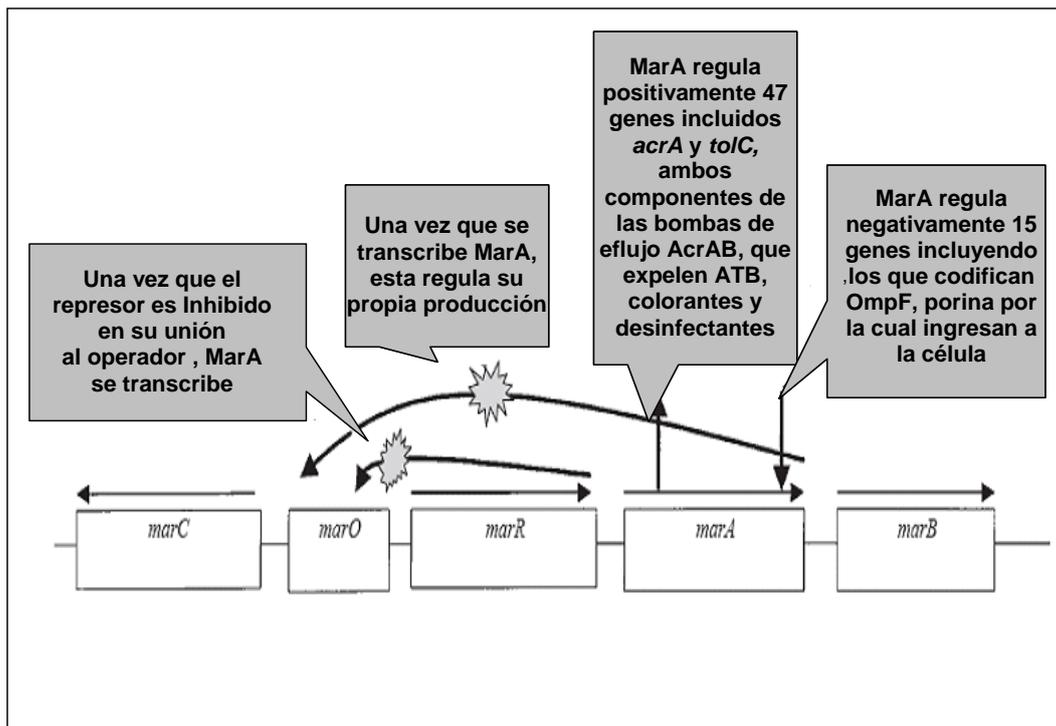
Por lo que la activación del operón *mar* puede ser el primer paso dentro de una serie de procesos que llevan a que a que cepas las cepas adquieran niveles clínicamente significantes de resistencia a quinolonas y a otros antimicrobianos muy usados en la terapéutica médica y que podrían suponer el fracaso del tratamiento antibiótico (*Alekshun M. & Levy SB., 1997; Goldman J., 1996; Cohen S. & Levy SB., 1993*).

## 6.2 Estructura y función del operón *mar*

El locus *mar* (1.636 Kbp) localizado a 34 min. en el mapa genómico de *E. coli*, consiste en dos unidades transcripcionales divergentemente posicionadas que flanquean al operador *marO*, denominadas *marC* y *marRAB*, reguladas por diferentes promotores (P<sub>marI</sub> y P<sub>marII</sub> respectivamente).

La unidad *marC* codifica una proteína integral de membrana interna de 221 aminoácidos MarC cuya función se desconoce, aunque parece contribuir al fenotipo Mar (Múltiple Antibiótica Resistencia) en algunas cepas (*Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Goldman J. y cols., 1996; Alekshun M. & Levy SB. 1997*).

La otra unidad transcripcional *marRAB*, codifica dos proteínas regulatorias, el represor MarR de 144 aminoácidos, al activador transcripcional MarA de 127 aminoácidos, y a una pequeña proteína MarB de 72 aminoácidos de función desconocida, aunque se observó que cuando se expresa en conjunto con MarA, los niveles de resistencia a antimicrobianos aumentan levemente (*Randall LP. & Woodward MJ., 2002; Goldman J. y cols., 1996; Balagué C. & Vescovi EG., 2001*).



**Fig. 1:** Representación esquemática del locus *mar* en *E. coli*. (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002).

## 6.3 MarR

### 6.3.1- Familia MarR/SlyA

La proteína MarR es un miembro de una nueva familia de proteínas regulatorias (familia MarR) que han sido identificadas en una gran variedad de bacterias patógenas.

La familia MarR/SlyA de reguladores transcripcionales agrupa proteínas procarióticas de unión al ADN que controlan una variedad de funciones biológicas. Como su nombre lo indica, Mar (Múltiple resistencia a antimicrobianos), algunas de las proteínas de esta familia regulan la expresión de genes que tienen que ver con la resistencia a múltiples antimicrobianos, solventes orgánicos, desinfectantes, detergentes y a agentes del estrés oxidativo como MarR y EmrR en *E. coli* o MexR en *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo otras proteínas de esta familia están implicadas en la adhesión a tejidos específicos (PapX en *E. coli*), en la expresión de hemolisina (SlyA en *E. coli* y *S. typhimurium*), en la producción de proteasas (Hpr en *B. subtilis*) y en la esporulación (Hpr en *B. subtilis*) (Aleksnum M. y cols. 2000; Wilkinson SP. & Grove A., 2004).

Las proteínas dentro de la familia MarR además de poseer funciones similares, tienen la característica de interactuar con compuestos fenólicos por lo

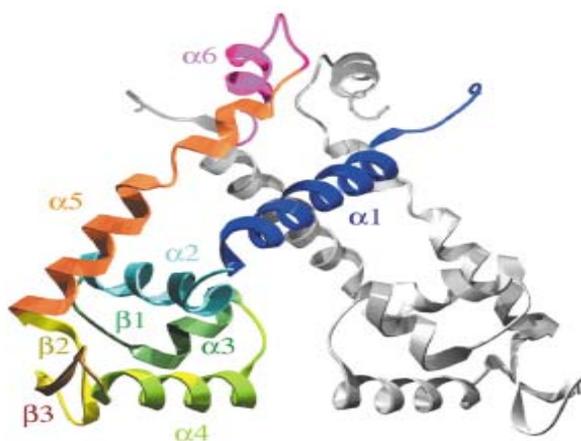
que la actividad de algunos de estos represores también es antagonizada por el salicilato.

Como ejemplos de homólogos de MarR podemos mencionar a Ec17kd y MprA (EmrR) que cuando se expresan en plásmidos reprimen la expresión de *marRAB* en *E. coli* (Alekhshun M. & Levy SB. 1997; Alekhshun M. y cols. 2000), así como también *PecS* y *HpcR* que también son proteínas con funciones represoras (Asako H. y cols., 1997).

### 6.3.2- Características estructurales de la proteína MarR

La proteína prototipo de esta familia es MarR de *E. coli*. Esta proteína homodimérica interacciona con el ADN adquiriendo una estructura hélice-giro-hélice alado (HTH alado). Esta proteína posee 6 hélices  $\alpha$  y 3 cadenas  $\beta$ . (Godsey, Michael H., 2002).

Su estructura secundaria puede describirse de la siguiente manera:  $\alpha 1-\alpha 2-\beta 1-\alpha 3-\alpha 4-\beta 2$ -giro- $\beta 3-\alpha 5-\alpha 6$  donde  $\alpha$  denota hélices alfa y  $\beta$  cadenas betas (Fig. 2). El dominio  $\beta 1-\alpha 3-\alpha 4-\beta 2$ -giro- $\beta 3$  de esta proteína es el que interaccionaría con el ADN, mientras que las cadenas  $\alpha 1-\alpha 2$  y  $\alpha 5-\alpha 6$  son los dominios de dimerización. (Bordelon Tee y cols., 2006; Alekhshun MN. y cols., 2001; Gajiwala KS. & Burley SK., 2000).

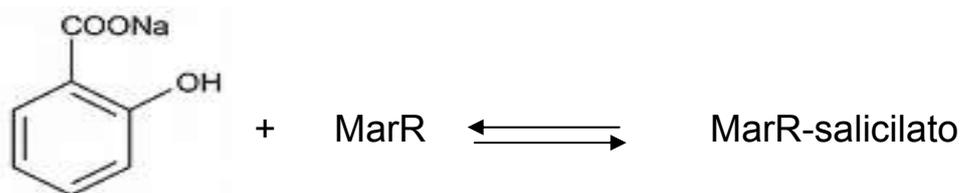


**Fig. 2:** Estructura del Homo dímero MarR (Alekhshun MN. y cols., 2001).

### 6.3.3- MarR y la regulación del operón *mar*

Esta proteína regula negativamente la expresión del operón *marRAB*, además de regular su propia expresión. MarR se une como homodímero a 2 sitios de la región promotor/operador (*marO*) de dicho operón. Éstos son denominados sitio I y sitio II. El sitio I está posicionado entre las regiones -35 y -10 del promotor del operón *marRAB* que es un sitio ideal para prevenir el acceso de la ARN polimerasa a las secuencias necesarias para la transcripción y el sitio II incluiría el sitio de unión del ribosoma (Alekhun M. y cols. 2000; Wilkinson S.P. & Grove A., 2004). Cuando MarR se une *marO*, se reprime la expresión del locus *marRAB*. Esta unión puede ser inhibida por medio de mutaciones en *marR* o en *marO*, o exponiendo a la bacteria a diferentes compuestos que inhiban la unión de MarR al operador, entre estos compuestos se encuentra el salicilato como principal inductor del locus *mar*. (Randall LP. & Woodward MJ., 2002).

El salicilato es un compuesto fenólico de peso molecular: 160.10, que se une reversiblemente al represor MarR e inhibe su interacción con el ADN (Fig. 3), por lo que al no ejercer su función represora, se puede transcribir el operón *marRAB*.



**Fig. 3:** Representación esquemática de la interacción reversible entre el salicilato de sodio y la proteína MarR

Pero además del salicilato se han descrito otros posibles inductores del operón *marRAB*, como ser: **cloranfenicol** (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekhun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **tetraciclina** (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekhun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **acetaminofen** (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekhun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **benzoato de sodio** (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Tavio M., J. Vila y cols., 2004; Alekhun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **2,4 dinitrofenol** (desacoplante) (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekhun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **cinamato** (precursor del

salicilato en las plantas) (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekshun M. & Levy SB., 1997), **carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona** (desacoplante) (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002, Alekshun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **menadiona** (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekshun M. & Levy SB., 1997, Sulavik M. y cols., 1997), **paraquat** y **plumbagin** (agentes del estrés oxidativo) (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002; Alekshun M. & Levy SB., 1997; Sulavik M. y cols., 1997), **diazepam** (benzodiazepina) (Tavio MM. y cols., 2004), **ácido clofibríco** (hipolipémiante), **ácido etacrínico** (diurético) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (herbicida) (Balagué C. & Vescovi E.G, 2001) y **acetilsalicilato** (analgésico) (Wilkinson S.P. & Grove A., 2004).

El inductor natural de este operón no se conoce, aunque se postula sea un derivado de las naftoquinonas presentes en las plantas, que tienen actividad antibacteriana (Randall LP. & MJ. Woodward, 2002).

Entonces una vez que la represión del operón *marRAB* es inhibida, se induce el operón que como resultado lleva a la hiperproducción de la proteína MarA.

## 6.4 MarA

### 6.4.1- Familia XylS/AraC

Podemos decir que las proteínas que pertenecen a esta familia, excepto por algunas excepciones, funcionan como activadores transcripcionales.

Las proteínas de esta familia activan diversos genes, algunos de los cuales están involucrados en la resistencia a antimicrobianos u agentes del estrés oxidativo, otros están relacionados con el metabolismo de compuestos carbonados o en la patogénesis microbiana (Alekshun M. & Levy SB., 1997, Martin R. & Rosner JL., 2001).

En términos generales podemos decir que estas proteínas poseen dos dominios, uno “no conservado” que tiene que ver con el reconocimiento de señales u compuestos efectores y en la dimerización, y el otro dominio “conservado” que contiene los residuos que forman los motivos hélice-giro-hélice (*HTH: Motivo estructural compuesto de dos hélices  $\alpha$  separadas por un giro  $\beta$  corto característico de diversas proteínas con función reguladora que se unen al ADN*) para interactuar con el ADN (Tobes Raquel y Ramos Juan, 2002). La mayoría de las proteínas de esta familia requieren la presencia de dos motivos hélice-giro-hélice (HTH) para interactuar con el ADN y así ejercer su acción regulatoria,

como generalmente poseen un motivo hélice-giro-hélice por monómero es necesario que muchas de ellas formen dímeros para ejercer su acción regulatoria (*Gallegos M. y cols., 1997*) en cambio otras proteínas de esta familia son activas como monómeros (*Martin R. & Rosner JL., 2001*).

En la tabla 1 están resumidos los miembros de la familia XylS/AraC presentes en *E. coli*, así como las funciones que regulan cada una de estas proteínas.

#### **6.4.2- Características estructurales de MarA**

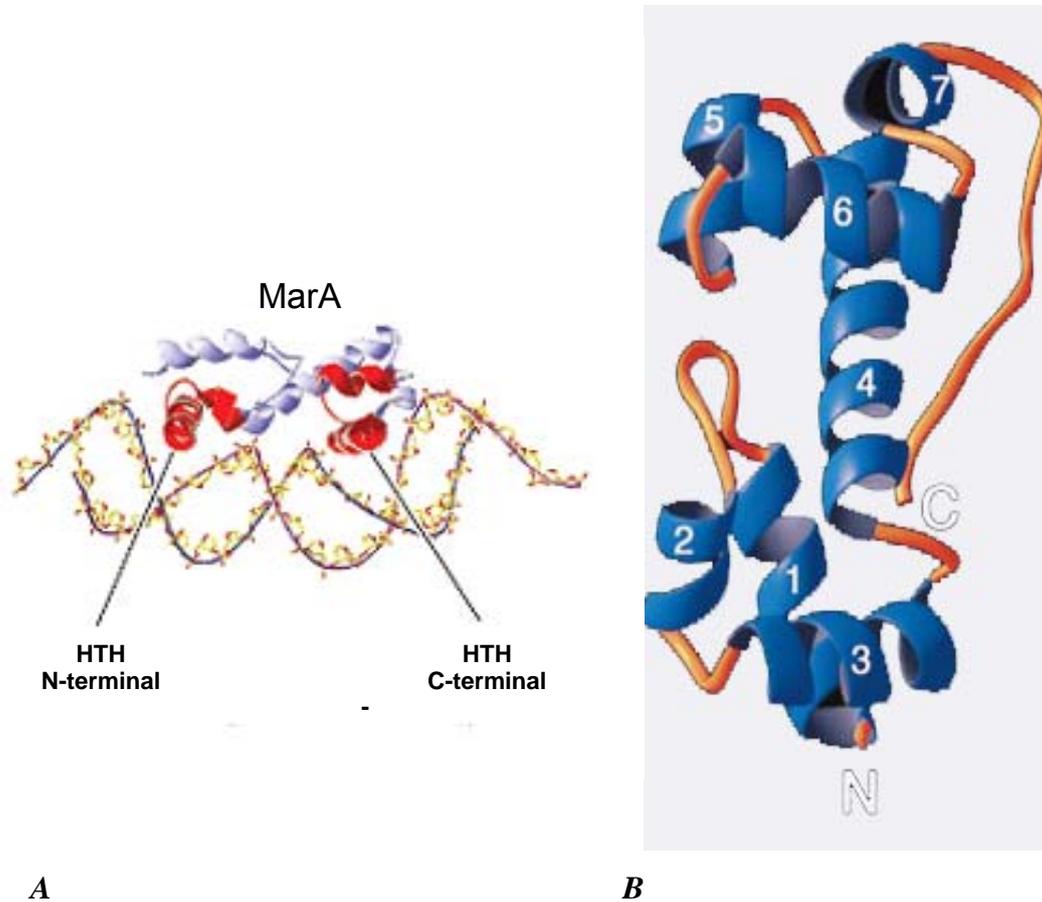
La proteína MarA (15,4 kDa.) al igual que SoxS, RamA y OrfR (TetD) pertenecen a esta familia XylS/AraC de activadores transcripcionales y son las proteínas más pequeñas dentro de esta familia, poseen entre 106 y 166 aminoácidos (*Alekshun M. & Levy SB., 1997; Gallegos M. y cols., 1997*).

Además de su tamaño MarA posee otras características que la diferencian de las demás proteínas de la familia XylS/AraC. MarA no posee el dominio de dimerización, es por ello que interacciona con el ADN como monómero, esta proteína posee los dos dominios hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA separados por una larga cadena  $\alpha$ -hélice (hélice  $\alpha_4$ ) en la misma cadena polipeptídica, y utiliza a ambos dominios en la interacción con el ADN. MarA está compuesta por siete  $\alpha$ -hélices (*Godsey MH. y cols., 2002*). (Fig. 4 B), los subdominios amino y carboxilo de esta proteína son los que contienen los motivos hélice-giro-hélice (HTH) que interaccionan con el ADN (*Rhee S. y cols., 1998*) (Fig. 4 A).

#### **6.4.3- MarA y la regulación del operón *mar***

En *E. coli* MarA controla la expresión de más de 60 genes cromosómicos. El 76% de ellos muestran incrementada su expresión por acción de MarA, mientras que el 24% restante la disminuyen (tabla 3). Sin embargo sólo los genes implicados en el menor influjo o mayor eflujo de sustancias son considerados importantes en el fenotipo Mar pues son los involucrados en aumento de la resistencia a antimicrobianos, desinfectantes y solventes orgánicos.

En la Tabla 2 se clasifican funcionalmente algunos de los genes afectados por MarA y en la Fig. 5 se observa la distribución y localización cromosómica de dichos genes (*Barbosa T. & Levy SB., 2000*).



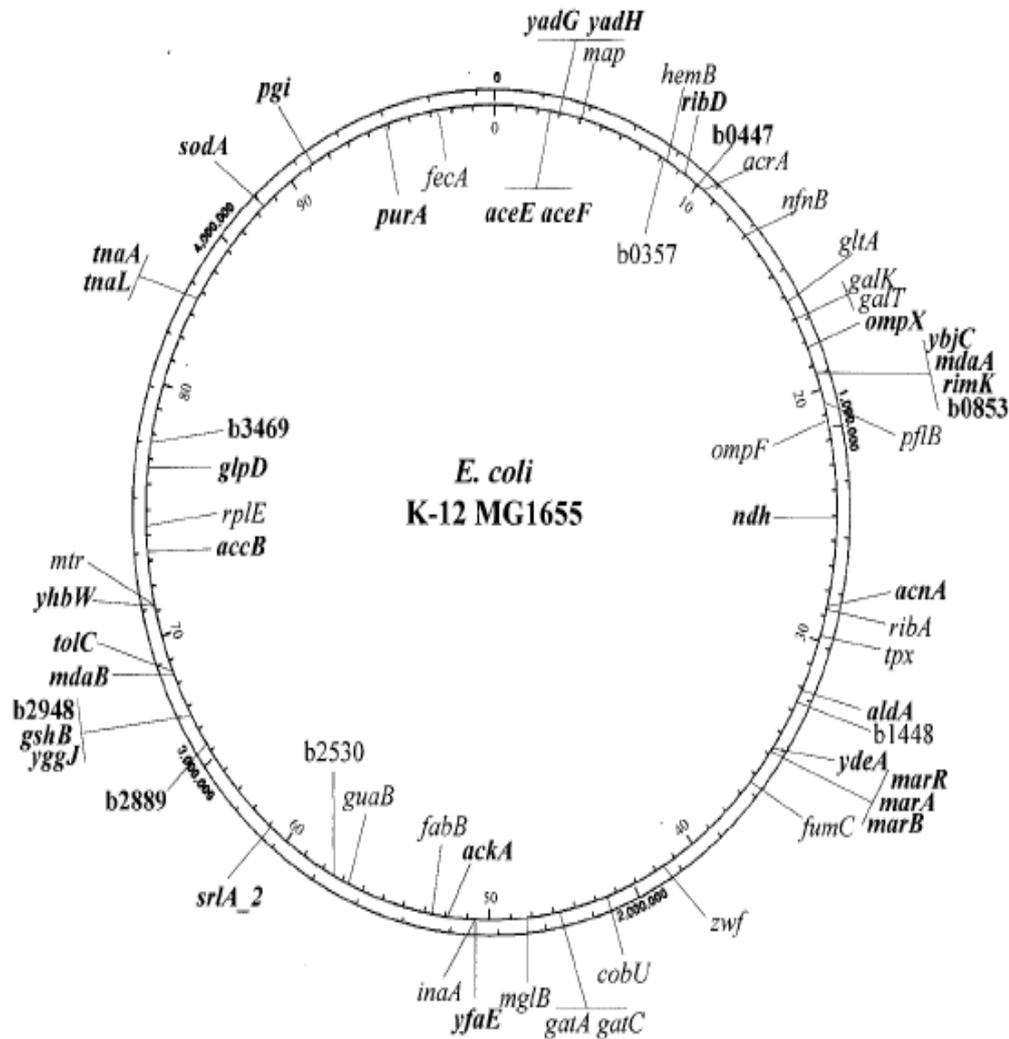
**Fig. 4:** *Proteína MarA (A). Las secciones en rojo muestran los sitios de interacción de los HTH con el ADN (Alekhun M. & Levy SB., 2004). (B) Muestra las 7  $\alpha$ -hélice y su orientación en la molécula (Rhee S. y cols., 1998).*

**Tabla 1:** Miembros de la familia AraC/XylS presentes en *E. coli* (Gallegos M. y cols., 1997)

FUNCIÓN	PROTEÍNAS FAMILIA AraC/ XylS
<b>METABOLISMO DE COMPUESTOS CARBONADOS</b>	
<b>Azúcares</b> Arabinosa Celobiosa Melibiosa Ramnosa Xilosa	AraC CelD MelR RhaR XylR
<b>Aminoácidos</b> Arginina	Adiy
<b>Alcoholes</b> Ácido Parahidroxifenilacético	HpaA
<b>PATOGÉNESIS</b>	
Fimbrias	AfrR AggR CfaD CsvR FapR PerA Rns
Producción de ureasa	UreR
<b>RESPUESTA AL ESTRÉS</b>	
Agentes alquilantes	Ada
Estrés oxidativo	SoxS
Tolerancia a antimicrobianos, solventes orgánicos, y metales pesados	MarA Rob
Cambios de temperatura	EnvY
Transición de fase exponencial a fase estacionaria de crecimiento	Appy
<b>FUNCIÓN DESCONOCIDA</b>	
	Yfeg Yhiw Yhix Yidl Yijo Ymcr

**Tabla 2:** Clasificación funcional de los genes afectados por *MarA* (Barbosa T. & Levy SB., 2000)

FUNCIÓN FISIOLÓGICA	GENES regulados por <i>MarA</i>
Metabolismo energético	<i>aceE, aceF, ackA, acnA, aldA, fumC, glpD, gltA, mdaA, ndh, pflB, pgi, zwf</i>
Biosíntesis de cofactores	<i>accB, oba, hemB, gshB, ribA, ribD</i>
Catabolismo de compuestos de carbono	<i>galK, galT</i>
Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	<i>tnaA, tnaL</i>
Biosíntesis de ácidos grasos	<i>fabB</i>
Biosíntesis de nucleótidos	<i>guaB, purA</i>
Adaptación	<i>inaA</i>
Proteínas de transporte	<i>gatA, gatA, fecA, mglB, mtr, srlA2, tolC, yadG, yadH, ydeA, b3469</i>
Protección/ adaptación	<i>acrA, marA, marB, marR, nfnB, sodA, tpx</i>
Envoltura celular	<i>ompF, ompX</i>
Constituyentes de ribosomales	<i>rimK, rplE</i>
Síntesis y modificación de macromoléculas	<i>map</i>
No clasificados	<i>b0357, b0447, bo853, mdaB, yhbW</i>
Que codifican proteínas de función desconocida	<i>b1448, b2530, b2889, b2948, ybjC, yfaE, yggJ</i>



**Fig. 5:** Distribución cromosómica y localización de los genes afectados por MarA. El círculo interno representa el cromosoma de *E. coli* K12 dividido en intervalos de 1 min., mientras que el círculo externo está dividido en intervalos de 100.000 residuos nucleotídicos (Barbosa T. & Levy SB., 2000).

**Tabla 3:** Genes de *E. coli*, cuya expresión esta regulada por *MarA* (Barbosa T. & Levy SB., 2000).

<i>Genes regulados positivamente por MarA</i>	<i>Genes regulados negativamente por MarA</i>
<i>acnA</i>	<i>accB</i>
<i>acrA</i>	<i>aceE</i>
<i>aldA</i>	<i>aceF</i>
<i>b0447</i>	<i>ackA</i>
<i>b0853</i>	<i>b0357</i>
<i>b1448</i>	<i>b2530</i>
<i>b2889</i>	<i>b3469</i>
<i>b2948</i>	<i>fabB</i>
<i>cobU</i>	<i>fecA</i>
<i>fumC</i>	<i>glpD</i>
<i>galK</i>	<i>guaB</i>
<i>galT</i>	<i>ndh</i>
<i>gatA</i>	<i>ompF</i>
<i>gatC</i>	<i>purA</i>
<i>gltA</i>	<i>rplE</i>
<i>gshB</i>	
<i>hemB</i>	
<i>inaA</i>	
<i>map</i>	
<i>marA</i>	
<i>marB</i>	
<i>marR</i>	
<i>mdaA</i>	
<i>mdaB</i>	
<i>mglB</i>	
<i>mtr</i>	
<i>nfnB</i>	
<i>ompX</i>	
<i>pflB</i>	
<i>pgi</i>	
<i>ribA</i>	
<i>ribD</i>	
<i>rimK</i>	
<i>sodA</i>	
<i>srlA2</i>	
<i>tnaA</i>	
<i>tnaL</i>	
<i>tolC</i>	
<i>tpx</i>	
<i>yadG</i>	
<i>yadH</i>	
<i>ybjC</i>	
<i>ydeA</i>	
<i>yfaE</i>	
<i>yggJ</i>	
<i>yhbW</i>	
<i>zwf</i>	

La hiperexpresión de MarA resulta en la múltiple resistencia a antimicrobianos, colorantes, desinfectantes y en la tolerancia a solventes orgánicos mediante los siguientes mecanismos *MarA* (Barbosa T. & Levy SB., 2000; Tavío MM. y cols., 2001):

- Alteración en la permeabilidad de la célula: por disminución de la síntesis de porina OmpF en la membrana externa.
- Inducción de sistemas de eflujo de antimicrobianos: al incrementar la expresión del sistema AcrAB /TolC entre otros.

### **Alteración de la permeabilidad bacteriana:**

- Regulación de la síntesis de porinas de la membrana externa (Omp) :

En las bacterias gram negativas las porinas constituyen el canal hidrofílico de incorporación de nutrientes. Estos canales no específicos de difusión acuosa son aprovechados en la terapéutica para introducir antimicrobianos en la célula bacteriana permitiendo que ejerzan su acción sobre el sitio blanco intracelular. Así antimicrobianos relativamente hidrofílicos pueden atravesar con facilidad la membrana externa bacteriana. Las mutaciones que reducen la expresión de porinas pueden generar resistencia a diversas drogas en microorganismos gram negativos. En *E. coli* la porina F (OmpF) constituye el canal mayor e interviene de manera predominante en la penetración de la mayoría de los Antimicrobianos. Las porinas también sirven como receptores de ciertos bacteriófagos. Las porinas C y F se ensamblan como trímeros en la membrana externa y ambas son similares en estructura y función. Sin embargo una diferencia clave entre ellas es el diámetro del poro que generan, mientras la OmpF posee 1,2 nm, el de OmpC es de 1,1 nm. Esta pequeña diferencia resulta en una tasa de difusión decenas de veces más rápida a través de OmpF que a través de OmpC (Nikaido H., 1996).

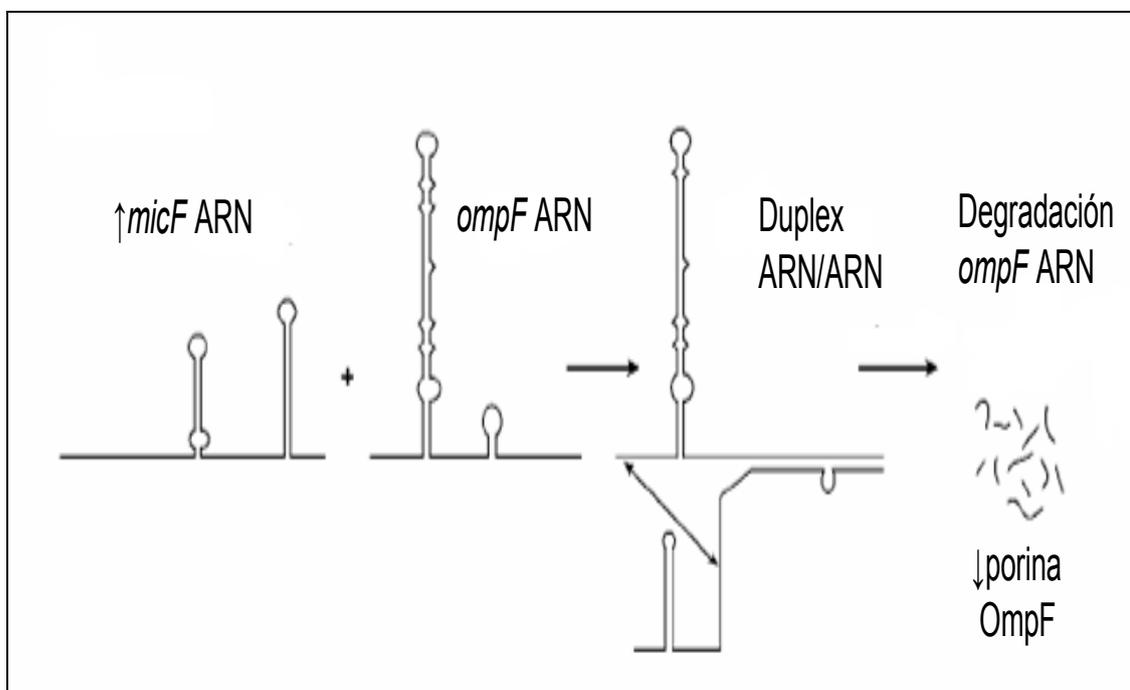
Como mencionamos en capítulos anteriores, los niveles de expresión de las porinas son influenciados por una variedad de condiciones ambientales como cambios de pH, osmolaridad, temperatura y presencia de ciertas toxinas. Un segundo tipo de regulación de porinas se produce en respuesta a cambios de temperatura. Este mecanismo involucra una regulación traduccional a través de un ARN antisentido con el de OmpF, denominado *micF* (*mRNA interfering complementary* o *ARN mensajero complementario interferente*).

*micF* está involucrado en la regulación postranscripcional negativa de la porina F. El gen que lo codifica está localizado inmediatamente arriba de *ompC* y consiste en secuencias complementarias a la secuencia de iniciación de la traducción del ARNm de *ompF*.

El ARN de 93 nucleótidos forma una unión estable con el sitio de unión a ribosomas del ARNm *ompF*, un duplex ARN/ARN, inhibiendo la traducción y la degradación del ARN mensajero. La transcripción de *micF* es estimulada 10 veces a temperaturas de 37° o algo mayores (Andersen C. y cols., 1989).

El activador transcripcional MarA, regula positivamente la expresión de *micF*, que como se describe anteriormente desestabiliza el mRNA *ompF* y como consecuencia disminuyen los niveles de la porina en la membrana externa. Ésto se correlaciona con la resistencia manifestada por dichos mutantes Mar (múltiple resistencia a antimicrobianos) a diversos antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, y fluoroquinolonas hidrofílicas que utilizan esta vía de acceso a la célula (Cohen S. & Levy SB., 1988).

Sin embargo la reducción de la OmpF no está involucrada en el tolerancia a solventes orgánicos como el ciclohexano (Randall LP. & Woodward MJ., 2002). Además se observó que MarA no afecta los niveles de la porina OmpC.



**Fig. 6:** Diagrama esquemático de la regulación de la porina OmpF por *micF* en cepas de *E. coli* salvajes (Modificado de Nicholas Deliras & Steven Forst, 2001).

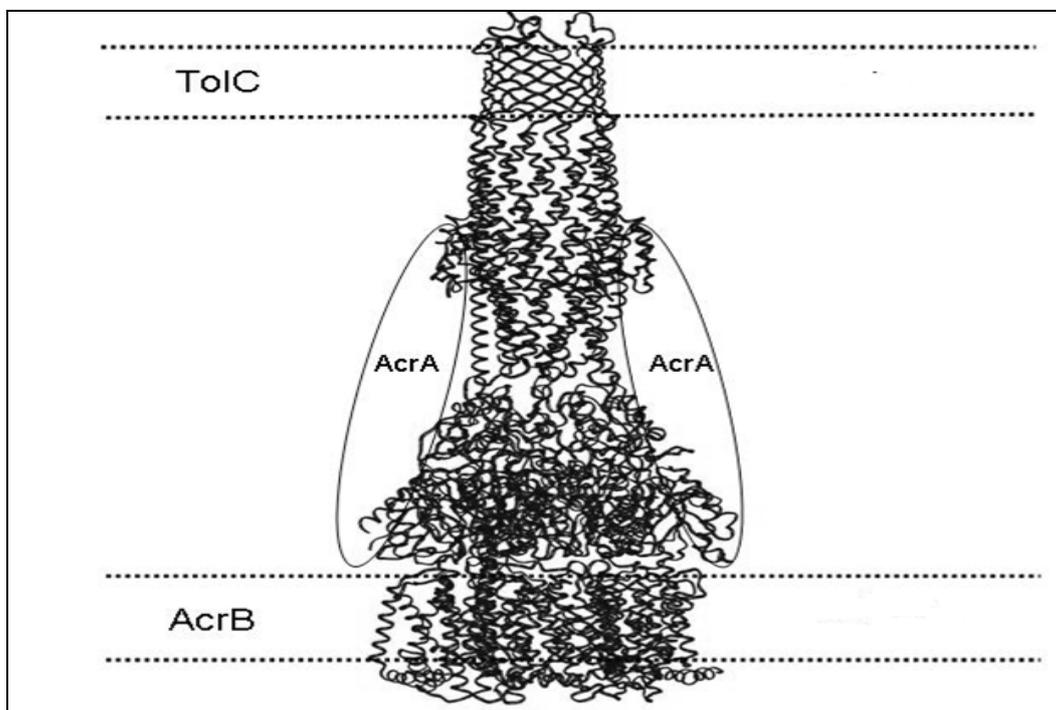
## Regulación del eflujo de antimicrobianos

- **Inducción del sistema AcrAB-TolC**

En *E. coli* la sobre-expresión de MarA o de sus homólogos SoxS o Rob produce un incremento en la expresión de diferentes sistemas de eflujo y de estos los que más están implicados en la múltiple resistencia a antimicrobianos en la mayoría de los bacilos gram negativos son los que pertenecen a la familia RND como AcrAB-TolC.

Este sistema además de expeler antimicrobianos al exterior de la célula, expulsa diferentes compuestos que pueden resultar nocivos para ellas, por lo que juegan un papel primordial en incremento de tolerancia a solventes orgánicos, aceite de pino, antisépticos y desinfectantes como triclosán y clorhexidina (Levy SB., 2002).

En términos generales podemos decir que estos sistemas de eflujo están compuestos por tres componentes, formando un sistema tripartito, en el que están involucradas una proteína integral de membrana (AcrB), una proteína de fusión (AcrA), y una porina de membrana externa (TolC) (Sulavik M. y cols., 2001). Este sistema se esquematiza en la Fig. 7, pero se explicará con más detalle en capítulo de sistemas de eflujo de múltiples drogas.



**Fig. 7:** Representación esquemática del Sistema de eflujo AcrAB/ TolC en *E. coli* (Levy SB., 2002).

## 6.5 MarB y MarC

Como se expresó anteriormente la transcripción del locus *marRAB*, lleva a la expresión de otras dos proteínas además de MarR y MarA, que son MarB y MarC.

Estudios hasta la fecha muestran que una sobre producción de la proteína MarB no afecta en la resistencia a antimicrobianos, sin embargo cuando se expresa en conjunto con MarA, los niveles de resistencia suelen aumentar ligeramente (*Goldman J. y cols., 1996*).

A pesar de que la función de MarC aún no ha sido elucidada, parece estar implicada en la protección del rápido efecto bactericida que ejercen las fluoroquinolonas. Se postula que MarC sola o en asociación a otras proteínas podría estar implicada en el influjo o eflujo de drogas (*Alekshun M. & Levy SB., 1997*).

### B. Operón *soxRS*

La *E. coli* es capaz de adaptarse a diferentes condiciones subletales de estrés poniendo en marcha la transcripción de una serie de operones o regulones para restablecer su homeostasis (*Michán C., 2002*).

El metabolismo aerobio genera radicales del oxígeno como subproductos como el radical superóxido ( $O_2^-$ ) pero además ciertos xenobióticos llamados compuestos cíclicos redox como el paraquat median la reducción del  $O_2$  a  $O_2^-$ . El operón *soxRS* protege a la célula bacteriana de estos compuestos cíclicos redox y de radicales de óxido nítrico libre como los generados por macrófagos (*Sulavik M. y cols., 1997*), aunque también está implicado en la resistencia a especies reactivas de nitrógeno (*Nakajima y cols., 1995*) y en la resistencia cromosómica de bajo nivel a antimicrobianos en cepas de *E. coli* y *Salmonella enterica* (*Koutsolioutsou A. y cols., 2005*).

SoxR es una proteína de 17 kDa que se expresa constitutivamente, mientras que los niveles de SoxS son regulados por SoxR. SoxR contiene un motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA en la zona N-terminal. Forma un homodímero en solución, cada monómero contiene un cluster o centro [2Fe-2S] (*Hidalgo y cols., 1995; Wu y cols., 1995*). Estos centros [2Fe-2S] son esenciales para la actividad transcripcional de SoxR dado que se oxidan o nitrosilan, conduciendo a cambios

conformacionales en el dímero que provocan la inducción del gen *soxS* (Koutsolioutsou A. y cols., 2005).

SoxS, es una proteína de 107 residuos, que actúa como monómero y ejerce su acción por alteración de su propia expresión. Al igual que MarA pertenece a la familia AraC/XylS y posee alta homología con esta en los dominios hélice-giro-hélice (HTH) (aproximadamente del 45%). Esta proteína se une como monómero a los promotores de genes con funciones conocidas como ser: *zwf* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que incrementa el poder reductor de la célula), *fur* (represor transcripcional de unión al hierro y así reduce la formación de HO<sup>o</sup>), *yggX* (proteína que protege al ADN del daño oxidativo mediado por hierro), *fpr* (NADPH ferredoxina oxidoreductasa), e incrementan también otros factores de defensa como *fumC* (fumarasa C), *nfo* (endonucleasa IV), *acnA* (aconitasa A), *sodA* (manganeso superóxido dismutasa) (Zheng M. y cols., 1999; Carmel-Harel & Storz, 2000; Pomposiello P. y cols., 2003); asimismo estimula la transcripción de genes vinculados en la resistencia a antimicrobianos y en la tolerancia a los solventes orgánicos como *micF* (ARN regulatorio antisentido a OmpF), *marRAB* (operón involucrado en la múltiple resistencia a antimicrobianos), *acrAB* (sistema de eflujo activo), *tolC* (porina) (Word T. y cols., 1999). SoxS puede activar la transcripción del operón *marRAB* independientemente de MarA (Jair K. y cols., 1995).

El mecanismo de regulación propuesto es el siguiente: bajo condiciones de estrés oxidativo, se oxida o nitrosila el sensor [2Fe-2S] SoxR que se expresa constitutivamente en la célula. La oxidación de este regulador también puede ser causada por compuestos químicos que generan radicales superóxido libre, como ser el paraquat (Word T. y cols., 1999). Así SoxR se convierte en un activador específico de la transcripción *soxS*. Como resultado aumenta la síntesis de novo de la proteína SoxS que activa la transcripción de genes cuyos productos actúan en la defensa frente al estrés oxidativo (removiendo las especies reactivas del oxígeno y reparando el daño causado por ellos) (Wu Jie & Weiss B, 1992; Griffith K. y cols., 2004) y los genes vinculados en la resistencia a antimicrobianos (Koutsolioutsou A. y cols., 2005). SoxS controla la expresión de 65 a 80 genes en *E. coli*, entre ellos se encuentran *micF* y *acrAB-tolC* que están vinculados a la resistencia a antimicrobianos. Entonces el incremento en la expresión de SoxS conduce a un incremento en la expresión de *micF* (ARNm antisentido con el ARNm de ompF) y

ésto lleva a una menor expresión de la porina F en la membrana externa y por ello a una menor permeabilidad celular, además induce un incremento en la expresión del sistema de eflujo AcrAB-TolC y con ello un mayor eflujo activo de antimicrobianos fuera de la célula (*Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Aono R. y cols., 1998*). Por lo que podemos concluir que la combinación de una menor permeabilidad de los antimicrobianos a la célula sumada a un mayor eflujo de los mismos conduce a la resistencia antimicrobiana mediada por el operón *soxRS* en estas cepas. En cepas de *E. coli*, la activación del operón *soxRS* por medio del paraquat incrementó de 2 a 4 veces la resistencia a antimicrobianos como ampicilina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, y tetraciclina (*Koutsolioutsou A. y cols., 2005*). Además se observó que la expresión de SoxS contribuye significativamente a la resistencia a quinolonas en aislamientos de *S. enterica* y en cepas de *E. coli*. En diferentes trabajos fue observado que el un alto porcentaje de las cepas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas y a solventes orgánicos también exhibían una elevada expresión constitutiva de *soxS* (*Webber M. & Piddock L., 2001; Oethinger M. y cols., 1998*).

En la tolerancia a los solventes orgánicos debemos tener presente que SoxS además de incrementar la expresión de AcrAB, puede activar la de TolC que es el componente de membrana externa indispensable en la maquinaria requerida para la tolerancia a los solventes orgánicos como el ciclohexano en cepas de *E. coli* (*Aono R. y cols., 1998*).

Por lo que la activación del sistema *soxRS* en *E. coli*, al igual que *marRAB*, le provee a la bacteria de los mecanismos para defenderse contra el estrés oxidativo, antimicrobianos, compuestos fenólicos, solventes orgánicos y a metales pesados, todos ellos potencialmente letales para la misma (*Harushi N. y cols., 1995; Griffith K. y cols., 2004*).

### **C. Proteínas regulatorias homólogas de MarA y SoxS**

Interesantemente la sobre producción de otra proteína miembro de la familia AraC/XylS, Rob (33 kDa), también está involucrada en el aumento de resistencia a antimicrobianos, agentes bactericidas, en la tolerancia a solventes orgánicos y en la resistencia a metales pesados.

Rob, se expresa constitutivamente en *E. coli* y posee homología funcional con MarA y SoxS, pero difiere de estas en estructura al ser una proteína un tanto mas

larga, posee 289 residuos aminoacídicos, con un dominio C-terminal separado, que podría estar implicado en la unión a efectores de bajo peso molecular, como ser sales biliares y ácidos grasos libres. Estos efectores son abundantes en el tracto intestinal, por lo que aparentemente podría ayudar a la supervivencia de *E. coli* en el hábitat natural por hacer a este microorganismo más resistente a inhibidores lipofílicos, incluyendo posiblemente a las sales biliares, aunque hasta la fecha su función biológica no está del todo clara.

El extremo N-terminal de Rob posee alta homología con MarA y SoxS, por lo que es de esperar que esta proteína reconozca las mismas secuencias dentro de los genes blancos, es por ello que diferentes evidencias proponen que Rob, cuando se sobre-expresa actúa como otro inductor de la transcripción de los operones *marRAB* y *soxRS*, asimismo se observó que esta proteína incrementa también la transcripción del gen *micF* (Lee Eun-Hee y cols., 1996) y del locus *acrAB-tolC* (Jair K. y cols., 1996; Ariza R. y cols., 1995).

Con diferentes estudios realizados se comprobó que la hiperexpresión de Rob puede alterar la expresión de múltiples genes involucrados en la resistencia a antimicrobianos, en la adaptación a medios ácidos, en el metabolismo del carbono, en la síntesis de la pared celular y en el transporte. Afecta entre otros a la expresión de los genes: *oriC* (origen de replicación), *micF* (ARN antisentido con el ARNm de OmpF), *nfo* (endonucleasa), *fumC* (fumarasa C), *inaA* (proteína inducible en medio ácido débil), *sodA* (superóxido dismutasa), *fpr* (NADPH-ferredoxina oxidorreductasa) del cromosoma de *E. coli* (Jair K. y cols., 1995; Jair K. y cols., 1996, Bennik M. y cols., 2000), así como también puede regular otros genes como *mdlA* (codifica una proteína de los sistemas de eflujo ATP dependientes), *yfhD* (codifica una proteína involucrada en el transporte periplásmico), *ybaO* (codifica una proteína de 181 aminoácidos que posee una cierta homología con Lrp que es un regulador de varios operones) y *aslB* (codifica una proteína que regula a *aslA*, gene que codifica una arilsulfatasa) (Bennik M. y cols., 2000), y a diferencia de SoxS aparentemente no estimula a *zwf* (Matin R. y cols., 2000; Jair K. y cols., 1996).

Tampoco se conocen con certeza los compuestos que incrementan la expresión de Rob, se hicieron ensayos midiendo la actividad Betagalactosidasa con diversos genes implicados como *inaA* fusionados a LacZ y se determinó que ante compuestos como el 2,2' y el 4,4' dipirydyl se estimula la actividad de 13 a 19

veces, también se observó que estos compuestos no producen incrementos en la actividad en cepas mutantes que pierden de 30 a 166 aminoácidos del extremo C-terminal de Rob, sugiriendo que la regulación es post-transduccional y que el dominio C-terminal es necesario para que estos compuestos ejerzan su acción aparentemente directa sobre Rob (*Rosner JL., y cols., 2002* , *Martin Robert & Rosner JL., 2002*).

Sin embargo no se sabe cual es el mecanismo por el cual esta proteína ejerce su acción, en los inicios diversos autores postularon que era necesaria la unión de los efectores a la proteína reguladora y que ésto induciría un cambio conformacional en la proteína Rob ya existente, mientras que actualmente se estableció que sería por medio de un incremento en la transcripción del gen *rob* (*Rosenberg E. y cols., 2003*).

A pesar de que la expresión de Rob es constitutiva y hay aproximadamente de 5000 a 10.000 moléculas por célula, los niveles basales de la misma no estimulan la transcripción de los operones *soxRS* y *marRAB* (*Martin R. y cols., 2002*; *Rosner JL. y cols., 2002*), pero la cantidad de moléculas de Rob existentes en la célula alcanzan para saturar a los promotores de dichos operones, ello sumado a que la interacción con el ADN es mas fuerte que la de MarA y SoxS, hace plantearse el interrogante de ¿Cómo hacen estos reguladores para ejercer su acción si sus sitios están ocupados por Rob? Lo que actualmente se descubrió es que la proteína SoxS cuando se hiperexpresa regula negativamente la expresión del gen *rob* y así puede unirse a los promotores correspondientes (*Michán C. y cols., 2002*), más recientemente se determinó que MarA también ejerce el mismo efecto (*Schneiders T & Levy SB., 2006*).

Por lo tanto, las proteínas MarA, SoxS y Rob activan la transcripción de múltiples genes dentro de los que llamamos operón *mar/sox/rob* en *E. coli*, produciendo una regulación negativa en la expresión de la porina OmpF a través de *micF* y por ende una disminución en la permeabilidad de la membrana externa a los antimicrobianos como por ejemplo a los  $\beta$ -lactámicos, pero el incremento en la resistencia a los antimicrobianos se debe principalmente a la inducción de uno o más sistemas de eflujo, principalmente AcrAB-TolC. Además se postula que posiblemente por medio de estos reguladores se podría proteger a la célula del estrés oxidativo sintetizando proteínas más resistentes al estrés como FumC o

ayudando a incrementar los niveles de energía celular por ejemplo por medio de Zwf (*Martin R. y cols., 2000*).

En definitiva se puede concluir que estas tres proteínas regulatorias activan independientemente un grupo común de promotores que como resultado producen incrementos en la resistencia a diversos antimicrobianos, como a agentes del estrés oxidativo y a una mayor tolerancia a los solventes orgánicos (*Martin R. y cols., 1999*).

Cabe mencionar que también existe una proteína versátil de unión al ADN, denominada Fis, que actuaría como un activador transcripcional accesorio del operón *mar*, pues estimula su transcripción, cuando están unidos los activadores MarA, SoxS o Rob a los respectivos promotores (*Paulsen I. y cols., 1996*).

# 7

## SISTEMAS DE EFLUJO DE MÚLTIPLES DROGAS EN *Escherichia coli*

### 7.1 Introducción

### 7.2 Clasificación de los transportadores de múltiples drogas (MDR) en procariotas

### 7.3 Transportadores (MDR) en *E. coli*

### 7.4 Características de los principales sistemas de eflujo en cepas de *E. coli*

### 7.5 Efectos de la sobre-expresión de los sistemas de eflujo en la susceptibilidad a diversos antimicrobianos en cepas de *E. coli*

## 7.1 Introducción

Los microorganismos han desarrollado diferentes formas para resistir y evadir los efectos tóxicos de los antimicrobianos y de otras drogas (*Putman M. y cols., 2000*). Una de las maneras por las que las bacterias hacen frente a estos agentes es mediante la expresión de sistemas activos de eflujo, mediante las cuales reducen la concentración intracelular de las drogas a niveles que no les son tóxicos (*Putman M. y cols., 2000*). Estos sistemas activos de eflujo están compuestos por proteínas integrales de membrana o asociadas a la misma, que se encargan del bombeo unidireccional de drogas citotóxicas, xenobióticos y otros compuestos desde el citoplasma bacteriano al medio exterior (*Levy SB., 2002*).

Las bacterias gram-negativas se caracterizan por ser intrínsecamente más resistentes a los antimicrobianos que las gram-positivas, antiguamente se pensaba que esta elevada resistencia era sólo debido una menor permeabilidad debida a la presencia de la membrana externa que actuaba como barrera física retrasando los mecanismos de difusión. Sin embargo, este mecanismo por sí solo no sería capaz de impedir la entrada de los antimicrobianos. Fue entonces cuando a finales de la década de los 80 se caracterizaron los primeros sistemas de expulsión activa a tetraciclina en procariotas. Estos sistemas, junto a la estructura de la membrana externa sí podrían justificar la resistencia intrínseca de las bacterias gram-negativas (*Nikaido H., 1994*).

Los sistemas activos de eflujo pueden ser clasificados de diferentes maneras, si nos referimos a la especificidad de sustrato, podemos decir que son “específicos” para una determinada droga o clase de droga o “no específicos” si expulsan múltiples drogas no relacionadas entre sí estructuralmente (*Putman M. y cols., 2000*). Además según la fuente de energía que utilizan para el bombeo activo se los puede asociar a la hidrólisis de ATP o a la fuerza motriz protónica (influjo de protones) (*Levy SB., 2002; Putman M. y cols., 2000*).

A los sistemas de expulsión no específicos se los denominan también sistemas MDR (porque producen múltiple resistencia a drogas), es decir son una serie de transportadores capaces de expulsar de forma relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados entre sí estructuralmente (*Lee A. y cols., 2000*). A este tipo de transportadores se los describió por primera vez en células eucariotas, se identificó una glucoproteína P capaz de conferir resistencia a anticancerígenos, mediante un mecanismo activo acoplado a la hidrólisis de ATP (*Bradshaw D. & Arceci RJ., 1998*). En la figura 2 se muestra una representación esquemática de las dos clases más importantes de sistemas de multiresistencia (*Putman M. y cols., 2000*). Aunque en la mayoría de los casos los sistemas de eflujo activo están codificados cromosómicamente, en bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) también están codificados por plásmidos (*Paulsen I., 1996*). Los primeros sistemas MDR descritos en bacterias fueron QacA en *S. aureus* (*Rouch DA. y cols., 1990*) o EmrB en *E. coli* (*Lomovskaya O., 1992*).

Desde entonces son cada vez son más numerosos los sistemas MDR implicados en la resistencia bacteriana tanto intrínseca como adquirida.

Los sistemas de transporte están implicados en el control de la homeostasis celular, en la captación de nutrientes esenciales como azúcares, en el eflujo de proteínas y en el control del eflujo de xenobióticos (*Sulavik M. y cols., 2001*). Estos sistemas están ampliamente distribuidos en organismos procariotas y en una misma bacteria se pueden identificar diferentes sistemas activos de eflujo (*Lee A. y cols., 2000*), lo que indicaría que la expulsión de drogas podría ser un efecto secundario a su función fisiológica.

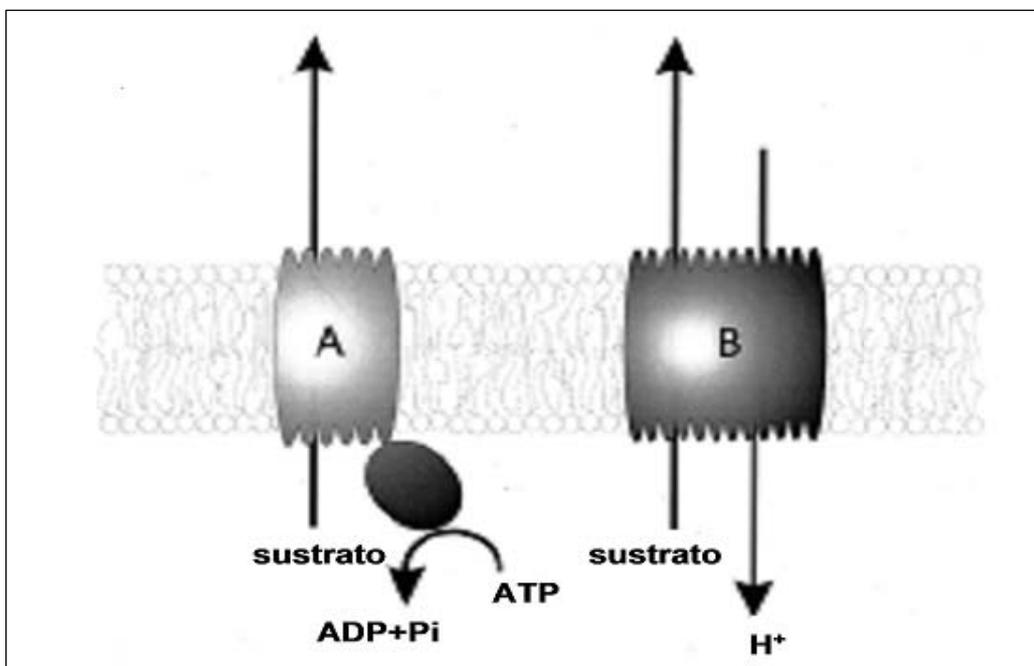
Aunque el rol fisiológico de estos sistemas de eflujo no está del todo clarificada, se puede decir que están involucrados en la protección de la integridad de la membrana o del estado energético de la célula, por ello algunos de estos transportadores están implicados en mecanismos generales de detoxificación,

involucrados en la excreción de toxinas endógenas y exógenas (Paulsen I., 1996; Putman M. y cols., 2000). El colato y desoxicolato son los principales componentes de las sales biliares, y están conjugados con lípidos. La bilis es secretada en el duodeno en altas concentraciones, y además tiene propiedades antimicrobianas al alterar la estructura de la bicapa lipídica de la bacteria, por lo que las bacterias desarrollan mecanismos para adaptarse y sobrevivir dentro del sistema gastrointestinal (Baucheron S. y cols, 2005).

Al sistema AcrAB-TolC de *E. coli*, se le atribuye la función biológica de expulsar sales biliares (Thanasii DG. y cols, 1997; Baucheron S. y cols., 2005).

Mientras que a otros sistemas activos de eflujo se los ha implicado en la señalización intracelular, como el sistema MexAB-OprM y MexEF-OprN de *P. aeruginosa*, que actúan como parte de los sistemas sensibles a quórum -*quorum sensing*- (Köhler T. y cols. 2001; Pesci EC. y cols., 1999) y a otros con funciones metabólicas como en el metabolismo del hierro (Paulsen I., 1996).

Pero a pesar de las funciones fisiológicas de estos sistemas activos de eflujo, lo que sí esta claro es que las bacterias los utilizan para evadirse de los efectos tóxicos de los agentes antimicrobianos en la práctica clínica, elevando su resistencia y llevando al fracaso en los tratamientos antimicrobianos.



**Fig. 1:** Sistemas acoplados a la hidrólisis de ATP y/o al influjo de protones (Putman M. y cols., 2000).

## 7.2 Clasificación de los transportadores MDR procariontas

A los transportadores de eflujo de antimicrobianos de acuerdo a la traslocasa, se los pueden clasificar en cinco superfamilias (Poole K., 2000; Andersen C., 2003).

1. **Transportadores tipo ABC (ATP- binding cassette)**
2. **Facilitadores mayores (MFS)**
3. **Resistencia-Nodulación-División ( RND)**
4. **Staphylococcal (or Small) multidrug resistance ( SMR)**
5. **Extrusión de múltiples drogas y compuestos tóxicos ( MATE)**

Los transportadores MFS pueden ser symporter (transportador de dos solutos en idéntica dirección), antiporter (transportador de dos solutos en dirección opuesta) o uniporter (transportador de un único soluto), mientras que los SMR y RND son antiporter de protones (Griffith K. y cols., 1992; Marger MD. & Saier MH., 1993).

Estos transportadores pueden encontrarse en bacterias, archaea y en eucariotas, a excepción de la superfamilia SMR que es exclusivamente procariota (Saier MH. y cols., 1998; Higgins CF., 1992; Tseng TT. y cols., 1999).

Mientras que a los transportadores de las superfamilias MFS y SMR se los han encontrado tanto en bacterias gram-positivas como en gram-negativas, los transportadores RND y MATE hasta el momento sólo se han identificado en bacterias gram-negativas.

## 7.3 Transportadores de múltiples drogas (MDR) en *E. coli*

En la actualidad podemos considerar a los sistemas activos de eflujo activo como uno de los principales componentes en los mecanismos de desarrollo de múltiple resistencia a antimicrobianos.

*E. coli* es capaz de expresar simultáneamente varios de estos sistemas de eflujo activo en respuesta a los efectos tóxicos de diferentes compuestos, haciendo eficiente el uso de esta habilidad para expulsar dichas drogas (Lee A. y cols., 2000). Así por ejemplo el sistema AcrAB-TolC está vinculado a la resistencia de antimicrobianos, colorantes, detergentes, ácidos grasos, sales biliares y solventes orgánicos, mientras que el sistema EmrAB-TolC expulsa compuestos

organomercuriales, drogas antibacterianas como ácido nalidíxico y tiolactomicina como desacoplantes hidrofóbicos (*Koronakis V., 2003*)

Además muchos estos transportadores MDR suelen tener sustratos comunes dando así mayores niveles de protección (*Paulsen I., 1996*).

En *E. coli* como en otras bacterias gram-negativas, los sistemas activos de eflujo generalmente forman sistemas de tres componentes para poder expulsar los compuestos a través de la membrana interna, periplasma y membrana externa, este sistema tripartito suele involucrar a diferentes familias de proteínas, en términos generales podemos decir que la proteína de membrana interna es la que está asociada a la fuente de energía pudiendo ser de la familia ABC acoplada a la hidrólisis del ATP o de las familias RND o MFS al transporte antiparalelo de protones, estas proteínas cooperan con otras ancladas a la membrana externa, como por ejemplo la porina TolC (*Andersen C., 2003*), pero generalmente existe una proteína que hace de puente entre ellas, esta proteína periplasmática adaptadora generalmente pertenece a la familia de proteínas de fusión, y se caracteriza por poseer un largo dominio periplasmático, y estar anclada a la membrana interna (*Eswaran J., 2004*).

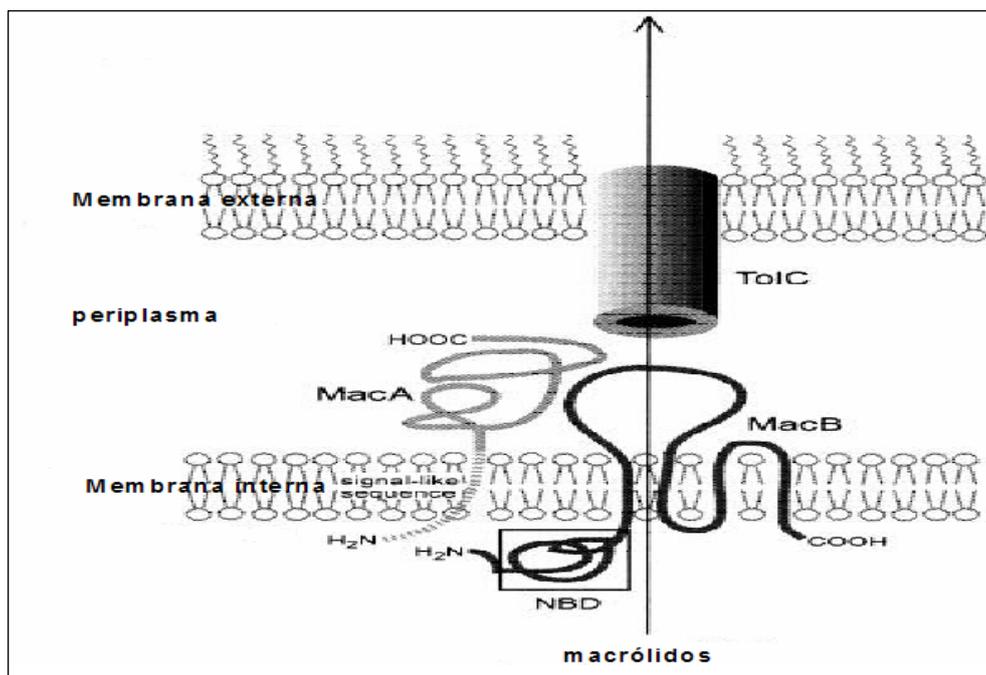
## **Familia ABC**

A esta superfamilia pertenecen diversos transportadores de fármacos, azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, péptidos, etc. Estos transportadores están acoplados a la hidrólisis de ATP.

La mayoría de estos transportadores median el eflujo de antimicrobianos específicos. El primero de ellos fue descrito en *Lactococcus lactis* y fue designado como *lmrA* (*Putman M. y cols., 2000*). El cromosoma de *E. coli* contiene al menos 5 genes que codificarían posibles sistemas de eflujo ABC: *mldAB*, *ybjYZ* (*macAB*), *yddA*, *yojHI*, *yhiH* (*Kobaysshi N. y cols., 2001*).

Dentro de los sistemas ABC posibles de *E. coli* cabe hacer mención al sistema MacAB. Este sistema se acopla a TolC y confiere resistencia a macrólidos. MacB (70Kda) es una proteína de membrana interna con cuatro supuestos dominios transmembrana y un sitio de unión de nucleótidos. Tiene una región entre los dominios 1 y 2 que se proyecta al periplasma e interacciona con MacA (40Kda.) proteína periférica perteneciente a las proteínas de fusión (MFP). Estas proteínas se

acoplan a TolC (porina de membrana externa) como lo muestra la figura 2 (Kobaysshi N. y cols., 2001).



**Fig. 2:** Representación esquemática del Sistema de eflujo ABC MacAB -TolC en cepas de *E. coli* (Kobaysshi N. y cols., 2001).

Las restantes familias MDR están acopladas a la fuerza protón motriz.

### Familia de los Facilitadores Mayores (MFS)

Estas proteínas se encuentran en bacterias gram-positivas y gram-negativas como en eucariotas mayores, y están involucradas en el transporte de varios sustratos, como azúcares, intermediarios del ciclo de krebs, esteres fosfatos, oligosacáridos y antimicrobianos (Paulsen I., 1996).

A las proteínas de esta familia a su vez s se las puede dividir en dos grupos o clusters, de acuerdo a si poseen 12 o 14 segmentos transmembrana (12-TMS, 14-TMS).

En la figura 3 se muestra una representación esquemática de los miembros de dichos grupos y de sus secuencias conservadas (Putman M. y cols., 2000).

## En cepas de *Escherichia coli* encontramos:

Dentro del cluster 12-TMS encontramos las siguientes proteínas:

**Bcr:** que confiere resistencia a la bicilomicina y sulfatiazol (*Putman M. y cols., 2000*).

**EmrD:** es un análogo a EmrB y está involucrado en la respuesta adaptativa al shock por baja energía. La expresión de este protege a la célula contra desacoplantes como el CCCP (*Putman M. y cols., 2000*).

**MdfA:** confiere resistencia a una amplia variedad de drogas neutras o cargadas positivamente (*Putman M. y cols., 2000*).

Existen además diversos transportadores hipotéticos o no caracterizados cuyos sustratos son desconocidos (*Paulsen I., 1996*):

**YdhC**

**YhfC**

**YhjX**

**YjiO**

**YidY**

**YceE**

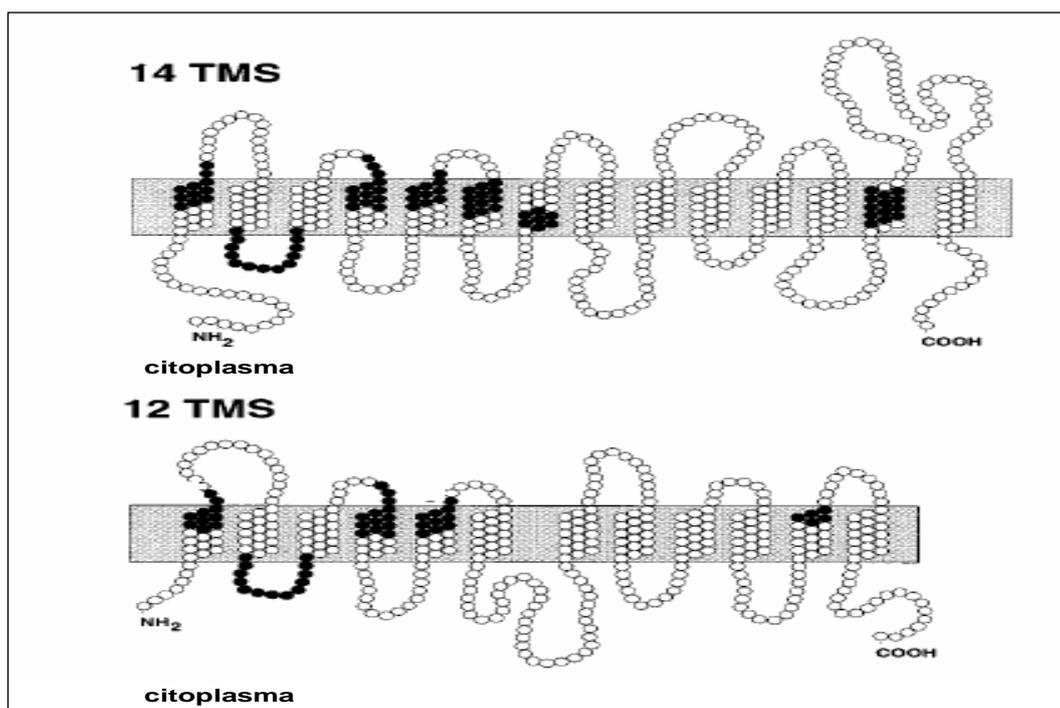
**YbdA**

Mientras que dentro del cluster 14-TMS encontramos:

**EmrB:** que confiere resistencia antimicrobianos y desacoplantes hidrofóbicos. El locus *emr* tiene 3 genes: *emrA*, *emrB* y *emrR*: *emrB* codifica el miembro de 14-TMS de la familia MFS, *emrA* codifica una proteína de fusión, y *emrR* codifica al regulador EmrR, homólogo de MarR. Este sistema de eflujo EmrAB puede estar asociado a una porina de membrana externa formando un sistema tripartito (*Martin R. & Rosner J., 1997*). Se postula que esta porina sería TolC (*Grnovic S. y cols, 2002; Putman M. y cols., 2000*). La sobre-producción de EmrR puede inhibir la expresión del locus *mar*, además de conferir resistencia a desacoplantes hidrofóbicos, compuestos organomercuriales y a algunos antimicrobianos hidrofóbicos como el ácido nalidíxico (*Paulsen I., 1996*).

Este sistema puede ser inducido en presencia de desacoplantes como el CCCP, ácido nalidíxico o por ácidos débiles como el salicilato (*Paulsen I., 1996; Putman M. y cols., 2000*).

**EmrKY:** la transcripción de *emrKY* es dependiente de la fase de crecimiento e inducida por tetraciclina (Paulsen I., 1996; Putman M. y cols., 2000). Las proteínas EmrK y EmrY poseen el 50% y 63% de homología con las proteínas EmrA y EmrB respectivamente, sugiriendo que estos sistemas poseen funciones similares, sin embargo la implicación de este sistema en la resistencia a antimicrobianos debe de ser aún demostrado (Putman M. y cols., 2000).



**Fig. 3:** Representación esquemática de los miembros de los cluster de 12-TMS y 14-TMS de la familia MFS. Las localizaciones en negro muestran las secuencias conservadas (Paulsen I., 1996).

### Familia SMR

Los transportadores pertenecientes a esta familia son los más pequeños, tienen aproximadamente 100 residuos de longitud (Yerushalmi H. & Schuldiner S., 2000).

Mientras que los demás transportadores poseen 12 a 14 segmentos transmembrana (TMS), estos sólo contienen 4 TMS, por lo que se propone que funcionen como complejos homo-oligoméricos, probablemente compuestos por tres monómeros. La secuenciación de estas proteínas revela que existen numerosos residuos conservados, lo que implicaría que podrían jugar un papel esencial en roles funcionales u estructurales (Putman M. y cols., 2000).

En *E. coli* la sobre-expresión del sistema EmrE, le confiere resistencia a cationes monovalentes, como profalvina, safranina O, bromuro de etidio y metilviologen, así como eritromicina, tetraciclina, sulfadiazina y tetrafenilfosfonio (*Sulavik M. y cols., 2001; Martin R. & Rosner J., 1997; Paulsen I., 1996; Putman M. y cols., 2000*).

## **Familia MATE**

Las proteínas transportadoras de este grupo se las han encontrado hasta el momento sólo en bacterias gram-negativas. Esta familia fue descrita primeramente por *Brown* y colaboradores en 1999, y esta compuesta por más de 30 proteínas, incluyendo a NorM, un transportador de drogas de *Vibrio parahaemolyticus*, y que es homólogo a YdhE de *E. coli*.

En *E. coli* el transportador **YdhE** media resistencia a colorantes, fluoroquinolonas hidrofílicas y aminoglicósidos. En un principio se pensó que estas proteínas pertenecían a la familia MFS, sin embargo no poseen secuencias de similares con ninguna de las proteínas de ese grupo (*Putman M. y cols., 2000*).

## **Familia RND**

Estas proteínas se caracterizan por poseer en su estructura secundaria 12-TMS (segmentos transmembrana) con 2 loops periplásmicos entre las hélices 1-2 y 7-8, además de poseer 4 regiones conservadas como muestra la Fig.4 (*Paulsen I., 1996; Putman M. y cols., 2000*). Estas proteínas están acopladas al potencial de membrana.

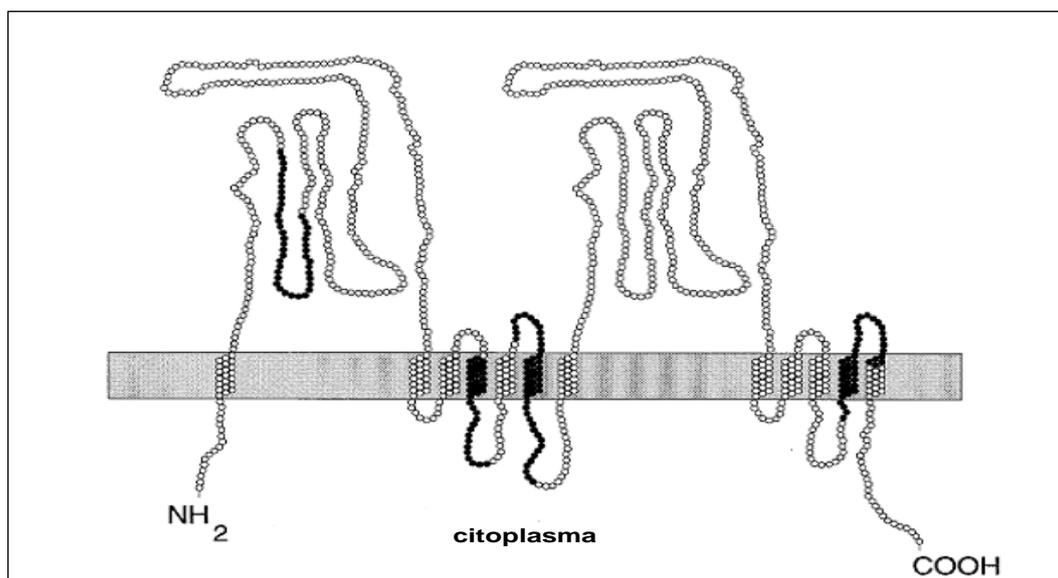
En las bacterias gram-negativas para que una droga alcance el medio extracelular es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa (*Paulsen I., 1996*) es por lo que las proteínas que pertenecen a esta familia suelen asociarse a otras formando un sistema de tres componentes caracterizado por la presencia de:

- una proteína transportadora (RND) en la membrana interna acoplada al potencial de membrana
- una proteína periplasmática adaptadora o proteína de fusión (MFP)
- una porina de membrana externa (OMP)

Generalmente los tres componentes están codificados por genes adyacentes formando parte de un operón, pero otras veces la porina puede transcribirse de manera independiente, tal es el caso de TolC de *E. coli*.

Diversos autores han propuesto dividir a los sistemas RND en tres categorías:

- 1- Sistemas monocomponentes, integrados por una proteína de membrana interna (ejemplo AcrD), que permite la expulsión de tóxicos hidrófilos (ejemplo: amino glucósidos)
- 2- Sistemas de dos componentes, integrados por una proteína de membrana interna y una proteína de fusión de membrana (MFP) (ejemplo MexJK) que permite el transporte de tóxicos anfipáticos (ejemplo: triclosán)
- 3- Sistemas de tres componentes, integrados por una proteína de membrana interna, una MFP y una porina, que son capaces de expulsar la mayoría de los tóxicos anfipáticos y lipofílicos (ejemplo eritromicina, tetraciclina, desoxicolato, quinolonas, etc.) ejemplo AcrAB-TolC en *E. coli* (Rosenberg E. y cols., 2000; Chuanchuen R. y cols., 2002). Pero además de los RND, algunos transportadores de las superfamilias ABC, MFS también forman parte de sistemas multicomponentes asociados a proteínas de fusión de membrana y a proteínas de membrana externa durante la expulsión de los sustratos, en este sentido (Martin R. & Rosner J., 1997).



**Fig. 4:** Representación esquemática de los transportadores RND. Estos transportadores poseen 12-TMS (segmentos transmembrana) con 2 loops periplásmicos entre las hélices 1-2 y 7-8, poseen 4 regiones conservadas marcadas en negro en la figura (Putman M. y cols., 2000).

Los sistemas RND están involucrados en el eflujo activo de diversos antimicrobianos entre los que podemos mencionar: tetraciclina, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, rifampicina, eritromicina, ácido fusídico y aminoglicósidos (*Bambeke F.V. y cols., 2000*).

#### **7.4. Clasificación de los principales sistemas de eflujo activo RND en cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*)**

En *E. coli* se conocen 7 proteínas de la familia RND que forman parte de sistemas activos de eflujo, 5 de estas (AcrB, AcrF, MdtB (YegN), MdtC (YegO), Yhiv (MdtF) expelen un gran cantidad de compuestos no relacionados químicamente, mientras que CusA (YbdE) y AcrD (tabla 1) parecen tener un espectro menos amplio de sustratos. La mayoría de estos sistemas activos de eflujo no se expresan o se expresan a bajo nivel en los aislamientos clínicos, sólo AcrAB-TolC se expresa constitutivamente a mayores niveles en *E. coli* y contribuyen a la resistencia intrínseca a numerosos antimicrobianos (*Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*).

**Tabla 1 : Clasificación de las principales proteínas de la familia RND**

RND	Especie bacteriana	sustrato
<b>AcrB</b>	<i>E. coli</i>	Sales biliares y sus derivados, naranja de acridina, tetraciclina, eritromicina, ácido fusárico, novobiocina, SDS, desoxicolato y mitomicina C
<b>AcrF</b>	<i>E. coli</i>	Igual que AcrB
<b>AcrD</b>	<i>E. coli</i>	Aminoglicósidos, tetraciclina, ácido Nalidíxico, norfloxacina, SDS, desoxicolato
<b>MdtB / MdtC</b>	<i>E. coli</i>	Desoxicolato y novobiocina
<b>YhiV</b>	<i>E. coli</i>	Desoxicolato, doxorubicina, rodamina, eritromicina, cristal violeta, benzalconio, y SDS
<b>MtrD</b>	<i>N. gonorrhoeae</i>	Antimicrobianos ( eritromicina, rifampicina, azitromicina), detergentes aniónicos, péptidos antimicrobianos, sales biliares, hormonas esteroideas y otros compuestos hidrofóbicos
<b>FarB</b>	<i>N. gonorrhoeae</i>	Ácidos grasos de cadena larga ( oleico, linoléico y palmítico)
<b>MexB</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Antimicrobianos ( fluoroquinolonas, betalactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprima, sulfamidas), triclosán, solventes orgánicos, detergentes, inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos,
<b>MexD</b>	<i>P. aeruginosa</i>	fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, tetraciclina, trimetoprima, betalactámicos( excepto carbapenems) y triclosán
<b>MexF</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima y triclosán
<b>MexY</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósidos, tetraciclina, eritromicina, y fluoroquinolonas
<b>MexK</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Triclosán, tetraciclina, y eritromicina
<b>SmeE</b>	<i>S. maltophilia</i>	Tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos y novobiocina
<b>SmeB</b>	<i>S. maltophilia</i>	Aminoglucósidos, fluoroquinolonas y en menor medida betalactámicos

A continuación se detallan las características de los sistemas que involucran dichas proteínas transportadoras en *E. coli*

### **Sistemas Acr de *E. coli*:**

En *E. coli* se han caracterizado tres transportadores Acr (Acridine resistance): AcrAB, AcrEF, AcrD.

AcrAB y AcrEF son los sistemas de bombeo más importantes de este microorganismo desde el punto de vista de la resistencia a antimicrobianos, recientemente se ha visto que AcrD, que en un principio se pensó que sólo confería resistencia a los aminoglicósidos, también es capaz de expulsar un amplio número de sustratos.

En *E. coli* tanto el locus *acrAB* como el locus *acrEF* están formados por 2 genes, *acrA/acrB* que codifican las proteínas AcrA y AcrB y los genes *acrE/acrF* que transcriben las proteínas AcrE y AcrF respectivamente.

La expresión de estos operones *acrAB* y *acrEF* esta reprimida por el producto de un gen regulador (*acrR* y *acrS* respectivamente) localizado corriente arriba y en la cadena complementaria de los genes del operón que previenen la excesiva expresión de dichos sistemas (*Ma D. y cols., 1996; Ma D. y cols., 1994*), puesto que también resulta tóxico para la bacteria (*Rosenberg E. y cols., 2003*)

A diferencia de los anteriores el transportador AcrD no forma parte de un operón, y no se ha identificado su gen regulador local (*Rosenberg E. y cols., 2000*). Los sistemas AcrAB y AcrEF están formados por una proteína transportadora de la superfamilia RND (AcrB/AcrF) y una proteína de fusión de membrana (AcrA/AcrE) (*Sulavik M. y cols., 2001*).

Se observó que cuando en *E. coli* se sobre-expresa el locus *acrEF*, se incrementa la resistencia a determinados compuestos como colorantes, detergentes y varias clases de antimicrobianos importantes en la terapéutica clínica, que son a su vez los mismos sustratos del sistema AcrAB (*Sulavik M. y cols., 2001*).

A pesar de que la sobre expresión de AcrEF contribuye a un incremento en la resistencia a los mismos sustratos de AcrAB, la delección de este sistema no contribuye a aumentar la sensibilidad a los mismos sustratos.

El transportador AcrD, por sí sólo, confiere resistencia a los aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina, tobramicina) que son drogas hidrofílicas y quizás formando parte de una sistema multicomponente, a la tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacin, novobiocina, SDS y desoxicolato. (*Sulavik M. y cols., 2001; Masi M. & Pradel E., 2003; Elkins CA. & Nikaido H., 2002*).

En estos sistemas activos de eflujo, TolC (homo trímero de membrana externa) coopera en el mecanismo de expulsión, esta porina se transcribe de manera independiente y tiene la habilidad de interactuar con proteínas transportadoras pertenecientes a diferentes superfamilias. Dentro de todos los sistemas mencionados el sistema de eflujo AcrAB-TolC es el sistema de eflujo activo más frecuentemente identificado en *E. coli*.

## Sistema de eflujo activo AcrAB-TolC

Es el sistema que juega un rol predominante en la resistencia intrínseca en *E. coli* a una amplia variedad de compuestos lipofílicos y anfifílicos como colorantes, detergentes, antimicrobianos lipofílicos entre los que podemos mencionar: novobiocina, ácido fusídico, eritromicina, cloxacilina, pero cuando este sistema se sobre-expresa se observan altos niveles de resistencia frente a muchos de los antimicrobianos usados en la práctica médica como tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, y a otros antimicrobianos lipofílicos,  $\beta$ -lactámicos, asimismo este sistema está involucrado en la tolerancia a solventes orgánicos como el ciclohexano (Zgurskaya HI. & Nikaido H., 1999).

Aunque el sustrato fisiológico de la mayoría de los transportadores aún está por esclarecerse, se ha sugerido que el sustrato natural del sistema AcrAB podrían ser las sales biliares, ya que es por este sustrato y por sus derivados, como el taurocolato y glucolato, por los que el sistema tiene mayor afinidad, pero también son sustratos de este sistema otros compuestos como naranja de acridina, ácido fusárico, bromuro de etidio, cristal violeta, dodecil sulfato de sodio (SDS), desoxicolato y mitomicina C (Elkins CA. & Nikaido H., 2002).

El sistema AcrAB puede ser inducido por diversas situaciones de estrés entre los que podemos mencionar al etanol 4%, 0,5 M de cloruro de sodio (estrés osmótico) o haciendo crecer a la bacteria hasta la fase estacionaria (Rosenberg E. y cols., 2003; Paulsen I., 1996).

Este sistema como se dijo anteriormente está formado por tres componentes:

### - **AcrB**

Es una proteína de membrana interna y es más grande en comparación a otras proteínas transportadoras de diferentes familias. AcrB forma homotrímeros, cada uno de los cuales contienen 12  $\alpha$ -hélice TMS (segmentos transmembrana) (Fralick J., 1996), con 2 grandes loops periplásmicos de aproximadamente 300 aminoácidos entre las hélices 1-2 y 7-8. Esta traslocasa de 36  $\alpha$ -hélice pertenece a la familia RND y cataliza el eflujo de sustancias a expensas de la fuerza protón motriz.

### - **AcrA**

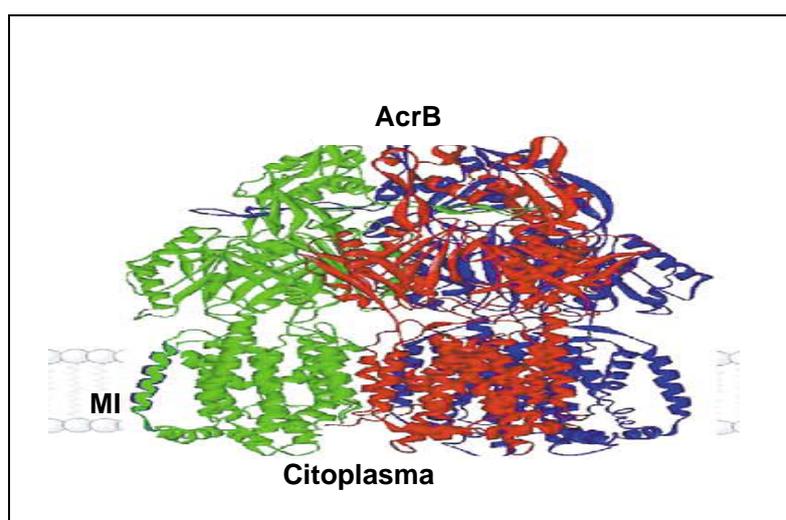
Es una lipoproteína periplásmica asimétrica perteneciente a la familia de proteínas de fusión (MFP) (Putman M. y cols., 2000), AcrA posee su extremo amino terminal anclado a la membrana interna (Fralick J., 1996; Husain F. y cols.,

2004), y un dominio periplasmático largo (Touzé T. y cols., 2004). Se ha demostrado que esta proteína se encuentra en forma homodímeros o trímeros (Elkins CA. & Nikaido H., 2002; Tikhonova E. & Zgurskaya H., 2004; Masi M. y cols., 2003). Se observó que los primeros 24 aminoácidos de AcrA muestran las características típicas de un péptido señal. Cuando se cliva este péptido señal, el residuo de serina es acilado con los ácidos grasos de la membrana interna. Debido a la forma elongada de esta proteína se postula que por medio de ella se ponen en contacto las proteínas AcrB presente en la membrana interna y TolC en la membrana externa, para llevar a cabo la expulsión de la droga desde el citoplasma bacteriano (Ramos J. y cols., 2002) y que la interacción con AcrB es por medio de entrecruzamientos químicos (Elkins CA. & Nikaido H., 2002).

### - TolC

Es una porina de membrana externa, es un homotrímero formado por un solo canal o túnel que permite el paso de moléculas de mayor diámetro, hasta los 35 Å aproximadamente (Augustus A. y cols., 2005).

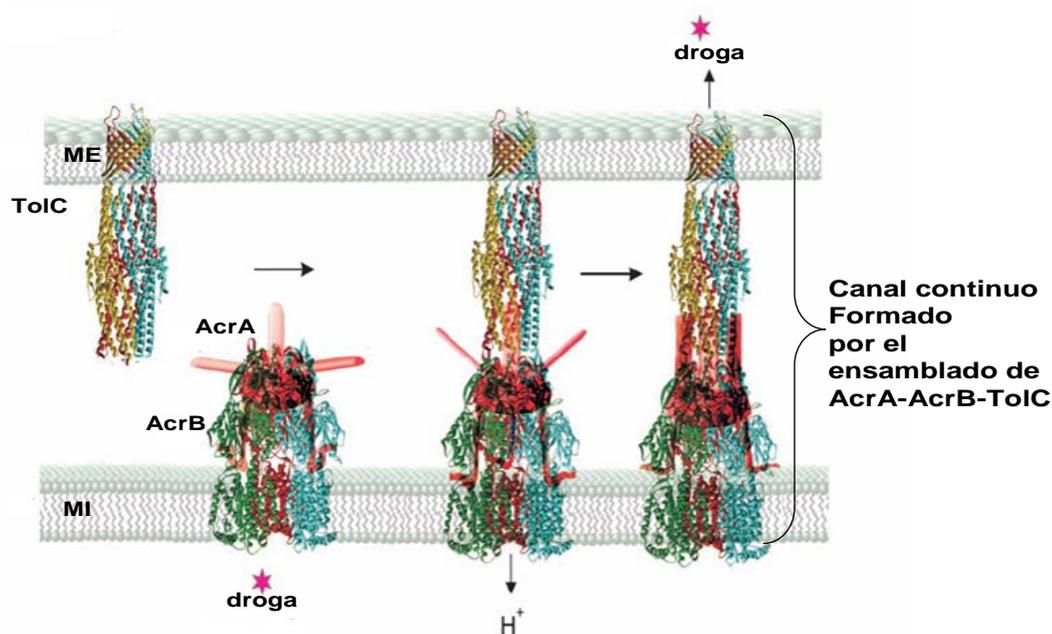
Como se menciona anteriormente TolC es un componente indispensable para la actividad de AcrAB, principal sistema de eflujo en *E. coli*, pero esta porina además interacciona con otros sistemas de eflujo activo. En *E. coli* se han caracterizado 5 sistemas RND: AcrAB, AcrEF, AcrD, MdtEF, MdtABC que necesitan de TolC para sus funciones, como así también los dos sistemas MFS: EmrAB, EmrKY y un sistema de eflujo de la familia ABC (ATP dependiente): MacAB (Michán C. y cols., 2003).



**Fig. 5:** Estructura de AcrB en la membrana interna (MI) de *E. coli* (Eswaran J., 2004).

Podemos decir que este complejo sistema activo de eflujo está formada por las 3 proteínas antes mencionadas, AcrB, AcrA y TolC, que se ensamblan de tal manera que forman un canal continuo por el que será expulsada la droga desde el citoplasma bacteriano atravesando las dos membranas y el periplasma de la bacteria, para alcanzar el medio extracelular. Este sistema utiliza el gradiente electroquímico de protones como fuente de energía. (Sharff A. y cols., 2001)(Fig.6)

La adquisición del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos está ligado a la sobre-expresión de AcrAB- TolC (Bohnert Jürgen A. y cols., 2006).



**Fig.6:** Modelo que indica la interacción entre TolC, la translocasa AcrB y el adaptador o proteína de fusión AcrA. (Eswaran J. y cols., 2004).

### Regulación de la expresión del sistema AcrAB en *E. coli*

Los sistemas de eflujo especialmente los que pertenecen a la familia RND, como es el caso del sistema AcrAB de *E. coli*, suelen ser la principal causa en el establecimiento de la resistencia intrínseca en la mayoría de las bacterias gram-negativas frente a antimicrobianos lipofílicos y anfifílicos como a agentes quimioterapéuticos (Rosenberg E. y cols., 2003), por otra parte la sobre-expresión contribuye también a la resistencia adquirida.

La regulación de los sistemas de eflujo en bacterias gram-negativas suele ser similar. Generalmente su expresión está regulada por la acción de una proteína represora local y la aparición de un fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos se debe a mutaciones en los genes reguladores locales, pero como

se ha visto anteriormente estos sistemas MDR también están regulados por activadores globales entre los que podemos mencionar las proteínas **MarA**, **SoxS**, **Rob**, **SdiA** entre otros.

La regulación debe de ser muy precisa para evitar los posibles efectos negativos que podría tener una desregulación sobre la fisiología bacteriana. Una sobre expresión de los sistemas de eflujo generan un aumento en la resistencia a antimicrobianos, pero la excesiva sobreproducción podría tener efectos tóxicos para la célula, una posible explicación sería la amplia especificidad de sustratos que expelen dichos sistemas que afectarían también a algunos metabolitos intermediarios (*Rosenberg E. y cols., 2003*), por esta razón, los sistemas de eflujo activo están sujetos a múltiples niveles de regulación.

Su expresión puede estar modulada por reguladores locales, activadores o represores, que son proteínas codificadas por genes adyacentes a los del sistemas de bombeo, o controlada por otros factores, es lógico pensar que se activen en presencia de sus sustrato natural, pero se desconoce la función real de la mayoría de estos transportadores y aunque se ha visto que son capaces de expulsar una amplia variedad de compuestos, de momento no se han identificado los sustratos naturales en la mayoría de los casos, por otra parte, cada vez se están encontrando más ejemplos de regulación de sistemas MDR mediada por factores de transcripción globales (*Grkovic S. y cols., 2001*).

#### - **Regulación por medio de un represor local:**

Generalmente la expresión de este tipo de sistemas se encuentra reprimida por el producto de un gen regulador localizado corriente arriba del primer gen del operón y en la hebra complementaria. Este tipo de regulación es el mejor estudiado. En la mayoría de los casos, el producto del gen represor puede unirse a la región intergénica reprimiendo la transcripción tanto de genes del operón como la suya propia. En diversas situaciones puede darse una represión parcial que permita una expresión basal del sistema de eflujo relacionada con la resistencia intrínseca a los antimicrobianos (*Sanchez P. y cols., 2002; Li XZ. y cols., 1998; Van Veen HW. y cols., 1998*). Los sistemas AcrAB y AcrEF de *E. coli* están regulados por la acción de un represor local, AcrR y AcrS respectivamente.

AcrR inhibe su propia transcripción como la del sistema AcrAB, pero no estaría involucrada en la respuesta frente a condiciones de estrés. Por lo que la

función principal de AcrR sería la de modular la expresión del locus *acrAB*, previniendo la excesiva producción de dicha bomba de eflujo. AcrS es el regulador negativo de AcrEF.

Generalmente la aparición del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos esta asociada a mutaciones en los genes reguladores locales o en sus regiones promotoras. Se han encontrado mutaciones en los genes *acrR* y *acrS* de *E. coli*. Estos reguladores locales parecen jugar solamente el rol de moduladores, mientras que los activadores globales serian los responsables de la inducción del sistema AcrAB-TolC (*Grnovic S. y cols., 2002*).

#### - **Reguladores globales:**

Estos reguladores globales se activan en general en situaciones de estrés bacteriano (entrada en fase estacionaria, choque osmótico, choque térmico, cambios de pH, estrés oxidativo, estrés producido por etanol, etc.) inducen la expresión de numerosos genes, entre ellos algunos que codifican la síntesis de sistemas de transporte múltiples de fármacos. En este sentido, se ha descrito que el activador global de *E. coli* MarA, activa la expresión de al menos 60 genes, entre los que se encuentra el operón AcrAB. Se ha visto que mutaciones en *marR* producen una sobre expresión de AcrAB-TolC en ausencia de mutaciones en *acrR*.

Además de MarA se han identificado otros tres reguladores globales en *E. coli* implicados en la activación de AcrAB: SoxS, Rob, SdiA. Las proteínas MarA y SoxS controlan su propio nivel de expresión, pero no se sabe cómo Rob, que se expresa constitutivamente, ejerce su propia acción regulatoria. SoxS y Rob activan la expresión del operón AcrAB, tanto en forma directa como mediada por MarA. La proteína de SdiA pertenece a la familia de LuxR/UhpA de reguladores transcripcionales y participa en la regulación de múltiples genes implicados en la septación, motilidad y quimiotaxis. Se observó que cuando en las cepas de *E. coli* se sobre expresaba esta proteína aparecía múltiple resistencia a antimicrobianos y esto era debido a la regulación positiva que esta ejerce sobre el sistema de eflujo AcrAB (*Rahmati S. y cols., 2002*).

Se ha visto múltiple resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* con deleción en el sistema AcrAB. Por lo que se postula que podrían estar implicados otros sistemas MDR. Además antes se pensaba que EvgA era un regulador específico de los sistemas de bombeo EmrKY y YhiUV de *E. coli*, recientemente

se ha visto que es un regulador global que induce la expresión de al menos 37 genes en este microorganismo, algunos relacionados con la resistencia a ácidos y la expulsión activa de antimicrobianos, y 21 genes de función desconocida (*Van Veen HW. y cols., 1998; Masuda N. & Church GM., 2002; Martin R. & Rosner J., 1997*)

Otra proteína que esta involucrada en la regulación de *acrAB-TolC* es FIS. Una proteína regulatoria que modifica la actividad transcripcional en diferentes condiciones de crecimiento, esta a su vez también puede unirse a *marO*. Se propone que FIS es una proteína que limita los niveles totales superenrollamiento negativo y estabiliza la arquitectura del ADN de ciertos promotores, por lo cual, para *marRAB* significa un estímulo adicional de la transcripción mediada por MarA, Rob, o SoxS (*Grnovic S., y cols., 2002*).

### **Sistemas YhiUV y MdtABC de *E. coli***

Se han caracterizado otros dos sistemas de bombeo de fármacos en *E. coli*: YhiUV, MdtABC. Las proteínas YhiU y MdtA pertenecen a la familia MFP mientras que YhiV y MdtB, MdtC a la superfamilia RND.

YhiUV confiere resistencia a desoxicolato, cristal violeta, benzalconio y SDS (*Nagakubo S. y cols., 2002; Baranova N. & Nikaido H., 2002*). Este sistema es regulado por un sistema de dos componentes EvgAS (*Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*). Mutaciones en los genes *yhiUV* provocan un incremento marcado en la susceptibilidad a diferentes drogas, sugiriendo que este sistema puede jugar un papel en la resistencia a antimicrobianos, aunque no se ha demostrado aún un eflujo directo de drogas por medio de este sistema. (*Putman M. y cols., 2000*). Recientemente se ha descrito que el sistema YhiUV/TolC además de expeler hormonas esteroideas, bromuro de etidio, doxorubicina y eritromicina entre otras, confiere menor susceptibilidad a desoxicolato, acriflavina, rodaminaG, PA $\beta$ N (fenilalanina-arginina- $\beta$ -naftilamida), novobiocina, clindamicina, cloranfenicol, pyronin Y ( un nuevo macrólido) y fluoroquinilonas, y en cierta medida a linezolid (*Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*).

Por su parte, el sistema MdtABC está compuesto por 2 proteínas MdtB y MdtC que se disponen formando heterodímeros con un rango de sustratos ampliados (*Nagakubo S. y cols., 2002*) y MdtA que funciona como proteína de fusión. Este sistema es responsable de la resistencia a desoxicolato, sales biliares y novobiocina aunque recientemente se observó que también confieren resistencia de

bajo nivel a norfloxacin. Este sistema es regulado por la proteína reguladora BaeR que también regula positivamente a AcrD (*Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*). Existe un gen en el mismo operón *mdtD* que codifica una proteína tipo MFS, pero que no es requerida para la resistencia a antimicrobianos (*Grnovic S. y cols., 2002*).

Se observó que los sistemas YhiUV y MdtABC también requieren de la presencia de TolC en la membrana externa (*Grnovic S. y cols., 2002*) para poder ejercer el eflujo activo de drogas.

### **7.5. Efectos de la sobre-expresión de los sistemas de eflujo en la susceptibilidad a diversos antimicrobianos en cepas de *E. coli***

Los sistemas de eflujo a múltiples drogas presentes en bacterias son un serio problema en la salud pública, pues contribuyen a la emergencia de microorganismos resistentes a muchas de las drogas usadas en la práctica clínica y por ende al fracaso de los tratamientos, se puede decir que estos sistemas están involucrados tanto en la resistencia intrínseca como adquirida en *E. coli*.

Otra cuestión que cabe mencionar es que los antimicrobianos, colorantes y desinfectantes son usados cotidianamente, además de ser sustratos de estos sistemas activos de eflujo, suelen inducir la sobre-expresión de los sistemas de eflujo, posibilitando a que las bacterias adquieran mayores niveles de resistencia (*Putman M. y cols., 2000*).

Se hicieron estudios con cepas de *E. coli* que sobre-expresaban los diferentes sistemas de eflujo, AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, EmrAB, EmrKY, MacAB, MdfA, EmrE y MdtK y luego se determinó la concentración inhibitoria mínima (CMI) ensayando una gran variedad de fármacos  $\beta$ -lactámicos y se las comparó con la cepa madre sensible resultando que la sobre-expresión de AcrEF disminuye la sensibilidad a oxacilina (128 veces), cloxacilina (4 veces), nafcilina (128 veces), cefuroxima (4 veces), cefamandole (4 veces), excepto para faropemen en el que no se ve alterada la CMI y si en las cepas que hiperexpresan AcrAB (incrementó 4 veces). Cabe destacar que en este estudio la sensibilidad a Aztreonam no se vio alterada por la sobre-expresión de AcrAB ni de AcrEF (*Nishino K. y cols., 2003*).

Lo que las diferentes evidencias sugieren es que el patrón de sensibilidad manifestado por cepas que sobre-expresan AcrEF es muy similar al que se obtiene con cepas que hiperexpresan AcrAB (*Nishino K. y cols., 2003*).

En cambio con la sobre-expresión de AcrD se obtuvo un incremento de resistencia para la oxacilina (32 veces), cloxacilina (16 veces), nafcilina (32 veces), cefamandole (2 veces), carbenicilina (16 veces), sulbenicilina (32 veces), aztreonam (8 veces) (*Nishino K. y cols., 2003*).

Mientras que la sobre-expresión del sistema MdtABC condujo a incrementar la CMI para Oxacilina (8 veces), Nafcilina (4 veces), carbenicilina (4 veces), sulbenicilina (8 veces), cloxacilina (16 veces). Excepto por el Aztreonam, el espectro de resistencia a  $\beta$ -lactámicos obtenido por AcrD es similar al de MdtABC. Estos transportadores tienen similitud en la especificidad de sustratos como novobiocina, desoxicolato, y SDS (*Hirakawa H. y cols., 2006; Nishino K. y cols. 2003*).

A diferencia de lo citado anteriormente los sistemas de eflujo EmrAB, EmrKY, MacAB, MdfA, EmrE y MdtK no han mostrado conferir resistencia a  $\beta$ -lactámicos (*Nishino K. y cols., 2003*).

Se realizaron trabajos usando cepas de *E. coli* deficientes de TolC pero que sobre-expresaban los sistemas de eflujo AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC o MdtEF, observando que en estas cepas no se alteraba la resistencia a los antimicrobianos ensayados, esto lleva a concluir que TolC es indispensable para el desarrollo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *E. coli*. Los transportadores independientes de TolC como MdfA, EmrE y MdtK no confieren resistencia a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos probablemente por no interactuar con esta porina. Asimismo está establecido que TolC es requerida para el normal funcionamiento de los transportadores RND.

Por su parte, la delección del locus *acrAB* en cepas de *E. coli* incrementa la sensibilidad a muchos antimicrobianos, pero si se hace lo mismo con *acrD*, *acrEF*, *mdtABC*, *mdtEF* no se observan cambios en la sensibilidad a los mismos, una posible explicación puede ser que la delección de estos genes pueda estar enmascarado por *acrAB*, o que la expresión de estos genes no sea expresada en condiciones normales.

Tenemos que tener presente que la sobre-expresión de AcrAB también incrementa la resistencia a otros compuestos como bromuro de etidio, cristal violeta, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, y tetraciclina (*Elkins CA. & Nikaido H., 2002*), observándose un incremento de 4-8 veces para norfloxacina, 4-

6 veces para cloranfenicol, 4-16 veces para tetraciclina y de 2-4 veces para ácido nalidíxico.

En general la bibliografía indica que la sobre-expresión de AcrAB en *E. coli* lleva a un incremento en la resistencia de 2 a 4 veces para diversos antimicrobianos en comparación con la cepa origen sensible (*Tikhonova Elena B. & Zgurskaya Helen I., 2004*), pero pueden hallarse resultados mayores a los anteriores puesto que los mismos varían también según el grado en que se expresa esta bomba de eflujo activo en *E. coli*, observándose incrementos de resistencia de hasta 32 veces aciprofloxacina, 64 veces a norfloxacina, 32 veces a ácido nalidíxico, y 24 veces a cloranfenicol (*Hervé N. y cols., 2006*).

El sistema AcrAB-TolC también es responsable de la resistencia a macrólidos en *E. coli*, si se inactiva *acrAB* en *E. coli* se produce un incremento de 4 a 8 veces en la susceptibilidad a claritromicina y eritromicina, sin embargo al inactivar *acrAB-tolC* los incrementos obtenidos son de 32 a 64 veces mayores respecto a la cepa control (*Chollet R. y cols., 2004*).

Además la sensibilidad también se ve afectada por el uso de inhibidores de los sistemas de eflujo. Por lo que este sistema también tiene como sustratos a estos antimicrobianos, sin embargo no se obtuvo el mismo resultado con la telitromicina, cuya sensibilidad sólo se incremento 4 veces cuando se inactivaron los genes antes mencionados, sugiriendo que en la resistencia a ketólidos podría estar implicado un sistema de eflujo independiente de AcrAB-TolC (*Chollet R. y cols., 2004*).



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

1. **Identificación bacteriana y medios de siembra**
2. **Antimicrobianos y Reactivos utilizados en este estudio**
3. **Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo**
4. **Selección *in vitro* de mutantes multirresistentes a partir de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas:**
  - Selección de mutantes multirresistentes con antimicrobianos
  - Selección de mutantes multirresistentes con Fármacos no antimicrobianos
  - Frecuencia de selección
5. **Ensayos de inducción de multirresistencia en cepas de *E. coli* susceptibles y compuestos utilizados en este trabajo**
6. **Valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos**
  - Test de dilución en agar
  - Test de difusión en agar
7. **Caracterización de los sistemas de eflujo valorando la susceptibilidad a antimicrobianos en presencia de inhibidor de eflujo activo**
8. **Métodos de obtención de los extractos de proteína de membrana externa e interna a partir de cepas de *E. coli*.**
  - Obtención de los extractos de OMP e IMP
  - Obtención de los extractos de Proteínas de unión a penicilina (PBP)
  - Obtención de los extractos de proteína de membrana externa bajo el efecto de NaCl al 1,35%
9. **Concentración de proteínas en los extractos (método de Lowry)**
10. **Análisis del perfil de proteínas de membrana externa e interna**
  - Electroforesis en geles de poliacrilamida
  - Métodos de detección
11. **Valoración de la actividad  $\beta$ -lactamasa sobre el extracto crudo.**
  - Obtención del extracto crudo
  - Valoración de la Actividad Específica de los Extractos Enzimáticos Crudos
12. **Valoración del incremento en la tolerancia al ciclohexano**
13. **Ensayos de transducción**
14. **Dosaje de la actividad Betagalactosidasa**
15. **Valoración de la acumulación de norfloxacin.**
  - Técnica de obtención de los sobrenadantes con norfloxacin acumulada intracelularmente
  - Técnica de bioensayo
16. **Estudio de los cambios morfológicos**
  - Tinción de gram
  - Técnica en fresco.
17. **Estudio del nivel de expresión de *acrB***
  - Extracción de ARN
  - Transcripción inversa del ARN total y PCR del ADNc

## 1) Identificación bacteriana- medios de siembra

- **Medios de identificación**

- **Sistema API 20E**

El sistema API 20 E se utiliza para la identificación de bacilos gram-negativos que pertenezcan a la familia *Enterobacteriaceae*. Está compuesto por 20 microtubos que contienen medios de cultivo en forma deshidratada.

En primer lugar se reparte unos 5 ml de agua destilada estéril en los tubos de una cámara de incubación, y se deposita la galería API 20 E en su interior. Posteriormente se realiza una suspensión bacteriana, con una o varias colonias iguales, en 5 ml de suero salino estéril, hasta alcanzar una turbidez igual al patrón 0,5 de McFarland. A continuación, se llenan los cuerpos de los microtubos de la galería API 20 E con la suspensión bacteriana recién preparada. Se deberán rellenar también las cúpulas de los microtubos rotulados con CIT, VP y GEL (citrato sódico, piruvato sódico y gelatina de Kohn). Asimismo habrá que rellenar con aceite de parafina estéril las cúpulas de los microtubos rotulados con ADH, LDC, ODC, URE y SH<sub>2</sub> (arginina, lisina, ornitina, urea y tiosulfato sódico), para obtener anaerobiosis. El test N° 21 corresponde a la prueba de la citocromo oxidasa, que se realiza mediante tiras comerciales (DIFCO), dando lugar a un color azul oscuro cuando la reacción es positiva.

La galería se incuba a 37 °C durante 18 a 24 horas, se revela con los reactivos adecuados según la tabla de lectura y se identifica el microorganismo por comparación con las Tablas de Identificación.

▪ **Medios de siembra**

a) **Medios de agar**

✓ **Agar de infusión de cerebro y corazón ( ACC)**

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

Agar de infusión de cerebro y corazón en pico de flauta	
Infusión de cerebro de ternero	200 g
Infusión de corazón de vaca	250 g
Proteasa peptona	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar	15 g
(Suministrado por DIFCO)	

Se utilizó como medio de conservación de las cepas durante un periodo de tiempo de 1 a 2 meses a una temperatura de 4-8 °C. Se resuspendieron 52 g del medio deshidratado por litro de agua destilada y se calentaron hasta su total disolución se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se repartió en cantidades de 20 ml por placa de petri y a cada placa de medio de cultivo aún sin solidificar, se le añadió una concentración subinhibitoria de diferentes fármacos, según el mutante que se desease preservar. Posteriormente, se situaron sobre una superficie hasta que el medio solidificó. Las diferentes placas preparadas fueron inoculadas con una colonia de cada uno de los mutantes y se mantuvieron a 37 °C, durante 18-24 horas. Una vez crecidas las cepas, se guardaron a una temperatura de 4 °C.

### ✓ Agar Mac Conckey

El agar de MacConkey es un medio selectivo diferencial de cultivo en el que los organismos no fermentadores de la lactosa forman colonias incoloras y transparentes (*Álvarez Benito y cols., 1990*). Este medio se utilizó en placas de Petri estériles de 10 cm. de diámetro. En algunos casos se incorporaron al medio de cultivo concentraciones subinhibitorias del fármaco de selección, para preservar las cepas mutantes.

El medio se preparó disolviendo 50 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada, calentándolo hasta su completa disolución y esterilizándolo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar en un baño maría hasta los 50 °C. Entretanto se incorporaron, en su caso, a las placas de Petri las disoluciones del fármaco, necesarias para preservar las cepas mutantes. Finalmente se distribuyó el medio en dichas placas de cultivo y se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal nivelada.

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

Agar de Mac Conkey	
Peptona	7 g
Proteasa peptona	10 g
Lactosa	10 g
Cloruro sódico	5 g
Sales biliares	1,5 g
Agar	13 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
pH 7,1 a 25 °C (Suministrado por DIFCO)	

### ✓ Agar de Mueller Hinton

Es un agar enriquecido utilizado como medio de elección para realizar pruebas de sensibilidad a los Antimicrobianos (*Álvarez Benito y cols., 1990*). El medio se preparó disolviendo 38 gramos de dicho medio deshidratado, por litro de agua destilada y calentándolo hasta su completa disolución. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente se distribuyeron volúmenes fijos y determinados del medio en placas de Petri estériles y se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal nivelada.

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

Agar de Mueller Hinton	
Infusión de carne de vaca	300 g
Bio-case	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17 g
Cationes divalentes	6,08 mg Ca <sup>2+</sup> / litro-4,32 mg Mg <sup>2+</sup> / litro
	pH 7,3 a 25 °C (Suministrado por DIFCO)

### ✓ Agar lambda

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

Agar lambda	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio fue utilizado en los ensayos de transducción, para obtener mutantes con fusiones al gen *lacZ*.

✓ **Agar lambda kanamicina**

Al medio agar lambda se le añade una solución de Kanamicina de concentración final 50µM. Medio utilizado para la obtención de colonias transducidas.

✓ **Agar LB (Luria-Bertani )**

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

<b>Agar LB</b>	
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de sodio	10g
Agar	12 g
Agua destilada	1000ml
PH: 7.0 ± 0.2 a 25 °C. (Suministrado por DIFCO)	

Se rehidrataron los componentes del medio por litro de agua destilada y luego se lo esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (*Miller JH., 1972*).

## B) Medios de cultivo líquidos

### ✓ Medio Antibiótico N° 3

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

<b>Medio Antibiótico N° 3</b>	
Extracto de carne de vaca	1,5 g
Extracto de levadura	1,5 g
Peptona	5 g
Dextrosa	1 g
Cloruro sódico	3,5 g
Fosfato dispotásico	3,68 g
Fosfato monopotásico	1,32 g
Agua destilada	1000ml
pH 7,0 ± 0,05 a 25 °C (Suministrado por DIFCO)	

El medio se rehidrató disolviendo 17,5 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Se distribuyó en matraces o en tubos, y finalmente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Este medio fue utilizado en la obtención de los extractos de proteínas de membrana externa y para los extractos de proteínas de unión a penicilina (PBP) y en los ensayos de inducción de las cepas de *E. coli*.

### ✓ **Caldo de Mueller Hinton**

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

<b>Caldo de Mueller Hinton</b>	
Infusión de carne de vaca	300g
Bio-case	17,5 g
Almidón soluble	1,5 g
Cationes divalentes	6,08 mg Ca <sup>2+</sup> /litro ; 4, 32 mg Mg <sup>2+</sup> /litro
pH 7,3 ± 0,1 a 25°C (Suministrado por DIFCO)	

Se utiliza para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos que crecen en aerobiosis por el método de dilución (*Álvarez Benito y cols., 1990*). Se preparó disolviendo 21 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Se distribuyó en matraces o en tubos, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos

### ✓ **Caldo de Mueller Hinton con 15% de glicerol**

Se utiliza como medio de conservación de cepas. Se resuspendieron 21 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Se añadió un 15% de glicerol y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Se repartieron en tubos eppendorf estériles y se inocularon con 100-200 µl del cultivo fresco de 24 horas que se obtuvieron sembrando cada cepa en tubo con caldo de Mueller Hinton. Se congelaron a -70 °C (*Alonso-Urmeneta, 1995; Gherna Robert L. y cols., 1981, Álvarez Benito y cols. 1990*)

✓ **Caldo LB (*Luria-Bertani Broth*)**

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

<b>Caldo LB</b>	
Triptona	1g
Extracto de levadura	0,5g
Cloruro de sodio	1g
Agua destilada	100 ml
pH : 7.0 ± 0.2 at 25 °C. (Suministrado por DIFCO)	

Se resuspenden los componentes en 100 ml de agua destilada, se calienta hasta disolución total, y luego se distribuye en tubos, cada uno conteniendo 5 ml de caldo, se tapan herméticamente los tubos y se esterilizan 15 min. a 120 °C (*Miller JH., 1972*). En ocasiones a los tubos se les añade un fármaco en concentración conocida para realizar dichas pruebas.

Se utiliza como medio para: los ensayos de tolerancia al ciclohexano y para la medida de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. En los ensayos de Tolerancia al ciclohexano se le adiciona al medio 0,1 % de glucosa y 10mM de MgSO<sub>4</sub>.

✓ **Caldo LB para ensayos de transducción**

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente

<b>Caldo LB</b>	
Triptona	32 g
Extracto De Levadura	20 g
Cloruro De Sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH: 7	

Disolver los componentes en agua destilada, calentar hasta hervor, llevar a pH: 7 con 5 ml de Hidróxido de Sodio 1N que se deben añadir antes de autoclavar. Autoclavar 15 min. a 121 °C. Luego añadir una concentración final 10 mM de cloruro de magnesio. Este caldo se utiliza en los ensayos de transducción. Caldo

LB Maltosa: se añade al caldo descrito una solución de maltosa 0,2% concentración final. Este caldo se utiliza en los ensayos de Transducción.

✓ **Caldo infusión cerebro corazón**

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

<b>Caldo Infusión de cerebro y corazón</b>	
Infusión de cerebro de ternero	200 g
Infusión de corazón de vaca	250 g
Proteasa peptona	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
pH 7,4 ± 0,2 a 25 °C	

El caldo de cerebro y corazón (CCC) es un medio líquido de enriquecimiento (*Álvarez Benito y cols., 1990*). Se preparó disolviendo 37 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Se distribuyó en tubos o en matraces, y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Es el medio utilizado para la obtención de los extractos enzimáticos y para la selección de mutantes.

## 2) Antibióticos y Reactivos utilizados en este estudio

A continuación se detallan los antibióticos utilizados en este estudio y las casas comerciales correspondientes

Antibiótico	discos para susceptibilidad en medio sólido		Laboratorio
Aztreonam	30µg	BIO-RAD	Sigma
Bencilpenicilina	-	-	Sigma
Cefaloridina	-	-	Sigma
Cefalotina	30µg	BIO-RAD	Sigma
Cefepime	-	-	Bristol-Myers Squibb
Cefpirome	30µg	BIO-RAD	Hoechst
Cefotaxima	30µg	BIO-RAD	Roussel ibérica
Cefoxitina	30µg	BIO-RAD	Merck-Sharp & Dohme
Ceftazidima	30µg	BIO-RAD	Glaxo
Ceftriaxona	30µg	BIO-RAD	Roche
Ciprofloxacina	5µg	BIO-RAD	Bayer Leverkusen
Cloranfenicol	30µg	BIO-RAD	Sigma
Discos Esteriles	-	-	Difco
Imipenem	10µg	BIO-RAD	Merck-Sharp & Dohme
Lomefloxacina	5 µg	-	G.D. Searle & Co
Mitomicina C	4 µg	-	Sigma
Norfloxacina	5 µg	BIO-RAD	Sigma
Tetraciclina	30µg	BIO-RAD	Sigma

## Reactivos utilizados en este estudio

A continuación se detallan los reactivos utilizados en este estudio y las casas comerciales correspondientes

Reactivos	Laboratorio	Reactivos	Laboratorio
Ácido clorhídrico	Panreac	Fosfato de Sodio MonoBásico	Merk
Ácido acético	Panreac	Glicerol	Merk
Ácido Etilen-Diamino-Tetraacético( EDTA)	Sigma	Glicina	Sigma
Ácido sulfúrico	Sigma	Glutaraldehído	Merk
Acrilamida	Sigma	Hidróxido de Sodio	Merk
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Sigma	maltosa	Sigma
Azul Brillante (Brillant Blue R250)	Sigma	Metanol	Panreac
Azul de Bromofenol	Aldrich	N,N'Metilenbisacrilamida	Sigma
Bocilina	Molecular Probes, Inc.	ONPG	Sigma
Carbonato de Sodio	Sigma	Paraquat	Sigma
Carbonilcianuro m-Clorofenilhidrazona (CCCP)	Sigma	Persulfato Amónico	Sigma
Ciclohexano	Sigma	Reactivo de Folin Ciacultau	Sigma
cloroformo	Sigma	Reserpina	Sigma
Cloruro de Bario	Sigma	Salicilato de sodio	Sigma
Cloruro de Magnesio	Sigma	Sarkosyl ( N- lauroil sarcosinato sódico)	Sigma
Cloruro de potasio	Sigma	SDS ( Dodecil Sulfato Sódico)	Sigma
Cloruro de Sodio	Panreac	Sulfato Cúprico	Sigma
Etanol	Panreac	Sulfato de magnesio	Sigma
Fenilmetilsulfonilfluoruro (PSMF)	Sigma	Tartrato Sódico	Carlo Erba ( RPE)
Formaldehido 37%	Sigma	Trisma Base	Sigma
Fosfato de Sodio di Básico	Merk	Urea	Sigma

### 3) Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo:

#### - Cepas origen:

En este estudio se utilizaron como cepas origen dos cepas sensibles de *E. coli* aisladas de muestras clínicas denominadas PS7 y PS11 (previamente caracterizadas por la Dra. M<sup>a</sup> del Mar Tavío Pérez, y que junto al resto de las cepas de este estudio pertenecen al catálogo de cepas de la Dra. Tavío Pérez en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

#### - Cepas controles:

*E. coli* AG100, *E. coli* AG112 (mutante *marR* derivada de la cepa Ag100 y deficiente en OmpF). Ambas cepas fueron donadas por S.B. Levy, Tufts University, USA a la Dra. M<sup>a</sup> del Mar Tavío.

La cepa *K. pneumoniae* ATCC-10031 es la cepa recomendada por Colección Española de Cultivos Tipo para los Test de susceptibilidad y fue donada por el Profesor Federico Uruburu (Valencia) a la Dra. M<sup>a</sup> del Mar Tavío y se utilizó como cepa control en los ensayos de acumulación de norfloxacin.

#### **4) Selección de Mutantes multirresistentes a partir de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas**

- **Selección de Mutantes multirresistentes a partir de Antibióticos:**

Se parte de cepas sensibles de *E. coli* (PS7, PS11) aisladas de muestras clínicas, que fueron previamente tipificadas y sembradas en medios de cultivos sólidos. Se coge una colonia aislada y se la siembra medio liquido infusión cerebro corazón suplementado con concentraciones suprainhítorias crecientes de los antibióticos (*en este trabajo fueron utilizados: ceftazidima, lomefloxacina, cefotaxima e imipenem*) con los que se realizará la selección de mutantes. Los caldos se incuban a 37 °C entre 24-48 horas. Luego se siembran en placas de Agar MacConkey suplementado con la concentración de antimicrobiano usada para la selección.

Las cepas multirresistentes CazE7, LmfE7 y CazE11, fueron seleccionadas *in vitro* e inicialmente caracterizadas por la Dra. M<sup>a</sup> del Mar Tavío.

- **Selección de Mutantes multirresistentes a partir de fármacos no Antibióticos:**

Se parte de cepas sensibles de *E. coli* (PS7, PS11) a las que previamente se les realiza un estudio de las susceptibilidades mediante pruebas de dilución en agar para conocer el valor inicial de la CMI (concentración inhibitoria mínima) frente a dichos fármacos. Se coge una colonia aislada y se la siembra en tubos conteniendo caldo cerebro corazón, con concentraciones suprainhítorias crecientes de los fármacos no antimicrobianos usados para la selección se cepas mutantes (*en este trabajo fueron utilizados: Salicilato de sodio y Diazepam*). Los tubos se incuban a 37 °C entre 24-48 hs. Luego se repican en placas de Agar Mac Conkey suplementadas con dichos fármacos.

**Frecuencia de selección:**

Las cepas a estudiar se sembraron en el medio líquido infusión de cerebro y corazón, y a las 18-24 horas de incubación se hicieron diluciones seriadas 1/10 en 8 tubos preparados de solución salina fisiológica estéril. De las suspensiones bacterianas resultantes de las diluciones 1/10<sup>6</sup>, 1/10<sup>7</sup> y 1/10<sup>8</sup> se extendieron 100 µl en placas de medio sin agente selectivo con objeto de realizar el recuento de colonias para calcular el número de UFC/ ml presentes en el inóculo origen. Asimismo, y para continuar con la selección, del inóculo origen de 24 horas de incubación se extendieron 100 µl en nuevas placas con una mayor concentración de agente selectivo.

El medio utilizado para las placas fue el medio de agar de Mueller-Hinton. Las colonias que crecieron tanto en el agar con agente selectivo como en el agar sin agente selectivo se contaron a las 24, 48 y 72 horas.

La frecuencia de selección se calculó mediante la relación entre el número de colonias desarrolladas en las placas con agente selectivo y las desarrolladas en las placas sin dicho agente, teniendo en cuenta las diluciones realizadas (*Sanders C. y cols., 1984*).

## 5) Ensayos de inducción de multirresistencia.

Para los ensayos de inducción se utilizaron diferentes fármacos no antibióticos:

- **Salicilato de sodio** (Sigma): Medicamento que disminuye el dolor (analgésico), la inflamación (antiinflamatorio), y la fiebre (antipirético) y es el mejor inductor conocido del operón *marrab*.
- **Propacetamol** (UPSA Media LAB.) es un profármaco del paracetamol, es soluble en agua por lo que se lo utiliza como analgésico vía parenteral justificada en tratamientos post-operatorios, traumatismos agudos, alteraciones gástricas o intestinales (analgésico).
- **Ketorolaco trometamol**: Toradol 30 mg inyectable (Roche), analgésico perteneciente al grupo de los antiinflamatorios no esteroides. Medicamento que disminuye el dolor (analgésico), la inflamación (antiinflamatorio), y la fiebre (antipirético). También se usa para tratar el reuma (antirreumático).
- **Diclofenaco sódico**: Voltarén 75 mg solución inyectable (Novartis), Medicamento que disminuye el dolor (analgésico), la inflamación (antiinflamatorio), y la fiebre (antipirético). También se usa para tratar el reuma (antirreumático).
- **Metamizol magnésico**: Nolotil ampollas solución inyectable (Boehringer Ingelheim). Medicamento que disminuye el dolor (analgésico) y la fiebre (antipirético).
- **Dexametasona**: Fortecortein 40 mg inyectable (Merck), Medicamento que sirve para el tratamiento de alergias, asma, artritis, inflamaciones. También se usa para prevenir el rechazo en el transplante de órganos (corticoide).
- **Haloperidol**: Haloperidol inyectable 1mg/ml (Esteve), Medicamento utilizado para tratar enfermedades nerviosas (antipsicótico).
- **Clorpromacina**: Largactil 40 mg/ml gotas 10 ml (Aventis), Medicamento utilizado para tratar enfermedades nerviosas (antipsicótico).
- **Diazepam**: Valium 10 mg ampollas (Roche) es una Benzodiazepina utilizada para aliviar el nerviosismo o ansiedad (ansiolítico) y facilitar el sueño (hipnótico).
- **Clonazepam**: Rivotril ampollas (Roche), Benzodiazepina utilizada para tratar la epilepsia (antiepiléptico).

- **Fenobarbital:** 4 mg/ml (Bayer), derivado barbitúrico que se utiliza para evitar las convulsiones (anticonvulsivo), para sedar a los pacientes (los ayuda a dormir durante los procedimientos) y para aliviar la ansiedad (ansiolítico).
- **Paraquat:** es un compuesto químico usado como herbicida y es un conocido inductor del operón *soxRS*.
- **Cloruro de sodio** (Sigma): se hace una valoración de la susceptibilidad de la *E. coli* a los fármacos mencionados anteriormente para conocer la concentración inhibitoria mínima (CMI), puesto que para inducir utilizamos concentraciones subinhibitorias de dichos fármacos (de 1/4 a 1/512 del valor de su CMI). Se coge una colonia de la cepa a estudiar y se cultiva en tubos con 5 ml de medio antibiótico N° 3 suplementado con el fármaco y se deja a 37°C durante 24 horas, los dos días siguientes se hacen nuevos pases a medio fresco suplementado con el fármaco en una dilución 1/100. Luego de someter a la bacteria a un continuo crecimiento en concentraciones menores a su CMI se considera que está inducida y a partir de este cultivo estudiaremos la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos, analizaremos el perfil de las proteínas de membrana externa así como valoraremos el incremento en la tolerancia al ciclohexano en comparación con la cepa origen no inducida, técnicas explicadas a continuación.

## 6) Valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos

### - Test de dilución en agar

Esta prueba se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se define como la concentración mínima de un agente antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento del microorganismo que se ensaya.

Las diferentes concentraciones de cada antibiótico empleado se obtuvieron a partir de una solución inicial con una determinada concentración que se puede representar por  $2^n$  ó  $1/2^n$  (siendo  $n$  un número entero). A continuación se realizó una dilución seriada cuyo factor de dilución fue de  $1/2$ . Pero además las placas fueron suplementadas con la concentración del inductor de resistencia.

El agar de Mueller Hinton, una vez esterilizado se dejó enfriar en un baño maría hasta los  $50^\circ\text{C}$ . Entretanto se incorporaron a las placas de Petri estériles las distintas diluciones del antibiótico. Finalmente se distribuyó el medio en dichas placas de cultivo, se dejaron enfriar y solidificar sobre una superficie horizontal nivelada. Una vez solidificado el agar, las placas se guardaron a  $4^\circ\text{C}$ .

Para la preparación de los inóculos se escogieron una o varias colonias iguales de un cultivo de 24 horas en agar de MacConkey y se diluyeron en 5 ml de suero salino estéril, ajustando la turbidez de la solución a la del patrón N° 0,5 de la escala de sulfato de bario de Mc Farland, correspondiendo esta turbidez a un inóculo de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

Las placas de agar con y sin antimicrobiano utilizadas como control fueron inoculadas con el replicador de Steer, depositando en cada uno de los 32 inóculos una cantidad final aproximada de  $5 \times 10^4$  UFC/ ml. Esta técnica permite sembrar varias cepas por placa (20-40), facilitando el estudio simultáneo de la CMI de un gran número de cepas a un antimicrobiano (*Prats, G., 2005*). Las placas se inocularon en orden creciente de concentración de antibiótico. Se siguió el método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (*NCCLS, 2003a; Woods & Washington, 1995*).

## - Test de difusión en agar

Método muy utilizado por la sencillez para el estudio de la sensibilidad de las bacterias. Se basa en la inhibición de crecimiento de la bacteria alrededor de un disco cargado con un antimicrobiano que difunde en medio sólido (*Prats G., 2005*).

Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en la superficie de una placa con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con una cantidad precisa de antibiótico, que difunde casi instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente, se lleva a incubar a 37 °C durante 18 horas (*Prats G., 2005*).

La cepa bajo estudio se aplicó a partir de un cultivo en medio líquido suplementado con la concentración del inductor de resistencia, mediante la técnica de barrido de la placa con un hisopo impregnado en dicho medio líquido.

El microorganismo crece en la superficie de la placa, pero alrededor de los discos se forman halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menor sensibilidad de la bacteria a cada uno de los antibióticos. Se mide el diámetro del halo (expresado en milímetros) y se lleva a tablas que correlacionan los diámetros con la sensibilidad.

El medio de cultivo utilizado fue el agar de Mueller Hinton y se siguió el método recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards (*NCCLS, 2003a*).

Para la preparación de los inóculos se escogieron una o varias colonias iguales de un cultivo de 24 horas en agar de MacConkey y se diluyeron en 5 ml de suero salino estéril, ajustando la turbidez de la solución a la del patrón N° 0,5 de la escala de sulfato de bario de Mc Farland.

Para inocular el agar se utilizó un hisopo estéril humedecido en la suspensión bacteriana, impregnando de forma homogénea todo el agar. Pasados unos 15 minutos se dispusieron los discos de antibiótico y tras unos 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del antibiótico, se incubó durante 16 a 18 horas a 37 °C (*NCCLS, 2003a; Woods G. & Washington J., 1995*).

Se midieron los halos en los que no había crecimiento bacteriano y las medidas se interpretaron de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS (*NCCLS, 2003a*).

- **Método de preparación del 0,5 Standard de Mc Farland:**

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0,5 de la escala de Mc Farland). Preparar dicho estándar agregando 0,5 ml de BaCl<sub>2</sub> 0,048M (1,175% P/V BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10, para el estándar 0,5 de Mc Farland. Una turbidez equivalente al 0,5 de Mc Farland representa aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ ml para bacterias de rápido crecimiento. La estandarización de inóculo es esencial ya que el tamaño de la zona de inhibición es muy dependiente de la densidad del inóculo utilizado. Distribuir en 4-6 ml dentro de tubos similares a los usados para la preparación de los inóculos de las cepas clínicas y mantener guardados a al abrigo de la luz. Inmediatamente después de su preparación, los tubos se deben sellar herméticamente para evitar la evaporación y concentración de la suspensión (*Pasterán F. y cols., 2003*).

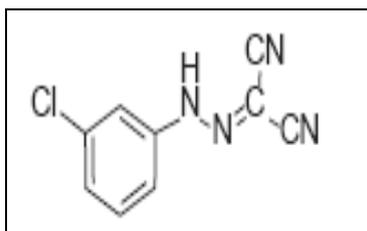
## 7) Valoración de la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos

- **En presencia de inhibidores de los sistemas de eflujo activo:**

La Valoración de la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos se realizó en presencia y en ausencia de los inhibidores de las bombas de eflujo tanto para las cepas origen como para los mutantes seleccionados.

El CCCP (*Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*) reduce el potencial de membrana al disipar la fuerza protón motriz de la membrana citoplasmática, afectando de esta manera a los sistemas activos de expulsión de drogas y como consecuencia se produce una mayor penetración del antimicrobiano a la célula (*Mahamoud A. y cols., 2007, Panja S. y cols., 2006*).

El rango óptimo de actividad del CCCP en *E. coli* es angosto y esta comprendido entre 40-60  $\mu\text{M}$  (*Kinoshita N. y cols., 1984*). Igualmente se midió experimentalmente la mayor concentración del inhibidor que no afecta el crecimiento bacteriano. Esta concentración fue usada en los experimentos. Para ello se añade el agente inhibidor al Mueller Hinton a la concentración deseada (las concentraciones usadas en este trabajo fueron: 50 $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  para CCCP) y se determina la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos por los métodos comentados previamente (método de difusión en agar / método de dilución en agar).



CCCP (*Pagès, 2005*)

- **Valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos en cepas obtenidas tras estimulación de la expresión de la porina F (OmpF) con cloruro de sodio 1,35%**

**- Protocolo de extracción de los extractos de proteínas de membrana externa.**

El primer día se procede a sembrar la cepa a estudiar (que debe ser deficiente en la porina F) en un tubo con 5 ml de medio antibiótico N° 3 y se incuba 24hs a 37°C. Al día siguiente se pasan 50 µl de dicho tubo a 2 tubos con 5 ml del mismo medio fresco, a uno de ellos se le adiciona cloruro de sodio al 1 % P/V y ambos se incuban 24 horas a 37°C.

Al tercer día se hace el último pase a matraz de 500 ml, uno de ellos conteniendo cloruro de sodio al 1%, para ello vertemos los tubos de 5 ml crecidos del pase anterior, al matraz correspondiente. Y se procede a realizar el extracto de proteínas de membrana externa como se explicó anteriormente. Una vez obtenido el extracto se determinó la concentración de proteínas por la técnica de lowry, y se procede a realizar un gel de acrilamida-bisacrilamida para comprobar que dicha cepa gana la porina F. Se la compara con el extracto obtenido en ausencia de cloruro de sodio, y con controles OmpF (+) y OmpF (-).

Además a esta cepa se le realiza la valoración de la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos (cloranfenicol, tetraciclina, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona, imipenem, cefalotina, cefaloridina, norfloxacina y ácido nalidíxico).

## 8) Métodos de obtención de los extractos de proteína de membrana externa e interna a partir de cepas de *E. coli*

- **Método de obtención de los Extractos de proteína de membrana externa (OMP = out membrane protein) e interna (IMP = inner membrana protien):**

La extracción de proteínas de membrana se realizó según el método de Sawai T. y cols. (1982) (*Sawai T. y cols., 1982*) pero con algunas modificaciones que se describen a continuación:

A partir de 1 litro de cultivo bacteriano (en fase exponencial de crecimiento) de cada cepa en medio Antibiótico N° 3, se centrifuga a 4500 r.p.m y se resuspende el Pellet en tris HCl 30mM PH: 8. Posteriormente se rompen las células por medio de sonicación y se las separa de las células enteras por medio de centrifugación a 20.000 r.p.m. Se utiliza una solución de Sarkosyl (N-lauroilsarcosinato sódico) al 2% para solubilizar las membranas citoplasmáticas, permaneciendo insoluble las membranas externas, por medio de centrifugación se separan las proteínas de membrana interna (IMP) presentes en el sobrenadante, mientras que el sedimento contiene los constituyentes de la membrana externa bacteriana (OMP) (*Sawai T. y cols., 1982; Filip C., Fletcher G. y cols., 1973*)

- **Método de obtención de los extractos de proteínas de unión a Penicilina (PBPs) a partir de cepas de *E. coli*:**

Se hacen crecer las cepas a estudiar en 1 litro de medio Antibiótico N° 3, se incuban 5 horas a 37 °C, y se recoge el sedimento por centrifugación resuspendiendo el mismo con buffer fosfato 20mM pH: 7,5-140mM NaCl, se lo sonica y centrifuga para remover los restos de células completas y posteriormente se recuperan las membranas completas por centrifugación. A dicho pellet se lo resuspende en 1ml de buffer fosfato 20mM pH: 7,5-140mM NaCl (*Genshi Zhao y cols., 1999*).

Las PBP se analizaran mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12-12,5 %.

La detección se puede realizar por coloración con una variante del coomasie blue (*imperial<sup>TM</sup> Protein Stain*) o detectarlas por fluorescencia con una penicilina fluorescente llamada Bocilina, para lo cual se siguen diferentes técnicas:

- Tinción con imperial<sup>TM</sup> Protein Stain: se hace una dilución del extracto proteico con agua destilada estéril para un volumen final de 200 µl, al que se le añade Sarkosyl al 2%, y luego por centrifugación se obtiene el sobrenadante que es donde se encuentran las PBPs.

- detección con Bocilina y luz ultravioleta: se hace una dilución del extracto proteico con Bocilina (concentración final 25 µM) posteriormente se añade Sarkosyl al 2%, y luego de centrifugar se obtiene el sobrenadante que es donde se encuentran las PBPs (*Genshi Zhao y cols., 1999*).

## 9) Valoración de la concentración de Proteínas de los Extractos mediante el método de Lowry

En 1951 Lowry comenzó a utilizar el reactivo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de proteínas empleado generalmente para detectar grupos fenólicos. Este reactivo detecta los residuos de tirosina debido a su naturaleza fenólica, aunque su sensibilidad se mejora añadiendo iones de cobre. Para establecer la relación entre la absorbancia y la concentración de proteína se realiza una curva de calibrado con un patrón realizado mediante una dilución seriada y a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

La composición del reactivo de cobre alcalino utilizado en el método de Lowry es la siguiente:

- sulfato cúprico.5H <sub>2</sub> O.....	100 mg/l
- Tartrato sódico.....	1 g/l
- carbonato sódico.....	90 g/l
- hidróxido sódico.....	18 g/l

Luego se preparan las diluciones para realizar la curva de calibración con el patrón Albúmina Bovina. Se hace por duplicado.

Realización:

Se mezclan 500 µl de muestra con 500 µl del reactivo cobre alcalino y se dejan reaccionar durante 10 minutos. Se añade 1,5 ml del reactivo de Folin Ciacoltau al 10%. Agitar y leer al espectrofotómetro a la media hora a 650 nm, llevando el aparato a cero con agua destilada (*Holme D. & Peck H., 1987*).

## 10) Análisis del perfil de proteínas de membrana externa e interna

- **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) es la técnica más efectiva para examinar el perfil polipeptídico de fracciones subcelulares, permite separar las proteínas presentes en una muestra en función de su peso molecular, puesto que el SDS es un detergente aniónico, que se une a las proteínas formando complejos a los que le confiere la misma densidad de carga superficial negativa (Prats G., 2005). Se utilizó una cubeta de electroforesis vertical de Techware. El gel se preparó siguiendo la técnica de Ames (1973), con modificaciones en la composición, mediante una combinación de las descritas por Laemmli (1970) y Neville (1971) (Lugtenberg B. y cols., 1975).

Las soluciones reguladoras de pH diferente (sistema discontinuo) utilizadas para el gel superior y el gel inferior proporcionan una buena resolución. En el gel superior se consigue un rápido movimiento iónico y las proteínas son comprimidas mediante este movimiento en una delgada banda al mismo tiempo que entran en el gel inferior o de separación, en el cual se retarda el movimiento por las propiedades filtrantes del gel.

La separación de las proteínas de membrana tanto externa como interna se llevó a cabo en geles de poliacrilamida a una concentración del 10-12,5% con dodecil sulfato sódico (SDS) (Hancock R.E.W. y cols., 1979). Así como en geles de poliacrilamida a una concentración del 10% SDS, suplementado con diferentes concentraciones de UREA. La polimerización de los geles se llevó a cabo mediante la presencia de persulfato amónico al 10% y TEMED

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente usando una corriente constante de 25 a 30 miliamperios por gel. El paso de corriente se detuvo cuando el frente llegó a 1 cm. del borde inferior del gel.

- **Preparación de las muestras para sembrar en geles de poliacrilamida**

Antes de preparar la muestra a sembrar se debe conocer la concentración de las presente en el extracto, para lo cual se utiliza la técnica de lowry, que se detalla anteriormente.

Cuando se conoce la cantidad de proteína presente, se procede a mezclar 1:1 la muestra (extracto de proteínas) con el buffer muestra, y se calculan los microlitos a cargar en el gel de acuerdo a los microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de proteínas que quisiéramos sembrar. Esta mezcla 1:1 posteriormente se somete a desnaturalización por calor a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos (*Tavío MM. y cols., 1999*).

- Tampón regulador para solubilizar la muestra

(0,125 M Tris-HCl pH: 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol)

Se prepara de la siguiente manera:

- 2 ml de Buffer UP
- 4 ml de SDS al 10%
- 2 ml de glicerol
- 2 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol

Adicionar 0,004% de azul de bromofenol- fraccionar en eppendorf y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Para los geles de proteínas de unión a penicilina (PBPs) se procede a mezclar el sobrenadante proteico con el tampón regulador en relación 1:2 y se calienta a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. Luego se calcula la cantidad de microlitos a cargar en el gel de acuerdo a la cantidad de proteína que necesitemos detectar (*Genshi Zhao y cols., 1999*).

**Patrones de peso molecular:**

- Para los geles de Proteínas de unión a penicilina (PBPs) que serán detectados con Bocilina y luz ultravioleta, se utilizó un peso molecular fluorescente (F-3526 Sigma).

<b>Marcador</b>	<b>Peso molecular Daltons</b>
Beta-galactosidasa	<b>116.000</b>
Albumina	<b>66.000</b>
Alcohol Deshidrogenasa	<b>39.800</b>
Anhidrasa carbónica	<b>29.000</b>
Inhibidor de tripsina	<b>20.100</b>

- Para los demás geles se confecciona un peso molecular con los siguientes componentes (Sigma):

<b>Marcador</b>	<b>Peso molecular Daltons</b>
Albúmina bovina	<b>66.000</b>
Ovalbúmina	<b>45.000</b>
Gliceraldehído-3-P-Deshidrogenasa	<b>36.000</b>
Anhidrasa carbónica	<b>29.000</b>
Tripsinógeno	<b>24.000</b>
Inhibidor de tripsina	<b>20.100</b>
$\alpha$ -lactoalbumina	<b>14.200</b>

## • Métodos de detección de proteínas en geles de Acrilamida

Luego de la electroforesis, el gel se tiñe con coomasie blue, o sales de plata. Las proteínas aparecen como bandas cuya posición relativa en el gel depende de su peso molecular, que puede extrapolarse a partir de los pesos del estándar utilizado.

### Coloración de los geles de acrilamida

#### a) tinción con Coomasie blue:

- El colorante se prepara a 0,125 %
- Esta cantidad se disuelve en la siguiente solución, con los porcentajes correspondientes:
  - 45 % metanol
  - 10 % ácido acético
  - 45 % agua destilada

Una vez colorada se procede a la decoloración del mismo para lo cual se lava el gel con agua del chorro, con cuidado, y se recupera el tinte, porque sirve para otras tinciones.

- El decolorante se prepara de la siguiente manera:
  - 45 % de metanol
  - 10 % de ácido acético
  - 45 % de agua destilada
- Dejar el gel en la solución decolorante.

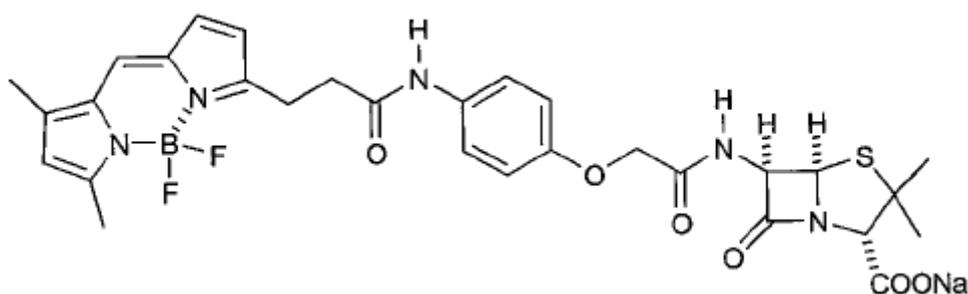
#### b) Tinción con imperial™ Protein Stain:

Este colorante comercial (PIERCE) es un derivado del coomassie R- 250 que sirve para la detección específica de proteínas en geles de poliacrilamida con una sensibilidad de  $\leq 3$  ng.

#### c) Detección por fluorescencia utilizando Bocilina y luz ultravioleta:

▪ La Bocilina (*Molecular Probes, Inc.*) es una penicilina fluorescente derivado de la penicilina V (Fig.1) utilizada para la detección de las proteínas de unión a penicilina (PBPs). Permite la detección de 30 nanogramos (ng) de proteínas bajo luz ultravioleta y de 2 a 4 ng bajo un fluorómetro. Este reactivo es un sólido naranja con un coeficiente de extinción de 68.000 y un máximo de absorción a 504nm. Fluoresce a 511nm y bajo excitación a 504 nm. Para preparar este reactivo se procede a disolver 1mg (vial) en 7,575 ml de agua destilada. Concentración final

de 132  $\mu\text{g/ml}$ . Se guarda a  $-20^\circ\text{C}$  al abrigo de la luz. La Bocilina en este trabajo se utiliza en una concentración final de 25  $\mu\text{M}$ . Los geles de SDS-PAGE serán visualizados por quimioluminiscencia / fluorescencia en un sistema de documentación de geles ChemiDocTM de Bio-Rad (*Genshi Zhao y cols., 1999; Gee Kyle R. y cols., 2001*)



**Fig. 1:** Estructura química de la Bocilina (*Genshi Zhao y cols., 1999*)

## 11) Valoración de la actividad $\beta$ -lactamasa sobre el extracto crudo

- **Obtención del extracto enzimático:**

Los primeros pasos consisten en sembrar la cepa que se va a estudiar, en caldo cerebro corazón (CCC) y realizar una serie de pases en distinta cantidades. Sembrar en un tubo de 5 ml de CCC una colonia de la placa donde esta sembrada la cepa a estudiar incubar a 37 °C durante 24 horas

Los cultivos bacterianos obtenidos después, se diluyeron en medio fresco en proporción 1/100 incubándose durante 5 horas en agitación a 37 °C. Posteriormente se hace una nueva dilución 1/100 en 2 tubos de 25 ml y tras 24 horas de incubación a 37°C se hace el último pase a matraz de 500 ml de CCC para ello vertemos los 2 tubos crecidos del pase anterior, por matraz (A las 2 horas en caso de estar estudiando alguna sustancia le añadimos a uno de los matraces el inductor. Lo marcamos y lo volvemos a poner a 37 °C. Así veremos la diferencia de la cepa sola, es decir sin ninguna sustancia, y de la misma cepa con un inductor). A las 5 horas de incubación se comienza el extracto, se centrifuga a 9.000 r.p.m durante 15 minutos realizando dos lavados con solución tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 5 ml del mismo solución tamponante y se sometieron a sonicación hasta que adquirieron cierta transparencia, manteniendo en todo momento su temperatura a no más de 5°C, luego se centrifuga a 20.000 r.p.m durante 1 hora a 4 °C desechando el sedimento y congelando a -20 °C los sobrenadantes.

- **Valoración de la Actividad Específica de los Extractos Enzimáticos Crudos**

La actividad de las  $\beta$ -lactamasas del extracto crudo fue cuantificada mediante ensayo espectrofotométrico en solución reguladora de fosfato 50 mM, pH 7 y 25 °C. Como sustrato se emplearon bencilpenicilina y cefaloridina. Se prepararon soluciones de los antibióticos a ensayar con solución tampón fosfato sódico 50 mM y pH 7 a las siguientes concentraciones:

Bencilpenicilina      100  $\mu$ M

Cefaloridina          100  $\mu$ M

El grado de hidrólisis se determinó en la porción inicial lineal de la curva de hidrólisis utilizando para la bencilpenicilina una longitud de onda de 230 nm y para la cefaloridina una longitud de onda de 260 nm. La unidad de actividad  $\beta$ -lactamásica se define como la cantidad de enzima que hidroliza un  $\mu$ Mol del antibiótico por minuto a temperatura ambiente y a pH 7. Las actividades  $\beta$ -lactamásicas fueron estandarizadas por miligramos de proteína. La actividad específica de cada extracto enzimático es la media aritmética de al menos tres determinaciones frente a una misma concentración de cada antibiótico (*Amicosante, Oratote y cols., 1988; Marchou, Bellido y cols., 1987; Michel-Briand, Nicolas, y cols. 1992*). Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

## 12) Valoración del incremento en la tolerancia al ciclohexano (CH) en cepas de *E. coli*

- **Ensayo en medio Líquido (caldo LB, glucosa 0,1%, MgSO<sub>4</sub> 10 mM)**

Por medio de esta técnica vamos a valorar el incremento en la tolerancia al ciclohexano, midiendo el aumento de turbidez a 660nm en función del tiempo. Se trabaja con cepas en fase exponencial de crecimiento. En este trabajo vamos a valorar el incremento de la tolerancia al ciclohexano en las cepas de *E. coli* mutantes seleccionadas a partir de antimicrobianos y de fármacos no antimicrobianos y en cepas de *E. coli* inducidas ante diferentes compuestos.

Para ello utilizamos una variación del protocolo en medio líquido propuesto por *Hiroyuki Asako y cols. en 1997*:

### **A) Valoración del incremento en la tolerancia al CH en presencia de una sustancia inductora:**

Para ello se procede a sembrar la cepa de *E. coli* a estudiar en tubo conteniendo 5 ml de Caldo Luria Broth (LB) al cual se lo suplementa con 0,1% de glucosa y 10 mM de MgSO<sub>4</sub> para aumentar la viabilidad de las células ante la presencia de solventes orgánicos. Se incuba 24 horas a 37°C.

Sembrar 50 µl del cultivo crecido en tubos con 5 ml de caldo LB a los que previamente se les añadió la sustancia inductora a probar en diferentes concentraciones. A estos tubos se los marca como primer pase. Se incuban 24 hs a 37°C. Al día siguiente se procede de la misma manera marcando los tubos como segundo pase. Este día también se procede a sembrar en tubo la cepa a estudiar sin inductor y la cepa sensible *E. coli* AG100 que serán utilizadas como controles.

Una vez que la cepa a estudiar ha sido sometida a dos pases previos con la sustancia inductora se procede a medir su tolerancia al ciclohexano.

Se inoculan 50 µl de los tubos del 2º pase y los controles en tubos con 5 ml de caldo LB a los cuales también se le añade el inductor, excepto en los controles y se toma la 1º lectura a 660 nm (lectura a tiempo 0), luego se incuban 3hs a 37 °C, y se realiza la 2º lectura a 660nm (lectura 3 horas). A estos tubos se les adiciona el 10% V/V de ciclohexano en cada uno de los tubos, se tapan para evitar la evaporación del mismo, y se realiza la lectura espectrofotométrica a las 3, 6 y 21 horas posteriores de la 1º lectura (serán las lecturas 6, 9 y 24 horas desde el comienzo).

De manera que podremos comparar el valor del incremento en la tolerancia al ciclohexano en presencia o no de sustancias inductoras y compararlos con los obtenidos de la cepa original sin inducir y de la cepa sensible *E. coli* AG100. Estos ensayos fueron realizados por triplicados.

**B) Valoración del incremento en la tolerancia al CH en ausencia de sustancia inductora:**

Esta técnica se utiliza para comparar la tolerancia al ciclohexano de la cepa mutante seleccionada in vitro o aisladas de muestras clínicas con alguna la cepa sensible original o alguna utilizada como control. Entonces para estos casos no se necesita inducción previa. Se hacen crecer las cepas en caldo LB, se las incuba 24hs a 37°C, y al día siguiente se procede a medir la tolerancia de la cepa al ciclohexano como se describió previamente. Siempre utilizar la cepa sensible *E. coli* AG100 como control.

### 13) Ensayos de Transducción

Plásmido, cepa Fago	propiedades o fenotipo	Fuente o Referencia
MC 4100 1976	F- <i>araD139</i> Δ ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169 rpsL 150</i> <i>relA1 flbB5301 deoC ptsF25 rbsR</i>	<i>Casadaban,</i>
B177	MC4100 <i>zdd-230:: n9 Cm<sup>r</sup> Δ mar</i>	<i>Miller, 1994</i>
MH225	MC4100 <i>malQ7</i> φ ( <i>ompC:: lacZ</i> ) 10-25	<i>Hall, 1979</i>
MH610	MC4100 <i>araD+</i> φ ( <i>ompF:: lacZ</i> ) 16-10	<i>Hall, 1981</i>
MH513	MC4100 <i>araD+</i> φ ( <i>ompF:: lacZ</i> ) 16-13	<i>Hall, 1981</i>
SB221	MC4100 ( <i>pmicB21</i> ) φ ( <i>micF:: lacZ</i> )	<i>Mizuno, 1984</i>

Se obtuvieron lisógenos espontáneos del fago lambda tras hacer crecer las cepas lisógena donante en 3 ml de LB a 37 °C durante 7 horas, posteriormente se tratan a dichos cultivos con cloroformo 1/10 (V/V), y se eliminaron los restos celulares por centrifugación 14.000 r.p.m durante 7 minutos.

Simultáneamente se crecieron las cepas a transducir en Caldo LB adicionado de maltosa al 0,2% por 7 horas.

Luego se mezclaron el sobrenadante del cultivo de cada cepa donante con las cepas receptoras según procedimientos convencionales (*Provence D. & Curtis R., III, 1994*). Finalmente, después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y 1 hora de crecimiento con aireación, las células transductantes fueron aisladas por plaqueo en medio selectivo (agar lambda adicionado de kanamicina) tras 18 a 24 horas de incubación a 37°C. La cepa SB221 fue utilizada como la donante para transducir la fusión *micF::lacZ*.

#### 14) Valoración de la actividad beta-galactosidasa:

Para efectuar los ensayos de beta-galactosidasa los cultivos de 18 horas de incubación de las cepas transducidas se diluyen 1: 100 en caldo LB y se crecen a 37 °C hasta fase exponencial de crecimiento (en este estudio se agrega 5mM de Salicilato de Sodio). Se incuban 4 horas aeróbicamente hasta que las células alcanzan la fase logarítmica.

La actividad beta-galactosidasa se mide adaptando la técnica descrita por Miller (*Miller JH, 1972*), usando como sustrato de la reacción el o-nitrofenil-beta-D-galactósido (ONPG), un compuesto incoloro estructuralmente similar a la lactosa que en presencia de la enzima beta-galactosidasa se rompe en galactosa y o-nitrofenil, un compuesto color amarillo.

##### Realización:

a) Se hace crecer la cepa en caldo LB (con y sin salicilato de sodio) 4 horas aeróbicamente hasta alcanzar la fase logarítmica. Luego se mide la densidad óptica a 630nm.

Se prepara la reacción de la siguiente manera:

- 270 µl de buffer Z
- 30 µl cultivo a)
- 14 µl SDS 0,1 %
- 24 µl cloroformo

b) Mezclar 10 segundos, y dejar en reposo durante 10 minutos, posteriormente se separa la fase acuosa y se añaden 60 µl del sustrato de la reacción (ONPG), se larga el cronómetro y se toman los minutos ( $\Delta T$ ) en que tarda en aparecer el color amarillo incubando la reacción a 30°C.

c) Se corta la reacción con 150 µl de carbonato de sodio 1M y se mide la densidad óptica 405nm.

d) se calculan Las Unidades Miller como:

$$\frac{DO \text{ a } 405\text{nm} \times 10.000}{\Delta T \times DO \text{ a } 630\text{nm}}$$

Para esta técnica se usa el buffer Z cuyos componentes se describen a continuación:

Buffer Z:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16,1 gr.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,5 gr.

KCl 0,75 gr.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,246 gr.

$\beta$ -mercaptoetanol 2,7 ml

Agua destilada csp. 1000ml

pH =7 conservar a 4°C

## 15) Valoración de la acumulación de Norfloxacin. Técnica de bioensayo

Mediante esta técnica se quiere demostrar que la cantidad de norfloxacin acumulada en el espacio intracelular está en función del grado de difusión de dicho fármaco a través de la membrana externa así como de la influencia de las bombas de expulsión activa a través de la membrana interna. El CCCP (*carbonil-cianuro m-clorofenilhidrazona*) es una sustancia que despolariza la pared celular bacteriana mediante la inhibición del gradiente protónico, impidiendo el transporte transmembrana protón dependiente (*Celesk RA. y cols., 1989; Hirai y cols., 1986; Mccaffrey C y cols., 1992*)

- **Técnica de obtención de los sobrenadantes con norfloxacin acumulada por la bacteria**

La técnica utilizada es la empleada por Hirai y cols. en 1986 (*Hirai y cols., 1986*) pero con algunas modificaciones descritas en (*Tavio M.M. et al., 1999*).

Se diluyeron cultivos bacterianos en medio Antibiótico N° 3 de 24 horas con el mismo medio en proporción 1:20 y se incubaron durante 5 horas a 37 °C. A continuación se centrifugaron a 4.000 g durante 20 minutos y el extracto celular se diluyó en solución reguladora de fosfato 50 mM, pH 7 hasta adquirir una absorbancia espectrofotométrica de 1,5 medida a una longitud de onda de 520 nm. (Él numero de células viables fue comprobado mediante dilución seriada y siembra de un inóculo en placas de agar). Cada solución bacteriana obtenida de esta forma se repartió en una triple serie de tubos estériles dispensando 8 ml por tubo. El número de tubos de cada serie debe de coincidir con el número de intervalos de tiempo, que coincidirán con el número de muestras a obtener, durante el tiempo que dure el ensayo. En nuestro caso preparamos cuatro tubos por serie que coincidieron con la separación de las muestras a los 5, 15 y 30 minutos del comienzo del ensayo.

A continuación, a una serie completa, se le añadió CCCP para obtener una concentración final en cada tubo de 50µM y a otra serie completa, se le añadió CCCP para obtener una concentración final en cada tubo de 100 µM. Posteriormente se incubaron en baño maría a 37°C durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió norfloxacin en las tres series de tubos para obtener una concentración final en cada tubo de 10 µg/ml.

A los 5, 15 y 30 minutos de añadir el norfloxacin se tomaron un tubo de cada serie, se mantuvieron a 5°C hasta que se centrifugaron a 4.000 g durante 20 minutos a 5 °C, recogiendo los sedimentos y desechando los sobrenadantes. Estos sedimentos se resuspendieron con 4 ml solución de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7 y se volvieron a centrifugar para realizar un lavado extracelular. Esta operación se realizó tres veces. Cada sedimento final así obtenido fue resuspendido en 200 µl de solución de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7 y se mantuvieron a 100°C durante 10 minutos. A continuación se centrifugaron en una centrífuga de tubos Eppendorf durante 10 minutos recogiendo el sobrenadante con el norfloxacin intracelular acumulado. Se congelaron a -20 °C.

- **Técnica de bioensayo**

Los niveles de norfloxacin en los sobrenadantes se determinaron con la técnica del bioensayo por el método de difusión en agar utilizando la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (Celesk RA. y cols, 1989; González FW. y cols., 1985). Del cultivo de una noche en agar de MacConkey se escogieron 4 ó 5 colonias y se sembraron en 10 ml medio antibiótico N° 3 y se incubaron durante 18 horas. A continuación se realizaron diluciones 1/10 en suero salino hasta obtener 10<sup>8</sup> UFC/ml. A partir de una solución de norfloxacin de 8 µg/ml se hicieron diluciones progresivas con factor de dilución 1/2 con el fin de elaborar una curva patrón. Las tres series de diluciones de norfloxacin se prepararon tanto con CCCP a una concentración final de 50 y 100 µM como sin él. Las placas de Mueller Hinton se sembraron con un hisopo a partir de una dilución de 10<sup>8</sup> UFC/ml de la cepa control. A continuación se dispusieron los discos estériles con 20 µl de cada una de las muestras del sobrenadante intracelular recogido. Se incubaron durante 18 horas a 37°C y tras ese tiempo se midieron los halos de inhibición. Los resultados se procesaron mediante el programa *Graph Pad Inplot* Versión 4.0 de Graph Pad Software Inc. 1992.

## 16) Estudio de los cambios morfológicos.

### Tinción de Gram:

Los posibles cambios morfológicos presentes en las cepas mutantes seleccionadas tanto con antibióticos (*ceftazidima* y *lomefloxacina*) como con fármacos no antibióticos (*salicilato de sodio* y *diazepam*) fueron valorados mediante microscopía óptica utilizando la tinción de Gram.

Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en Gram positivas y gram negativas según la composición de la pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fuscina ó safranina, quedando de color rosado.

### Protocolo:

- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flameando 3 veces aproximadamente)
- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua.
- Agregar lugol y esperar 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Agregar alcohol y acetona y esperar 15 segundos.
- Enjuagar con agua.
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.
- Para observar al microscopio óptico se utiliza un aumento de 100x y aceite de inmersión.

**Examen en fresco:**

- Para la visualización microscópica de los microorganismos se realiza una suspensión densa del germen en solución fisiológica, posteriormente se monta entre portaobjetos y cubre-objetos, para luego mirar al microscopio con aceite de inmersión.

## 17) Estudio del nivel de expresión de *acrB*

- **Extracción del ARN total**

Cultivos de una noche de cada cepa se inocularon (1:100) en medio de Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación hasta que el inóculo alcanzó una densidad óptica de 0.4-0.5 a 600 nm de longitud de onda. El ARN fue aislado usando el reactivo de Ambion para aislamiento de ARN, utilizando un kit de la misma marca para eliminar ADN contaminante en las muestras de ARN. La concentración total de ARN fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm.

- **Transcripción inversa del ARN total y PCR del cADN**

La expresión del gen *acrB* se estudió por transcripción inversa del ARN total y PCR del cADN, usando el gen *gap* control interno de expresión. El ARN total (500 nanogramos) se mezcló con los correspondientes sebaadores y la mezcla de reacción incluyendo la transcriptasa inversa (Superscript II RT-Platinum Taq) de Invitrogen. La mezcla de reacción se incubó primero a 50 °C durante 30 minutos seguido del siguiente programa de PCR: 2 minutos a 94°C, seguido de un número de 21 ciclos para el gen *gap* y de 22 ciclos para *acrB* con las siguientes temperaturas: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55 °C, y 1 minuto a 72°C; la extensión final fue 5 minutos a 72°C. El cADN fue analizado en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con plata.

# RESULTADOS

**Inducción de Fenotipos de  
Multirresistencia en *Escherichia coli*  
AG100 con Fármacos no  
Antimicrobianos**



## 1. Cepas utilizadas:

Para realizar este estudio se utilizó la cepa sensible de *E. coli* AG100 y como control una mutante *marR*, derivada de la anterior, denominada *E. coli* AG112, donadas por S.B Levy, Universidad de Tufts, EE UU.

## 2. Fármacos no antibióticos:

Se emplearon nueve fármacos no antibióticos usados como preanestésicos o como medicación posquirúrgica:

1. Clonazepam
2. Ketorolaco
3. Clorpromazina
4. Dexametasona
5. Haloperidol
6. Metamizol
7. Diclofenaco
8. Fenobarbital
9. Propacetamol

## 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas utilizadas en este estudio:

Tabla N° 1:

Cepa	CMI (µg/ml)					
	TE	CL	FOX	NAL	NOR	CIN(a/b/c)
AG100	2	2	4	2	0,06	127/206/210
AG112	16	16	32	16	0,25	35/253/253

*Antibióticos: TE: tetraciclina, CL: cloranfenicol, FOX: cefoxitina, NOR: norfloxacin. CIN: Concentración Intracelular de Norfloxacin en nanogramos/ mg peso seco celular (a), CIN cuando la fuerza protón motriz es disipada por 50 µM (b) y 100 µM (c) de carbonil cianuro clorofenil hidrazona (CCCP)*

#### **4. Efecto de los fármacos en la susceptibilidad de *E. coli* AG100 y en la acumulación intracelular de norfloxacina:**

- a. Concentración Mínima Inhibitoria de tetraciclina (TE), cloranfenicol (CL), cefoxitina (FOX), ácido nalidíxico (NAL), norfloxacina (NOR) en *E. coli* AG100 en presencia de 1/128, 1/64, 1/8, 1/4 de la CMI de los compuestos antes mencionados.**
- b. Concentración Intracelular de Norfloxacina en presencia de 1/4 de las CMIs de los fármacos ensayados en la cepa AG100.**

Tabla 2

- DCMI: concentración mínima inhibitoria de cada droga usada como inductor en la cepa AG100, expresado en mM.
- Rango CP o CP: rango de concentración en plasma en mM asumiendo el 100% de biodisponibilidad para un adulto con un volumen de distribución de 3 litros (volumen de plasma correspondiente a un adulto de 70 kilogramos) para cada medicamento probado.
- CIN: Concentración intracelular de norfloxacina en *nanogramos/mg peso seco celular* (a), CIN cuando la fuerza protón motriz es disipada por 50  $\mu$ M (b) y 100  $\mu$ M (c) de carbonil cianuro clorofenil hidrazona (CCCP),
- Antibióticos: TE: tetraciclina, CL: cloranfenicol, FOX: cefoxitina, NOR: norfloxacina.
- EC: Equivalencia de la concentración de droga usada como inductor en términos de 1/128, 1/64, 1/8, 1/4 de la DCMI de los compuestos antes mencionados

**Tabla N° 2**

<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CIN a/b/c</b>
<b>Salicilato</b>	20	2,1-8,8	1/4	16	32	32	32	0,5	12/31/49
			1/8	16	32	32	16	0,5	
			1/64	4	2	8	8	0,12	
			1/128	4	2	8	2	0,12	
<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CIN a/b/c</b>
<b>Propacetamol</b>	40	2.1-8,8	1/4	8	16	16	32	2	39/88/88
			1/8	4	8	8	8	0,5	
			1/64	2	4	4	2	0,06	
			1/128	2	2	4	2	0,06	
<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CIN a/b/c</b>
<b>Diclofenaco</b>	4	0,03-0,17	1/4	16	4	32	32	0,5	30/70/70
			1/8	16	4	16	16	0,25	
			1/64	4	4	4	4	0,12	
			1/128	2	2	4	2	0,06	

<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CIN a/b/c</b>
<b>Ketorolaco</b>	16	0,02-0,1	1/4	64	4	32	32	2	24/49/55
			1/8	64	4	16	32	1	
			1/64	4	2	4	8	0,25	
			1/128	2	2	4	2	0,06	
<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CIN a/b/c</b>
<b>Metamizol</b>	640	4.3-8,8	1/4	128	8	32	32	2	30/60/60
			1/8	64	8	16	32	2	
			1/64	8	4	8	8	1	
			1/128	8	4	8	8	0,12	
<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CIN a/b/c</b>
<b>Dexametasona</b>	5	$(0,3-13)10^{-2}$	1/4	4	8	32	16	2	13/31/39
			1/8	4	4	16	8	0,5	
			1/64	2	4	8	4	0,25	
			1/128	2	4	8	4	0,25	

<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CINa/b/c</b>
<b>Fenobarbital</b>	20	0,03-0,8	1/4	16	4	16	16	0,25	23/159/159
			1/8	16	4	16	8	0,25	
			1/64	2	2	8	4	0,12	
			1/128	2	2	4	2	0,06	
<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CINa/b/c</b>
<b>Clorpromazina</b>	0,25	$(8-21) 10^{-2}$	1/4	16	4	16	16	0,25	39/99/99
			1/8	8	4	16	16	0,25	
			1/64	2	2	8	8	0,12	
			1/128	2	2	4	2	0,06	
<b>CMI ( µg/ml)</b>									
<b>Droga</b>	<b>CMI</b>	<b>CP</b>	<b>EC</b>	<b>TE</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>CINa/b/c</b>
<b>Clonazepam</b>	0,25	$(1-25) 10^{-3}$	1/4	4	4	16	16	0,25	15/31/39
			1/8	4	4	8	16	0,25	
			1/64	2	2	4	8	0,12	
			1/128	2	2	4	2	0,06	

CMI ( µg/ml)									
Droga	CMI	CP	EC	TE	CL	FOX	NAL	NOR	CIN a/b/c
Haloperidol	0,4	(0,3-3) 10 <sup>-3</sup>	1/4	16	32	32	32	0,5	27/62/62
			1/8	8	4	16	8	0,25	
			1/64	4	2	4	2	0,06	
			1/128	2	2	4	2	0,06	

**Tabla N° 3:** Efecto del CCCP en las CMI de los antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ ) inducidas por 1/4 de las CMI de los fármacos en la cepa AG100, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI°) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  CCCP (CMI+).

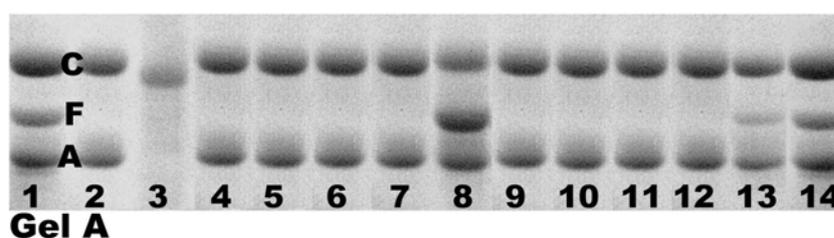
<b>Cociente CMI°/ CMI +</b>					
<b>1/4 CMI fármaco</b>	<b>NAL</b>	<b>NOR</b>	<b>FOX</b>	<b>CL</b>	<b>TE</b>
<b>Salicilato</b>	4	8	4	4	4
<b>Propacetamol</b>	4	4	2	2	2
<b>Diclofenaco</b>	4	8	2	4	4
<b>Ketorolaco</b>	4	4	2	2	4
<b>Metamizol</b>	8	4	4	4	4
<b>Dexametazona</b>	4	8	2	2	4
<b>Fenobarbital</b>	4	4	4	2	2
<b>Clorpromazina</b>	4	4	4	2	2
<b>Clonazepam</b>	8	4	2	2	2
<b>Haloperidol</b>	2	4	2	2	4

**Tabla N° 4:** Efecto del CCCP en las CMI<sub>s</sub> de los antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ ) inducidas por 1/128 de las CMI<sub>s</sub> de los fármacos, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI°) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  CCCP (CMI+).

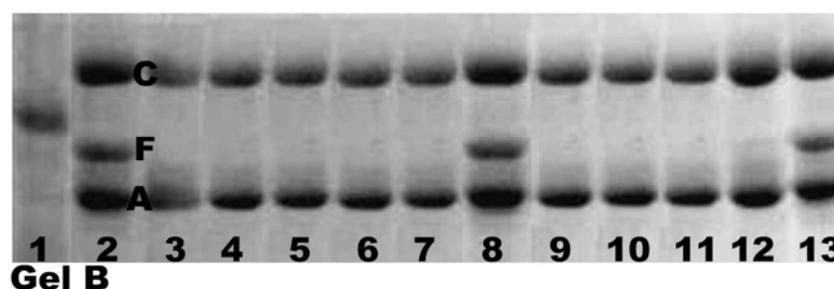
1/128 CMI <sub>s</sub> fármacos	Cociente CMI°/ CMI +				
	NAL	NOR	FOX	CL	TE
Salicilato	2	4	2	2	2
Propacetamol	1	2	1	1	1
Diclofenaco	1	1	1	1	2
Ketorolaco	1	1	1	1	1
Metimazol	2	4	2	2	2
Dexametazona	2	4	2	2	2
Fenobarbital	2	1	1	1	1
Clorpromazina	1	1	1	1	1
Clonazepam	1	2	1	1	1
Haloperidol	1	1	1	1	1

## 5. Análisis de la expresión de la porina F en *E. coli* AG100 bajo la inducción con fármacos

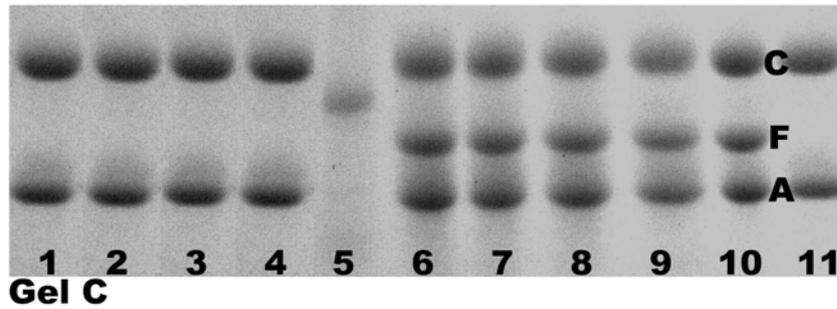
**Figura N° 1:** Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa en la cepa AG100 inducida con los diferentes fármacos no antimicrobianos en gel de poliacrilamida al 9% suplementado con SDS. Tinción: Coomassie Blue R-250



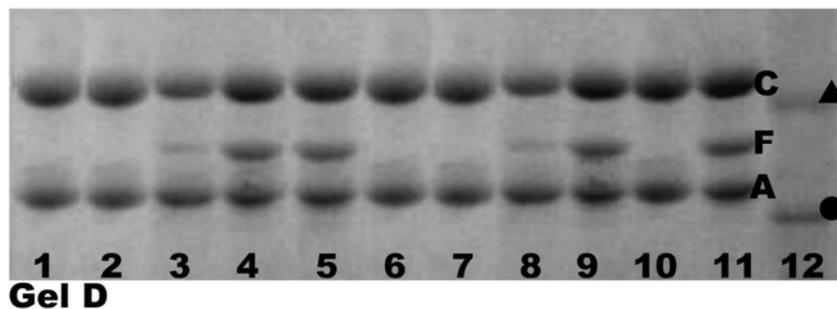
**Gel A:** Efecto del Propacetamol y Salicilato Sódico en la expresión de las proteínas de membrana externa: línea 1: *E. coli* AG100, línea 2: *E. coli* AG112, línea 3: PM (ovalbúmina: 45 kDa), línea 4 a 8: *E. coli* AG100 con 10, 5, 2.5, 1.25 y 0,625 mM Propacetamol, línea 9 a 14: *E. coli* AG100 con 5, 2,5, 1,25, 0,312, 0,156 y 0,078 mM de Salicilato Sódico. C: OmpC; F: OmpF; A: OmpA.



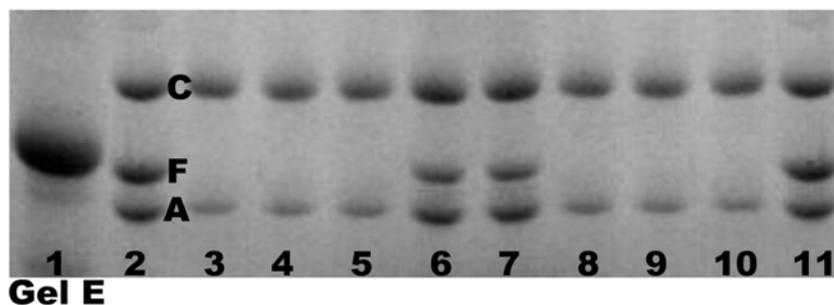
**Gel B.** Efecto de Clorpromazina y Clonazepam en la expresión de las proteínas de membrana externa: línea 1: PM (ovalbúmina 45 kDa); línea 2: *E. coli* AG100, línea 3: *E. coli* AG112; línea 4 a 8: 0,0625, 0,0312, 0,0156, 0,0078 y 0,0039 mM Clorpromazina; línea 9 a 13: 0,0625, 0,0312, 0,0156, 0,0078 y 0,0039 mM de Clonazepam. C: OmpC; F: OmpF; A: OmpA.



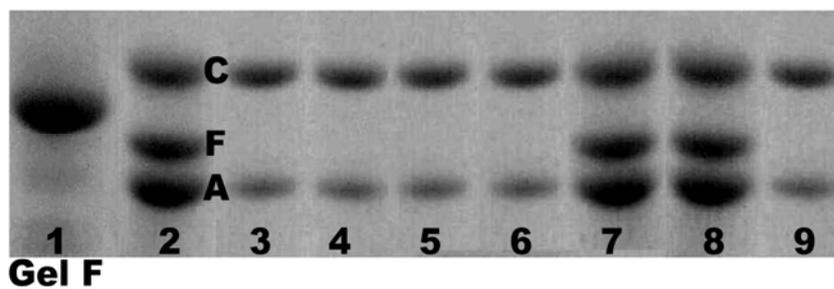
**Gel C. Efecto de Propacetamol, Fenobarbital y Clonazepam en la expresión de las proteínas de membrana externa: línea 1 a 4:** *E. coli* AG100 con 5, 2,5, 1,25 y 0,625 mM de Fenobarbital; **línea 5:** PM ovalbúmina (45 kDa); **línea 6 a 7:** *E. coli* AG100 con 0,312 y 0,156 mM Fenobarbital, **línea 8:** *E. coli* AG100 con 0,312 Propacetamol; **línea 9:** *E. coli* AG100 con 0,0019mM de Clonazepam; **línea 10:** *E. coli* AG100; **línea 11:** *E. coli* AG112.  
**C:** OmpC; **F:** OmpF; **A:** OmpA



**Gel D. Efecto de la Dexametasona y Meamizol en la expresión de las proteínas de membrana externa: Línea 1 a 5:** *E. coli* AG100 con 1,25, 0,078, 0,039, 0,019 y 0,0097 mM Dexametasona; **Líneas 6 a 9:** *E. coli* AG100 con 160, 10, 5 y 2,5 mM de Metamizol; **Línea 10:** *E. coli* AG112; **Línea 11:** *E. coli* AG100; **Línea 12:** PM ovalbumin (45 kDa) y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (36 kDa). **C:** OmpC; **F:** OmpF; **A:** OmpA.

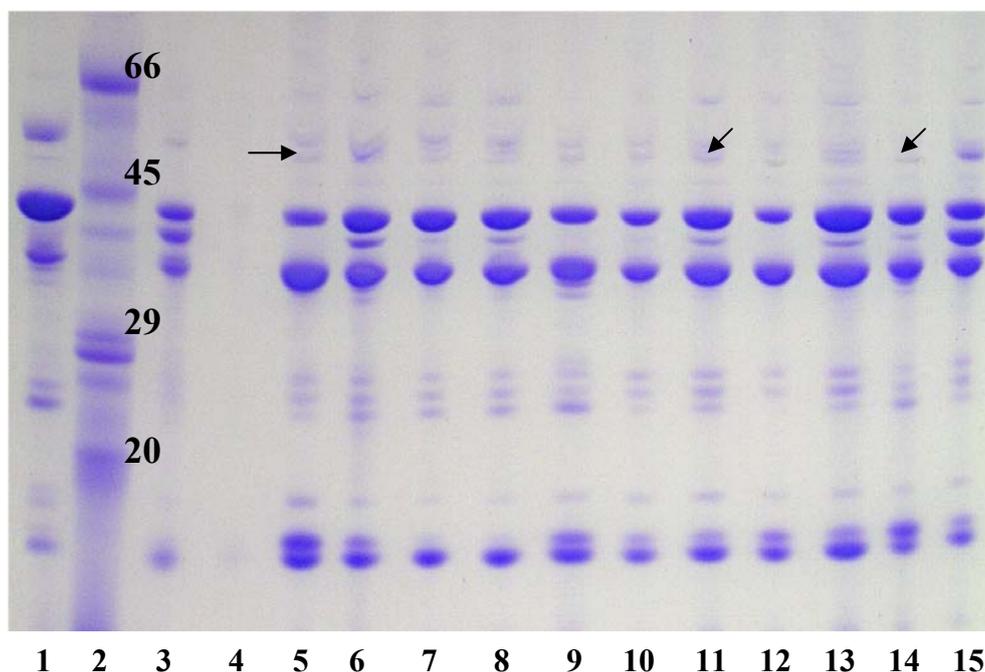


**Gel E. Efecto del Ketorolaco y Haloperidol en la expresión de las proteínas de membrana externa:** Línea 1: PM ovalbumina (45 kDa); línea 2: *E. coli* AG100; Línea 3: *E. coli* AG112; Líneas 4 a 7: *E. coli* AG100 con 4, 0,25, 0,125 y 0,0625 mM Ketorolaco; líneas 8 a 11: *E. coli* AG100 con 0,1, 0,05, 0,025 y 0,0125 mM Haloperidol; C: OmpC; F: OmpF; A: OmpA



**Gel F: Efecto del Diclofenaco en la expresión de las proteínas de membrana externa:** Línea 1: PM ovalbumin (45 kDa); Línea 2: *E. coli* AG100, Línea 3 a 8: *E. coli* AG100 con 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,031 mM Diclofenaco; Línea 9: *E. coli* AG112. C: OmpC; F: OmpF; A: OmpA

**6. Análisis de la expresión de TolC en la membrana externa de la cepa *E. coli* AG100 bajo inducción con concentraciones subinhibitorias de los fármacos (Figuras 2 y 3)**



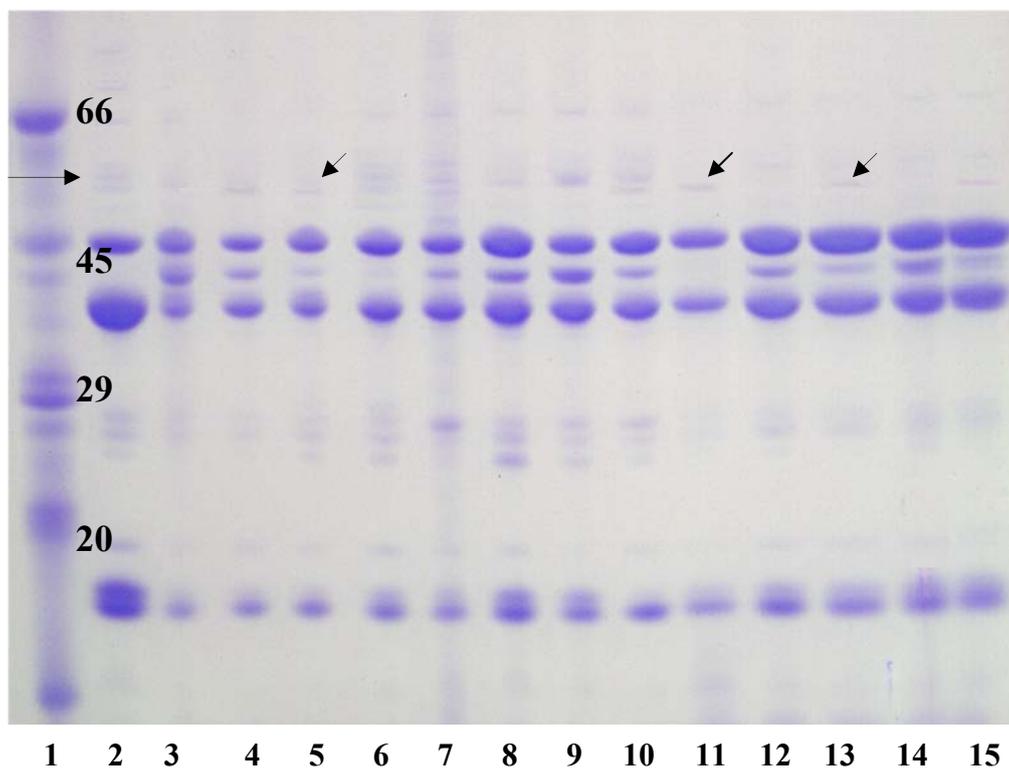
**Figura N° 2:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana externa en gel de poliacrilamida al 12,5 % + 4 M urea

- Líneas:*
1. AG112
  2. PM
  3. AG100
  4. Buffer de la muestra
  5. Salicilato 5 mM
  6. Salicilato 0,5 mM
  7. Dexametasona 0,32 mM
  8. Dexametasona 0,16 mM
  9. Diazepam 0,25 mM
  10. Diazepam 0,12 mM
  11. Diazepam 0,06 mM
  12. Fenobarbital 5 mM
  13. Fenobarbital 1,25 mM

14. Haloperidol 0,1 mM
15. Haloperidol 0,025 mM

**Tinción:** Kit de Tinción Imperial

**PM,** Marcador de peso molecular en kDa: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).



**Figura N° 3:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana externa en gel de poliacrilamida al 12,5 % + 4 M urea

*Líneas:*

1. PM
2. AG100 + 5 mM SA
3. AG100
4. Ketorolaco 0,25 mM
5. Ketorolaco 1 mM
6. Ketorolaco 4 mM
7. Propacetamol 1.25 mM
8. Clonazepam 0,0005 mM
9. Clonazepam 0,0019 mM
10. Clonazepam 0,0078 mM
11. Clonazepam 0,0625 mM
12. Metamizol 5 mM

13. Metamizol 2,5 mM

14. Diclofenaco 0,031 mM

15. Diclofenaco 0,25 mM

**Tinción:** Kit de Tinción Imperial

**PM,** Marcador de peso molecular en kDa: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).

## 7. Análisis de la tolerancia al ciclohexano en presencia de los diferentes fármacos:

Tablas 4-11 y Figuras 3-10

- EC: Equivalencia de la concentración de droga usada como inductor en términos de 1/4-1/512 de la CMI del fármaco en la cepa AG100
- C: Concentración del inductor expresada en mM
- CH: Ciclohexano
- El cálculo del incremento en la tolerancia al CH resulta de:
  1. Absorbancia de la cepa a las 3 horas de incubación a 37 °C en el medio de cultivo en ausencia de ciclohexano: Abs. 3 hs
  2. Absorbancia de la cepa a las 6 horas de incubación a 37 °C (3 horas posteriores del agregado de 10% de ciclohexano): Abs. 6 hs
  3. Absorbancia de la cepa a las 9 horas de incubación a 37 °C (6 horas posteriores del agregado de 10% de ciclohexano): Abs. 9 hs
  4. Absorbancia de la cepa a las 24 horas de incubación a 37 °C (24 horas posteriores del agregado de 10% de ciclohexano): Abs. 24 hs

Incremento tolerancia al ciclohexano a las 6 horas:

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs. 6 horas}}{(\text{Abs. 3hs})}$$

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs. 9 horas}}{(\text{Abs. 3hs})}$$

- Los gráficos expresan los incrementos obtenidos en función del tiempo: 6 hs, 9 hs y 24 horas posteriores al agregado del CH al medio de cultivo

Tabla N° 5

Metamizol CMI: 640 mM				
EC	C en mM	Incremento en la Tolerancia al CH		
		6 horas	9 horas	24 horas
1/4	160mM	2,5	2,6	2,8
1/8	80mM	2,4	2,6	2,7
1/16	40mM	2,4	2,5	2,8
1/32	20mM	2,3	2,4	2,4
1/64	10mM	2,3	2,3	2,3
<b>1/128</b>	5mM	1,5	1,7	1,8
1/256	2,5mM	1,1	1,1	1
1/512	1,25mM	1,1	1,1	1
AG100 ( sin inductor)		1,0	1,1	1,1

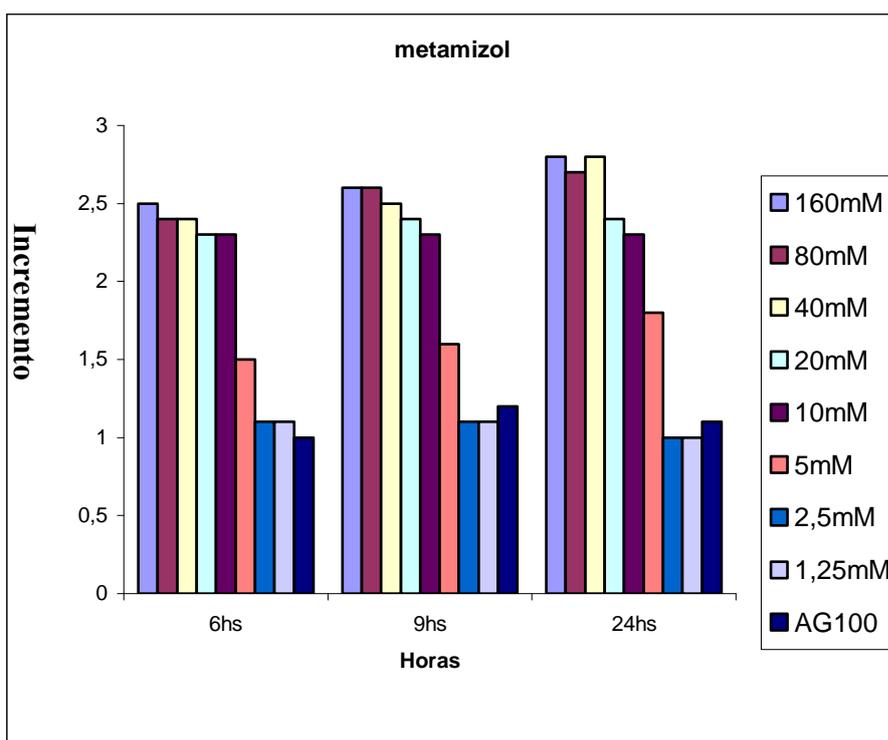


Figura N° 4

Tabla N° 6

Diclofenaco CMI: 4 mM				
EC	C en mM	Incremento en la Tolerancia al CH		
		6 horas	9 horas	24 hs
1/4	1mM	3,3	3,4	3,2
1/8	0,5mM	2,8	3,0	2,9
1/16	0,25mM	2,4	2,3	2,4
1/32	0,125mM	1,7	1,5	1,6
1/64	0,06mM	1,5	1,6	1,5
<b>1/128</b>	0,03mM	1,3	1,4	1,3
1/256	0,015mM	1,0	1,1	1,0
1/512	0,007mM	1,0	1,1	1,0
AG100 ( sin inductor)		1,0	1,1	1,2

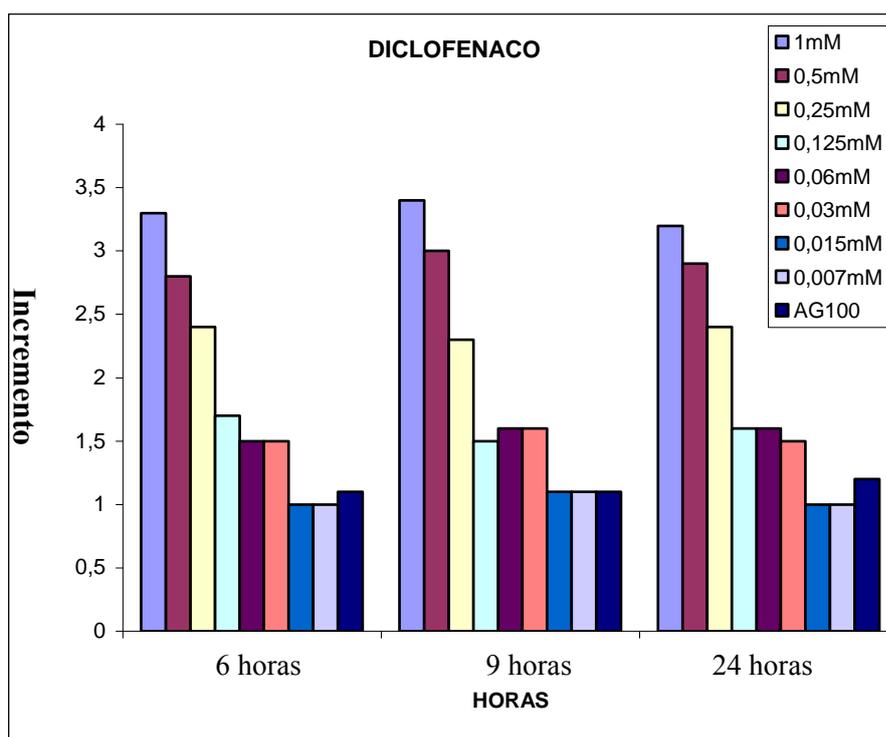
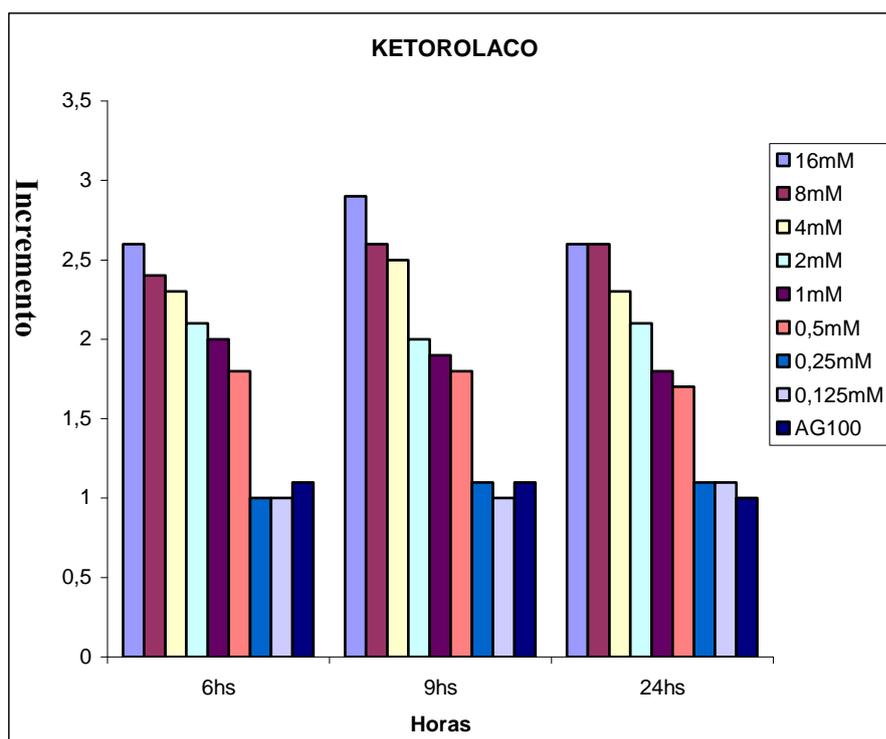


Figura N° 5

**Tabla N° 7**

<b>Ketorolaco CMI: 16 mM</b>				
		<b>Incremento de la Tolerancia al CH</b>		
<b>EC</b>	<b>C en mM</b>	<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>	<b>24 hs</b>
1/4	16mM	2,6	2,9	2,6
1/8	8mM	2,4	2,6	2,6
1/16	4mM	2,3	2,5	2,3
1/32	2mM	2,1	2,0	2,1
1/64	1mM	2,0	1,9	1,8
<b>1/128</b>	0,5mM	1,6	1,7	1,6
1/256	0,25mM	1,0	1,1	1,1
1/512	0,125mM	1,0	1,0	1,1
AG100 ( sin inductor)		1,1	1,1	1,0



**Figura N° 6**

Tabla N° 8

Haloperidol CMI: 0,4 mM				
EC	C en mM	Incremento de la Tolerancia al CH		
		6 horas	9 horas	24 hs
1/4	0,1mM	2,4	2,4	2,7
1/8	0,05mM	2,4	2,4	2,7
1/16	0,025mM	2,3	2,4	2,5
1/32	0,0125mM	2,2	2,4	2,2
<b>1/64</b>	0,06mM	2	2,2	2,2
<b>1/128</b>	0,03mM	1,2	1,3	1,5
1/256	0,015mM	1,2	1,2	1,2
1/512	0,008mM	1	1,1	1
AG100 ( sin inductor)		1,2	1,2	1,2

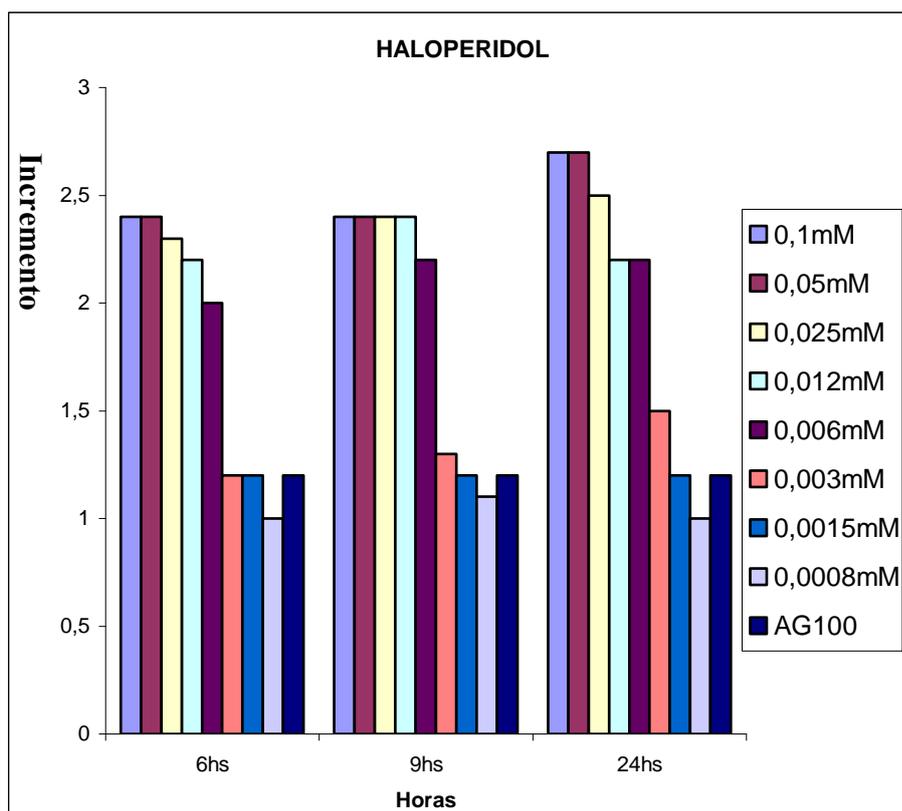


Figura N° 7

Tabla N° 9

Clorpromazina CMI: 0,25 mM				
EC	C en mM	Incremento de la Tolerancia al CH		
		6 horas	9 horas	24 horas
1/4	0,0625mM	2,7	2,9	3,2
1/8	0,03mM	2,6	2,9	2,9
1/16	0,0015mM	2,6	2,8	2,9
1/32	0,0008mM	2,5	2,8	2,8
1/64	0,0004mM	2,4	2,7	2,6
<b>1/128</b>	<b>0,0002mM</b>	<b>2,0</b>	<b>1,8</b>	<b>1,9</b>
1/256	0,0001mM	1	1,1	1,1
1/512	0,00005mM	1	1,1	1,1
AG100 ( sin inductor)		1,2	1,2	1,2

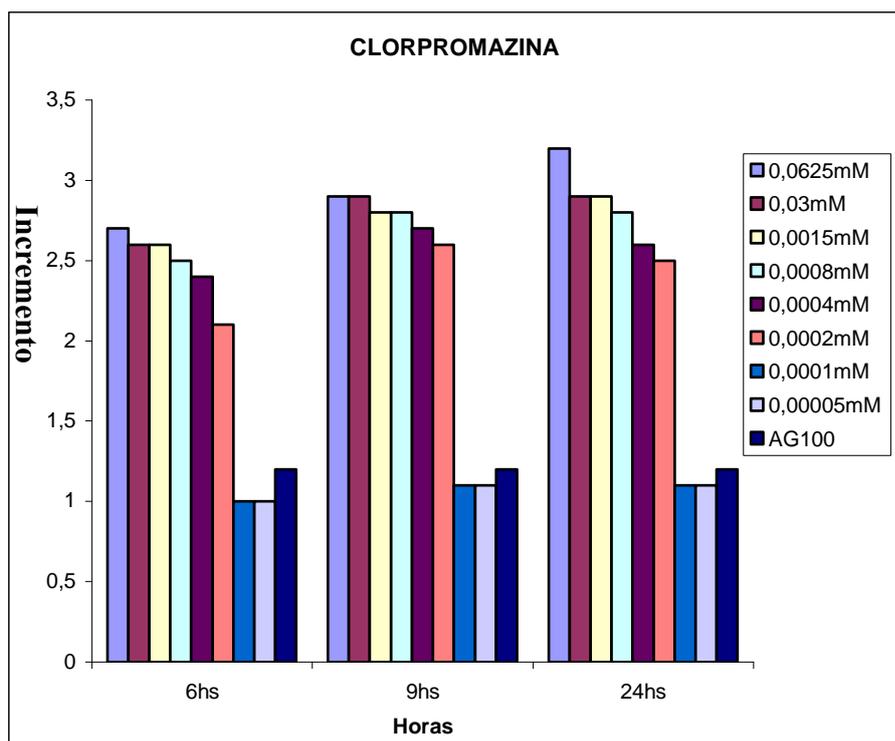


Figura N° 8

Tabla N° 10

Clonazepam CMI: 0,25 mM				
EC	C en mM	Incremento de la Tolerancia al CH		
		6 horas	9 horas	24 horas
1/4	0,0625mM	2,7	2,8	2,8
1/8	0,03mM	2,7	2,8	2,6
1/16	0,0015mM	2,6	2,7	2,5
1/32	0,0008mM	2,6	2,5	2,5
1/64	0,0004mM	2,5	2,3	2,2
<b>1/128</b>	<b>0,0002mM</b>	<b>2,1</b>	<b>2,0</b>	<b>1,8</b>
1/256	0,0001mM	1,5	1,4	1,3
1/512	0,00005mM	1,1	1	1,1
AG100 ( sin inductor)		1,2	1,3	1,3

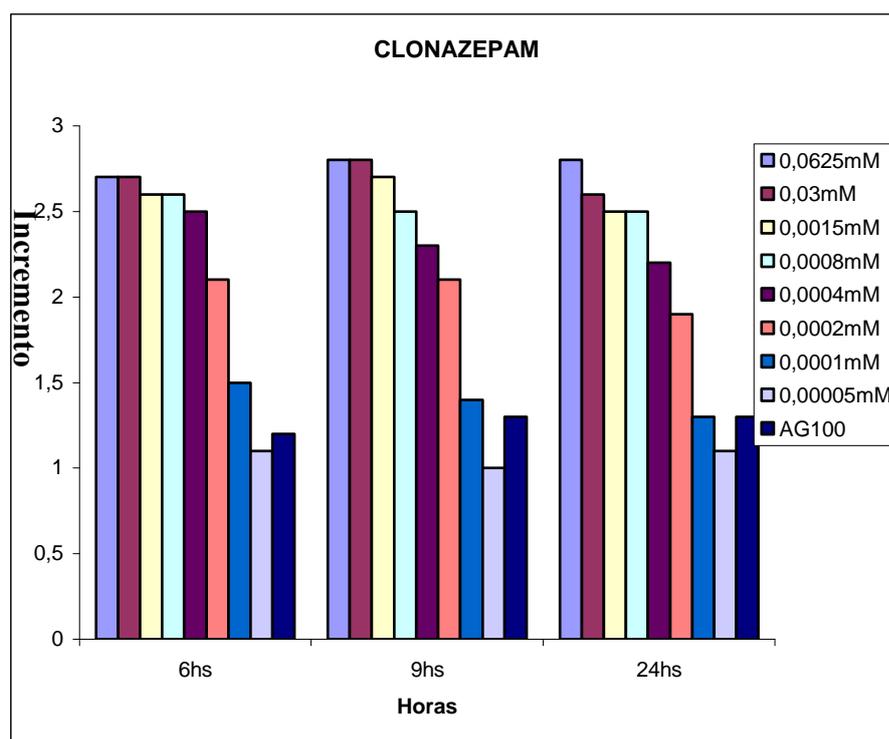
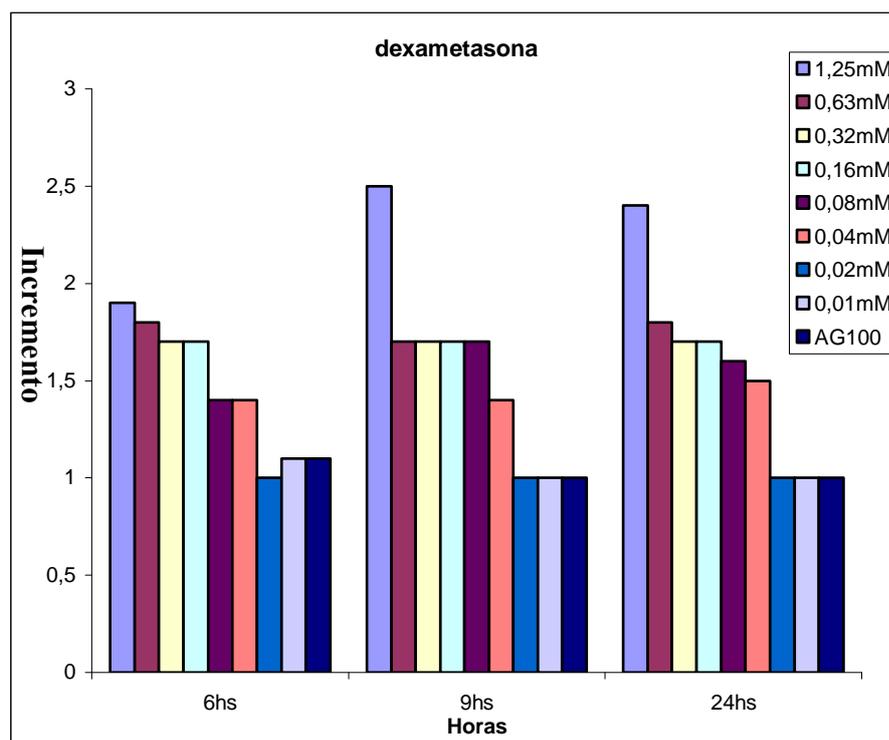


Figura N° 9

**Tabla N° 11**

<b>Dexametasona CMI: 5 mM</b>				
<b>EC</b>	<b>C en mM</b>	<b>Incremento de la Tolerancia al CH</b>		
		<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>	<b>24 horas</b>
1/4	1,25mM	1,9	2,5	2,4
1/8	0,63mM	1,8	1,7	1,8
1/16	0,32mM	1,7	1,7	1,7
1/32	0,16mM	1,7	1,7	1,7
1/64	0,08mM	1,6	1,8	1,8
<b>1/128</b>	0,04mM	1,5	1,7	1,6
1/256	0,02mM	1	1	1
1/512	0,01mM	1,1	1	1
AG100 ( sin inductor)		1,1	1	1



**Figura N° 10**

Tabla N° 12

Diazepam CMI: 0,25 mM				
EC	C en mM	Incremento en la Tolerancia al CH		
		6 horas	9 horas	24 horas
1/4	0,063mM	2,7	2,9	2,9
1/8	0,032mM	2,7	2,8	2,7
1/16	0,016mM	2,6	2,7	2,6
1/32	0,008mM	2,5	2,2	2,5
1/64	0,004mM	2,2	2,2	1,9
<b>1/128</b>	0,002mM	1,7	1,7	1,5
1/256	0,001mM	1,3	1,1	1,2
1/512	0,0005mM	1,2	1	1,1
AG100 ( sin inductor)		1,2	1,1	1,2

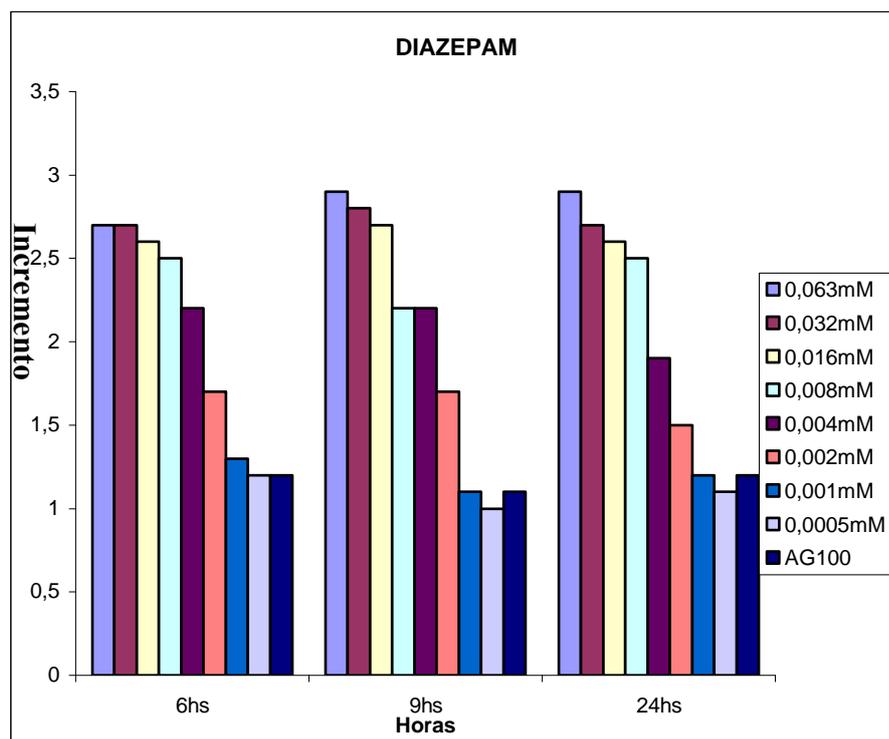


Figura N° 11

**8. Valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ ) en *E. coli* AG100 en presencia de Paraquat y Cloruro de sodio:**

Tablas 13 y 14

**Tabla N° 13.** Valoración del efecto de diferentes concentraciones de Paraquat

<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>					
<b>[Paraquat] mM</b>	<b>NOR</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>TE</b>
0	0,06	2	4	2	2
0,4	1	64	32	32	64
0,2	1	32	32	16	64
0,1	1	32	16	16	32
0,05	0,5	32	16	16	16
0,025	0,5	16	16	16	8
0,0125	0,5	16	8	8	8
0,00625	0,25	8	8	8	4
0,00312	0,12	2	4	2	2
0,0016	0,06	2	4	2	2

*Concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los antimicrobianos: NOR: norfloxacin, CL: cloranfenicol, FOX: cefoxitina, NA: ácido nalidixico, TE: tetraciclina en la cepa *E. coli* AG100 inducida con diferentes concentraciones en mM de paraquat*

**Tabla N° 14.** Efecto de diferentes concentraciones de NaCl en la sensibilidad de la cepa AG100

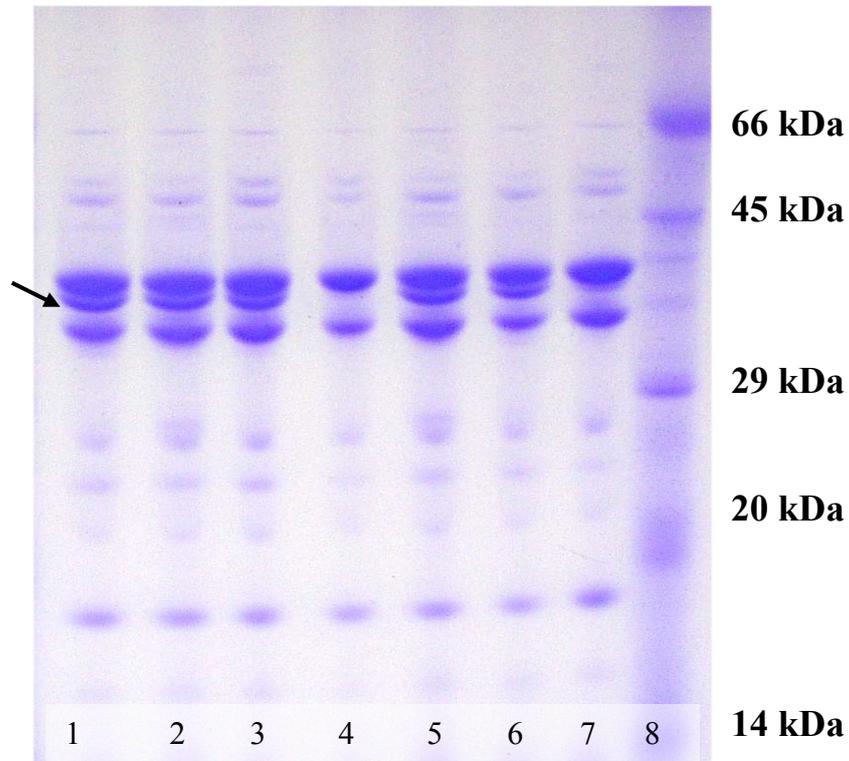
<b>[NaCl] mM*</b>	<b>NOR</b>	<b>CL</b>	<b>FOX</b>	<b>NAL</b>	<b>TE</b>
0	0,06	2	4	2	2
685	1	32	32	16	32
343	1	32	32	16	16
171,5	0,5	32	16	16	8
85,5	0,5	16	16	4	8
42,8	0,5	8	8	4	8
21,4	0,5	8	8	4	4
10,7	0,25	4	8	4	4
5,3	0,12	2	4	2	2
2,7	0,06	2	4	2	2

*Concentración inhibitoria mínima (µg/ml) de los antimicrobianos: NOR: norfloxacin, CL: cloranfenicol, FOX: ceftioxitina, NA: ácido nalidíxico, TE: tetraciclina en la cepa E. coli AG100 inducida con diferentes concentraciones de cloruro de sodio.*

\* [NaCl] en mM: añadido al medio de cultivo

## 9. Perfil de proteínas de membrana externa bajo la inducción con diferentes concentraciones de NaCl y Paraquat:

Figura 12



**Figura N° 12:** Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa en la cepa AG100 inducida con diferentes concentraciones de cloruro de sodio y paraquat en gel de poliacrilamida al 12,5 % suplementado con SDS y 4 M urea.

Líneas:

1. AG100
2. + NaCl 0,016%
3. + NaCl 0,06%
4. + NaCl 1%
5. + Paraquat 25mM
6. + Paraquat 50mM
7. + Paraquat 100mM
8. PM

Tinción: Kit de Tinción Imperial

## 10. Valoración del efecto del Salicilato Sódico, Paraquat y NaCl en la Tolerancia al Ciclohexano:

Tablas 15-17 y Figuras 13-15

En *E. coli* el salicilato desreprime la expresión del operón *marRAB* e incrementa la resistencia a diversos antimicrobianos y la tolerancia a los solventes orgánicos como el ciclohexano a través de la sobre-expresión del activador transcripcional MarA (*Gioliodori A. y cols., 2007*). Por tanto, como punto de comparación se valoró el incremento en la tolerancia al ciclohexano en presencia de salicilato de sodio en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/512 de la CMI utilizando la cepa *E. coli* AG100.

- EC: Equivalencia de la concentración de droga usada como inductor en términos de 1/4-1/512 de la CMI del fármaco en la cepa AG100
- C: Concentración del inductor expresada en mM
- CH: Ciclohexano

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas} \\ (3, 6 \text{ y } 24 \text{ horas posteriores al CH})}{(\text{Abs. 3hs}) \\ (\text{Absorbancia en ausencia de CH})}$$

Tabla N° 15

Salicilato de sodio CMI: 20 mM				
EC	C en mM	Incremento en la Tolerancia al CH		
		6hs	9hs	24hs
1/4	5mM	3,8	4,5	3,8
1/8	2,5mM	2,2	3	3,7
1/16	1,25mM	1,7	2,1	3,2
1/32	0,63mM	1,8	1,9	2,6
1/64	0,32mM	1,6	1,7	2,1
<b>1/128</b>	0,16mM	1,6	1,6	1,7
1/256	0,08mM	1	1	1
1/512	0,04mM	1	1,1	1
AG100 ( sin inductor)		1,1	1,1	1,1

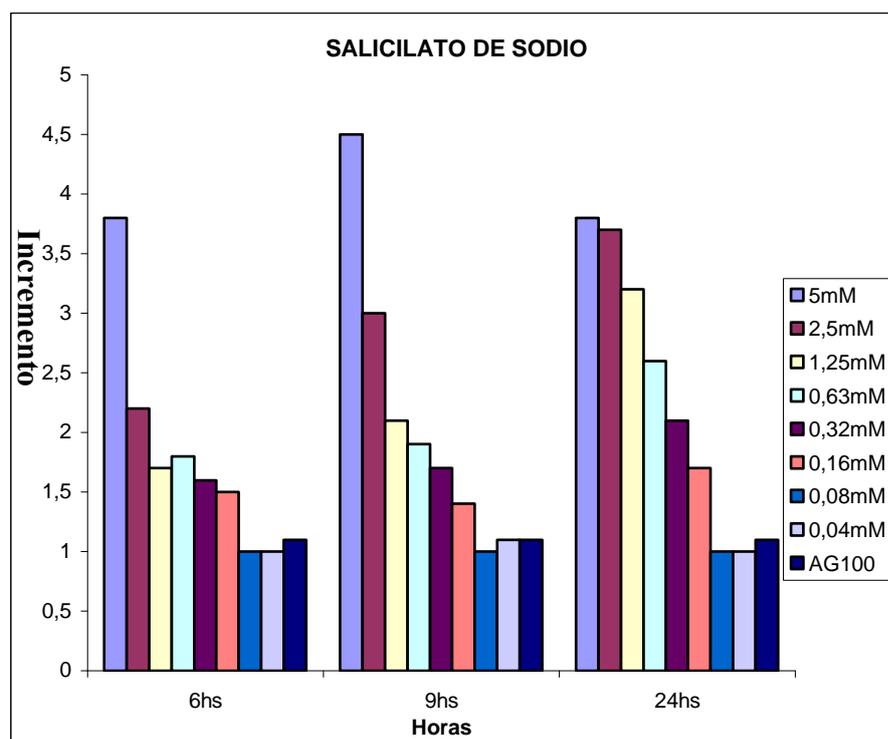
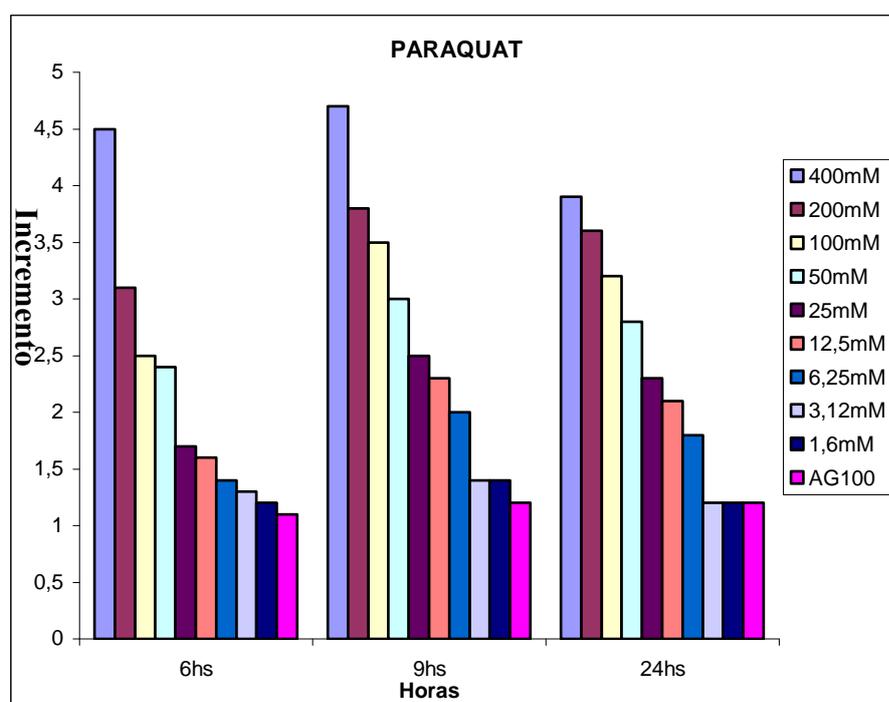


Figura N° 13

Los compuestos cíclicos redox como el paraquat inducen el operón *soxRS*, e incrementan la tolerancia a solventes orgánicos. Se valoró el incremento en la tolerancia al ciclohexano en *E. coli* AG100 en presencia de paraquat en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/1024, para constatar si la inducción de tolerancia al ciclohexano por paraquat era también dosis dependiente.

**Tabla N° 16**

Paraquat CMI: 1,6 mM				
EC	C en mM	Incremento en la Tolerancia al CH		
		6hs	9hs	24hs
1/4	400	4,5	4,7	3,9
1/8	200	3,1	3,8	3,6
1/16	100	2,5	3,5	3,2
1/32	50	2,4	3,0	2,8
1/64	25	1,7	2,5	2,3
1/128	12,5	1,6	2,3	2,1
<b>1/256</b>	6,25	1,4	2,0	1,8
1/512	3,12	1,3	1,3	1,2
1/1024	1,6	1,2	1,3	1,2
AG100 ( sin inductor)		1,1	1,2	1,2

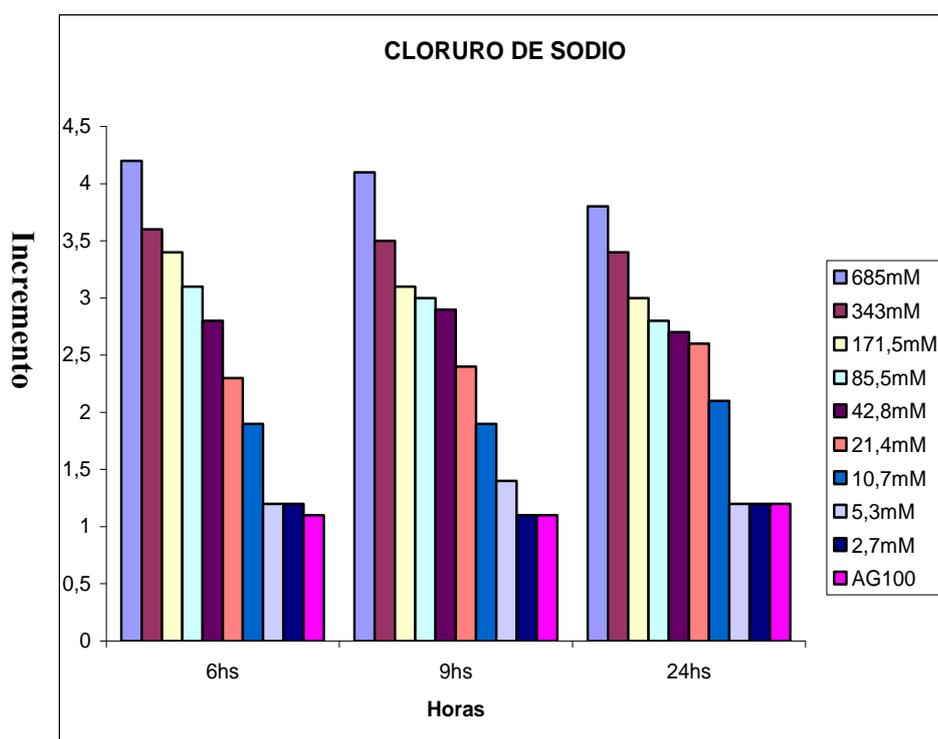


**Figura N° 14**

Se valoró la tolerancia al ciclohexano en *E. coli* AG100 en presencia de cloruro sódico en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/1024:

**Tabla N° 17**

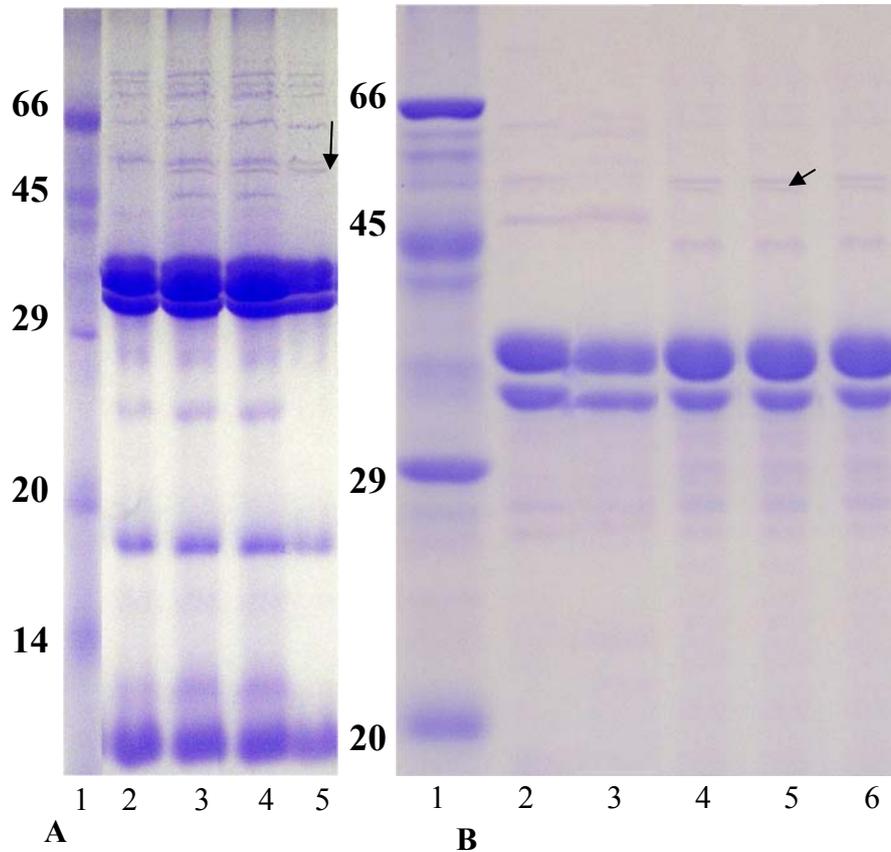
Cloruro de sodio CMI				
EC	C en mM	incremento en la tolerancia al CH		
		6hs	9hs	24hs
1/4	684	4,2	4,1	3,8
1/8	343	3,6	3,5	3,4
1/16	171,5	3,4	3,1	3
1/32	85,5	3,1	3	2,8
1/64	42,8	2,8	2,9	2,7
1/128	21,4	2,3	2,4	2,6
<b>1/256</b>	10,7	1,9	1,9	2,1
1/512	5,3	1,2	1,4	1,2
1/1024	2,7	1,2	1,1	1,2
AG100 ( sin inductor)		1,1	1,1	1,2



**Figura N° 15**

*Equivalencias CMI en mM: 4% (684 mM), 2% (342 mM), 1% (171 mM), 0,5% (85,5 mM), 0,25% (42,8 mM), 0,12% (21,4 mM), 0,06% (10,7 mM), 0,03% (5,3 mM), 0,015% (2,7 mM)*

**Perfil de proteínas de membrana externa de la cepa AG100  
inducida con cloruro de sodio y paraquat.**



**Figura N° 16:** Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa en la cepa AG100 inducida con diferentes concentraciones de cloruro de sodio y paraquat en gel de poliacrilamida al 12,5% suplementado con SDS.

*Líneas:*

**Gel A**

1. PM
2. AG100
3. + NaCl 0,25%
4. + NaCl 0,5%
5. + NaCl 1%

**Gel B**

1. PM
2. AG112
3. AG100
4. + Paraquat 25mM
5. + Paraquat 50mM
6. + Paraquat 100mM

**Tinción:** Kit de Tinción Imperial

**PM, Marcador de peso molecular en kDa:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).

**Selección *in vitro* de Mutantes  
Estables Multirresistentes de  
*Escherichia coli* con Antimicrobianos**



## 1. Selección *in vitro* de mutantes multirresistentes con antimicrobianos

En este trabajo se utilizaron dos cepas sensibles de *E. coli* (PS7 y PS11) aisladas de muestras clínicas y se seleccionaron *in vitro* mutantes multirresistentes utilizando ceftazidima, lomefloxacina, cefotaxima e imipenem.

### - Selección de mutantes con Ceftazidima:

La concentración inhibitoria mínima (CMI) de la ceftazidima en la cepa origen **PS7** fue de 0,06 µg/ml

<b>PS7</b>	1º escalón selectivo	2º escalón selectivo	3º escalón selectivo
CMI	0,5	2	32
$\Delta$ CMI*	8	32	256
Frecuencia de selección	$10^{-7}$	$10^{-5}$	$10^{-7}$

La cepa seleccionada denominada **CazE7** es la que corresponde al tercer escalón selectivo.

La concentración inhibitoria mínima (CMI) de la ceftazidima en la cepa origen **PS11** fue de 0,25 µg/ml

<b>PS11</b>	1º escalón selectivo	2º escalón selectivo	3º escalón selectivo
CMI	2	4	16
$\Delta$ CMI*	8	16	64
Frecuencia de selección	$10^{-9}$	$10^{-7}$	$10^{-5}$

La cepa seleccionada denominada **CazE11** es la que corresponde al tercer escalón selectivo.

- **Selección de mutantes con lomefloxacina:**

La concentración inhibitoria mínima (CMI) de lomefloxacina en la cepa origen PS7 fue de 1µg/ml

PS7	1º escalón selectivo	2º escalón selectivo
CMI	2	4
$\Delta$ CMI*	2	4
Frecuencia de selección	$10^{-7}$	$10^{-9}$

La cepa seleccionada denominada **LmfE7** es la que corresponde al segundo escalón selectivo.

\*  $\Delta$ CMI:  $CMI / CMI^{\circ}$ , siendo  $CMI^{\circ}$ : concentración inhibitoria mínima del antimicrobiano usado como agente selectivo en la cepa origen, CMI: concentración inhibitoria mínima del antimicrobiano usado como agente selectivo de la cepa mutante seleccionada en cada escalón selectivo

- **Selección de mutantes con cefotaxima e imipenem**

No se obtuvieron cepas mutantes *in vitro* de *E. coli* con cefotaxima e imipenem.

## 1. Susceptibilidad a antimicrobianos de Cepas origen y Mutantes

Tabla 18

CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Cepas					
Antimicrobiano	PS7	LmfE7	CazE7	PS11	CazE11
Ac. Nalidíxico	32	2056	1024	16	64
Lomefloxacina	0,5	16	16	0,5	8
Norfloxacina	0,12	2	4	0,06	0,12
Cefalotina	8	16	32	8	32
Cefoxitina	1	2	4	1	2
Ceftazidima	0,5	64	64	0,5	32
Cefotaxima	0,25	0,5	1	0,25	0,5
Aztreonam	0,5	2	4	0,5	2
Imipenem	0,25	0,5	1	0,25	0,5
Cloranfenicol	0,5	128	128	0,25	0,5
Cefpirome	1	4	8	1	32
Tetraciclina	64	128	128	64	128

*Los datos numéricos expresan las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenidas utilizando la técnica de dilución en agar para valorar la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos.*

## 2. Efecto del inhibidor de bombas de eflujo CCCP sobre la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos

**Tabla 19:** Efecto de CCCP 50  $\mu$ M en las CMI (  $\mu$ g/ml) de los antimicrobianos en las cepas origen, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI°) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP (CMI+)

<b>Cociente CMI°/CMI+</b>		
<b>Cepas</b>		
<b>Antimicrobianos</b>	<b>PS7</b>	<b>PS11</b>
<b>Ácido Nalidíxico</b>	2	2
<b>Lomefloxacina</b>	1	1
<b>Norfloxacina</b>	2	2
<b>Cefalotina</b>	1	1
<b>Cefoxitina</b>	2	2
<b>Ceftazidima</b>	1	1
<b>Cefotaxima</b>	1	1
<b>Aztreonam</b>	1	1
<b>Imipenem</b>	1	1
<b>Cloranfenicol</b>	2	2
<b>Cefpirome</b>	1	1
<b>Tetraciclina</b>	2	2

**CMI°:** CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP

**CMI+:** CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP

**Tabla 20:** Efecto de CCCP 50  $\mu$ M en las CMI<sub>s</sub> ( $\mu$ g/ml) de los antimicrobianos en las cepas mutantes, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI°) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP (CMI+).

<b>Cociente CMI°/CMI+</b>			
<b>Cepas</b>			
<b>Antimicrobianos</b>	<b>CazE7</b>	<b>LmfE7</b>	<b>CazE11</b>
<b>Ácido Nalidíxico</b>	4	4	4
<b>Lomefloxacina</b>	2	2	4
<b>Norfloxacina</b>	4	4	4
<b>Cefalotina</b>	2	4	2
<b>Cefoxitina</b>	4	4	4
<b>Ceftazidima</b>	2	2	4
<b>Cefotaxima</b>	4	4	4
<b>Aztreonam</b>	4	2	4
<b>Imipenem</b>	8	2	8
<b>Cloranfenicol</b>	4	4	4
<b>Cefpirome</b>	2	2	2
<b>Tetraciclina</b>	4	16	4

**CMI°:** CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP

**CMI+:** CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP

### 3. Valoración de la susceptibilidad a Mitomicina C y efecto del CCCP sobre la CMI de Mitomicina

En la tabla N° 20 se muestran los valores de CMI de la Mitomicina C tanto en las cepas sensibles PS7 y PS11 como en las mutantes seleccionadas CazE7, CazE11 y LmfE7 y las CMIs de Mitomicina C obtenidas en presencia de 50  $\mu$ M CCCP

**Tabla N° 21:** Valores de CMI ( $\mu$ g/ml) de la Mitomicina C en las cepas de *E. coli* origen y mutantes seleccionados con antimicrobianos

CMI ( $\mu$ g/ml)						
Cepas						
	PS7	PS7+ CCCP	CazE7	CazE7+ CCCP	LmfE7	LmfE7 + CCCP
MtC	2	2	4	4	4	4

CMI ( $\mu$ g/ml)				
Cepas				
	PS11	PS11+ CCCP	CazE11	CazE11+ CCCP
MtC	2	2	4	4

**+CCCP:** CMI de Mitomicina C en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP

*MtC:* Mitomicina C

#### 4. Resultados del estudio de la tolerancia al ciclohexano

En la tabla N° 22 se muestran la media de los valores de absorbancia obtenidos después de realizar por triplicado la valoración en medio líquido de la tolerancia al ciclohexano, tanto para las cepas origen como para las mutantes seleccionadas. Como control se usa la cepa sensible de *E. coli* AG100. Los tiempos se expresan en horas, y el ciclohexano se agrega después de la primera lectura a las 3 horas del inóculo inicial (Cuadro en gris). Dichos resultados se encuentran posteriormente gráficos (*Figura N° 17 y 18*)

**Tabla N° 22:** *Media de valores de absorbancia medidos a 660 nm*

---

<b>Tolerancia al Ciclohexano</b>					
<b>CEPAS</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>24</b>
<b>PS7</b>	0,016	0,245	0,487	0,482	0,482
<b>CazE7</b>	0,013	0,294	0,828	0,91	0,925
<b>Lmf7</b>	0,012	0,35	0,884	0,995	1,046
<b>PS11</b>	0,008	0,26	0,414	0,436	0,44
<b>CazE11</b>	0,008	0,285	0,809	0,835	0,811
<b>AG100</b>	0,007	0,264	0,406	0,398	0,376

**Gráficos que muestran el incremento de la tolerancia al ciclohexano en las mutantes respecto de sus cepas origen, en función del tiempo (horas):**

**Figura N° 17: Tolerancia al ciclohexano en las cepas PS7, CazE7 y LmfE7**

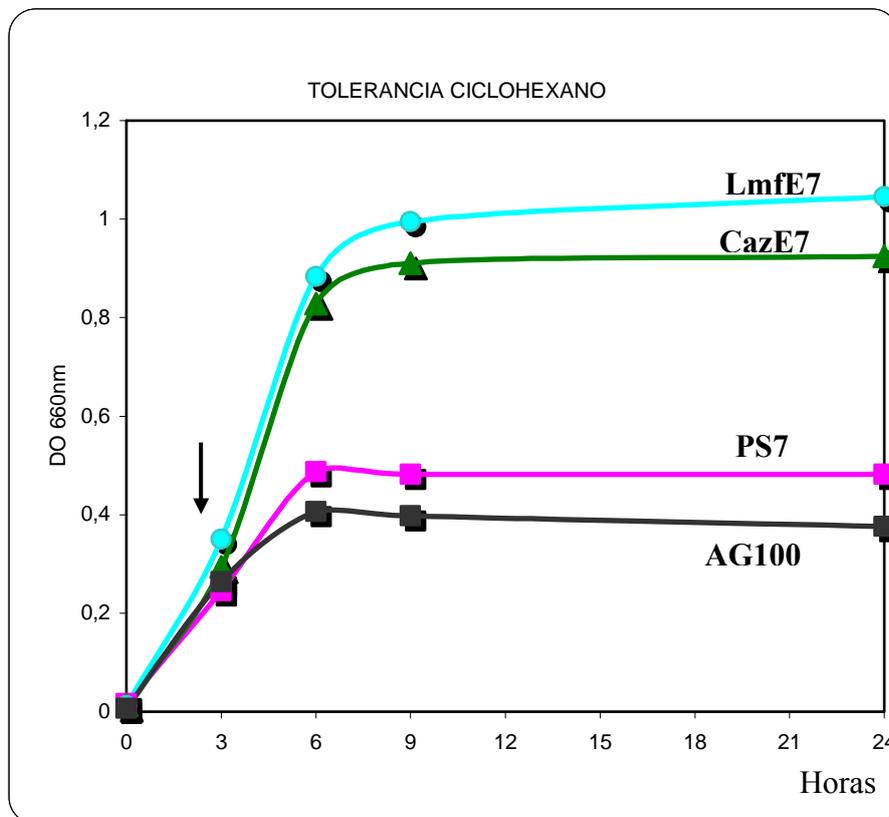
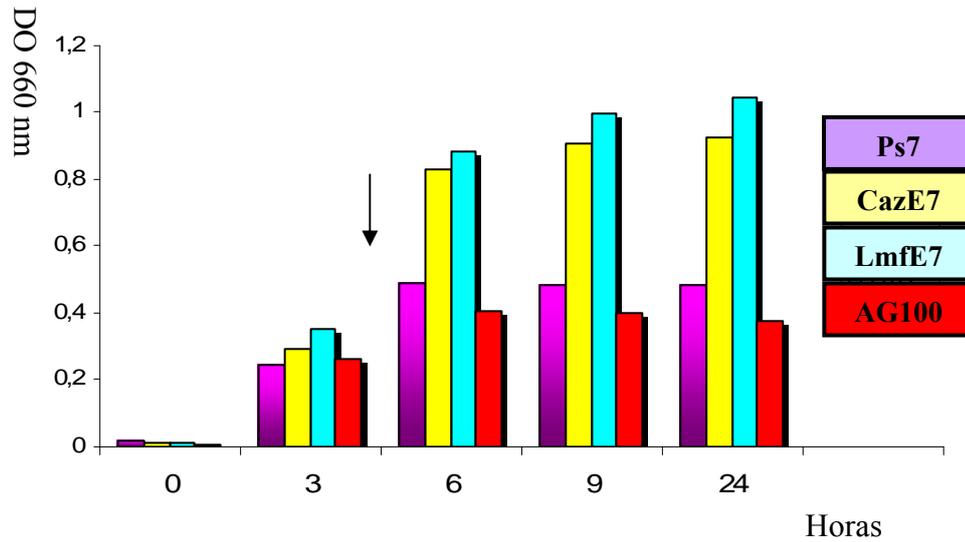
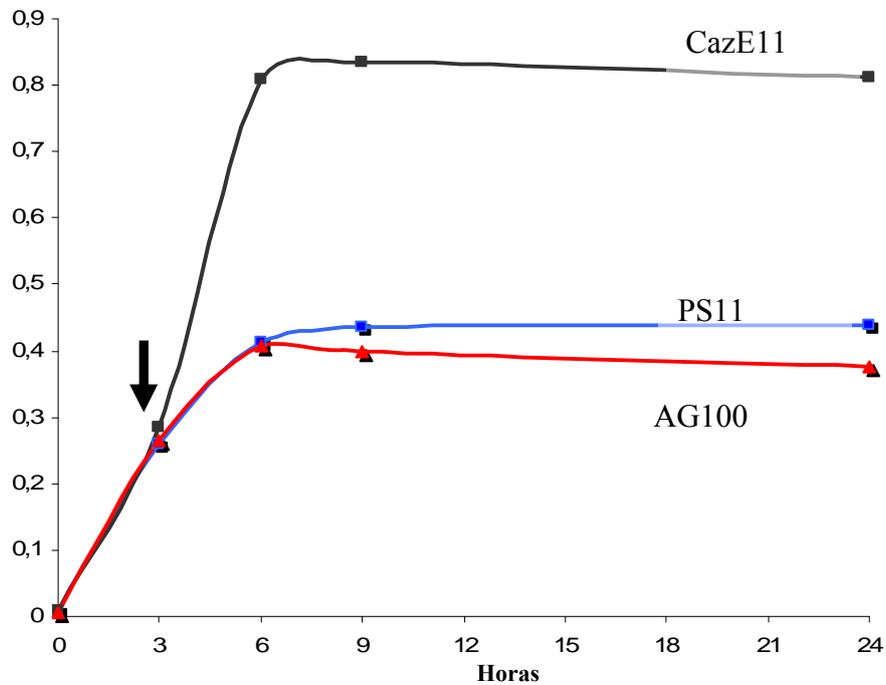
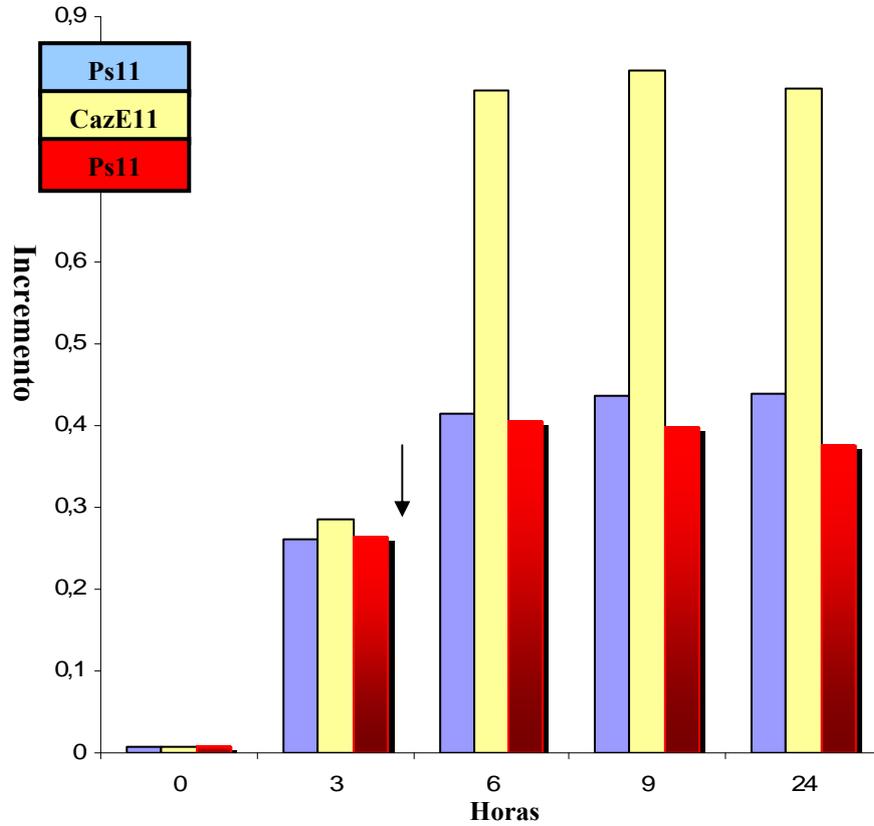


Figura N° 18: Tolerancia al ciclohexano en las cepas PS11 y CazE11



La flecha indica el momento en que se añade el ciclohexano al medio de cultivo

En la Tabla N° 23 se detalla el número de veces en que cada cepa incrementa su absorbancia después de añadir el ciclohexano en comparación con la absorbancia obtenida en la misma cepa sin ciclohexano en función del tiempo. El nivel de tolerancia después de las 3 primeras horas de incubación con ciclohexano (lectura de las 6 horas) no varía significativamente de las obtenidas a las 9 y 24 horas.

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs. 6 horas o 9 horas o 24 horas} \\ (3, 6 \text{ y } 21 \text{ horas posteriores al CH})}{(\text{Abs. 3hs})} \\ (\text{Absorbancia en ausencia de CH})$$

**Tabla N° 23**

<b>CEPAS</b>	<b>Veces que se incrementó la absorbancia</b>		
	<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>PS7</b>	1,9	1,9	1,9
<b>CazE7</b>	2,8	3,1	3,1
<b>Lmf7</b>	2,5	2,8	3
<b>PS11</b>	1,5	1,6	1,7
<b>CazE11</b>	2,8	2,9	2,5
<b>AG100</b>	1,5	1,5	1,4

En la tabla N° 24 (figura N° 19) se observa la relación entre los valores de absorbancia obtenidos en las cepas mutantes respecto al de la cepa origen en presencia de ciclohexano, en función del tiempo. Podemos observar que los mutantes son de 1,7 a 2,2 veces más tolerantes al ciclohexano que sus cepas origen.

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas de la cepa mutante en presencia de CH}}{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas de la cepa origen en presencia de CH}}$$

**Tabla N° 24:** *Valores de incrementos en la tolerancia al ciclohexano de las cepas mutantes seleccionadas con antimicrobianos. Los mutantes seleccionados fueron de 1,7 a 2,2 veces más tolerantes que las cepas origen.*

Cepas Mutantes	Tiempo (en horas)		
	6 horas	9 horas	24 horas
<b>CazE7</b>	1,7	1,9	1,9
<b>LmfE7</b>	1,8	2,1	2,2
<b>CazE11</b>	1,9	2	1,8

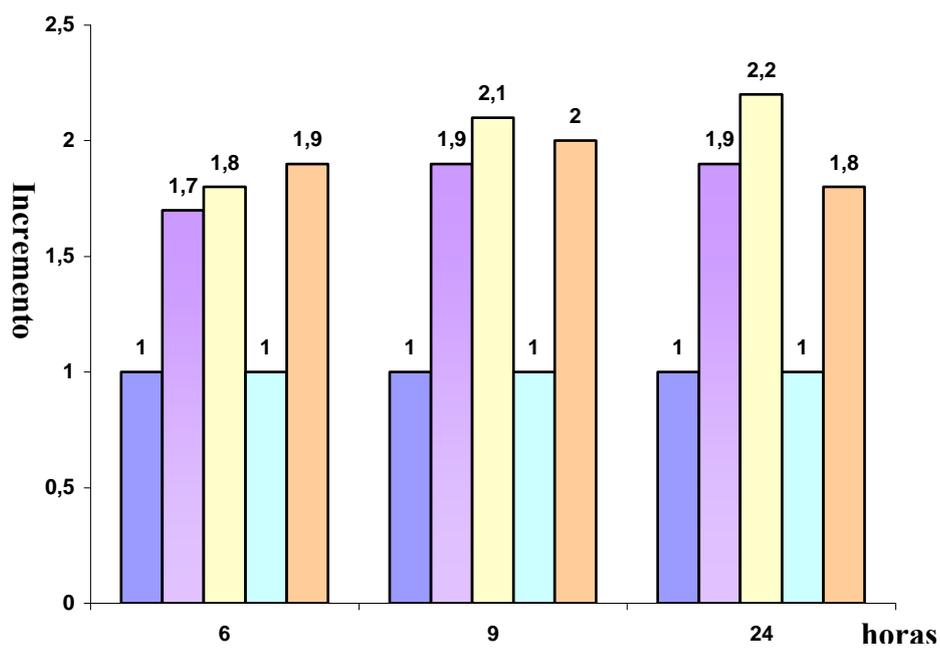
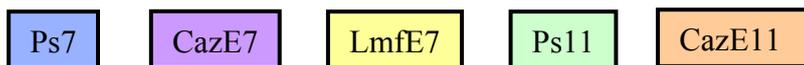


Figura N° 19



## 5. Efecto del Salicilato de Sodio 5 mM en la tolerancia al ciclohexano de los mutantes seleccionados con antimicrobianos:

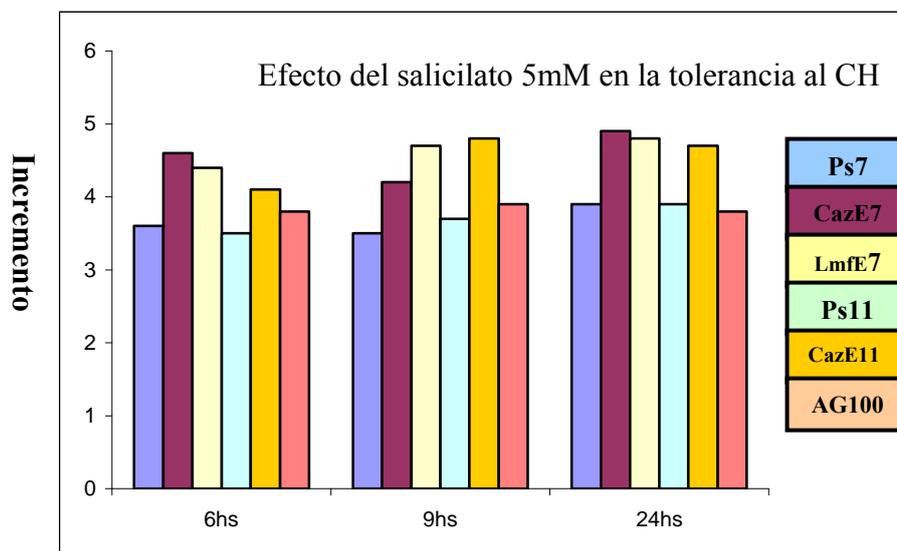
CH: Ciclohexano; +SL: En presencia de Salicilato sódico 5 mM

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs. 6 horas o 9 horas o 24 horas en presencia del CH + SL}}{(\text{Abs. 3hs})}$$

(Absorbancia en ausencia de CH + SL)

Tabla N° 25

Inducción con Salicilato de Sodio 5 mM			
Cepas	Incremento en la Tolerancia al CH		
	6hs	9hs	24hs
PS7 + SL	3,6	3,5	3,9
CazE7 + SL	4,6	4,2	4,9
LmfE7 + SL	4,4	4,7	4,8
PS11 + SL	3,1	3,3	2,9
CazE11 + SL	4,1	4,8	4,7
AG100 + SL	3,8	3,9	3,8
AG100 sin inducir	1,3	1,3	1,4



**Figura N° 20:** Representación del incremento en la tolerancia al ciclohexano en función del tiempo de las cepas origen y de las seleccionadas con antimicrobianos bajo el efecto inductor de 5mM de salicilato. La cepa AG100 sin inducir no está representada en los gráficos.

**6. Efecto del Salicilato de Sodio 5 mM en la tolerancia al ciclohexano de en las cepas mutantes de *E. coli* seleccionadas con Salicilato Sódico, Tablas 26 y 27, Figura 21**

*CH: Ciclohexano; + SL: En presencia de Salicilato sódico 5 mM*

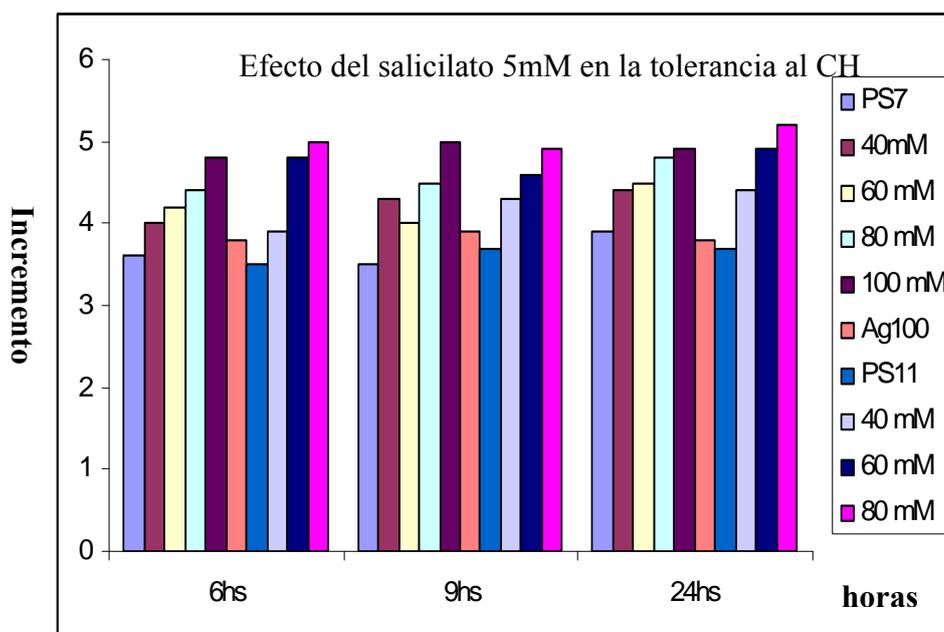
Incremento = en presencia de SL	$\frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas}}{\text{(Abs. 3hs)}}$ <p><i>(3, 6 y 24 horas posteriores al CH + SL)</i> <i>(Absorbancia en ausencia de CH + SL)</i></p>
Incremento = en ausencia de SL	$\frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas}}{\text{(Abs. 3hs)}}$ <p><i>(3, 6 y 24 horas posteriores al CH)</i> <i>(Absorbancia en ausencia de CH)</i></p>

**Tabla N° 26**

<b>Inducción con Salicilato de Sodio 5 mM</b>			
<b>Cepas</b>	<b>Incremento en la Tolerancia al CH</b>		
	<b>6hs</b>	<b>9hs</b>	<b>24hs</b>
<b>PS7</b>	3,6	3,5	3,9
40mM + SL	4	4,3	4,4
60 mM +SL	4,2	4	4,5
80 mM +SL	4,4	4,5	4,8
100 mM + SL	4,8	5	4,9
AG100 + SL	3,8	3,9	3,8
<b>Sin inducción</b>			
<b>PS7</b>	1,3	1,3	1,4
40mM	1,9	2,4	2,5
60 mM	2	2,5	2,6
80 mM	2,5	2,6	2,8
100 mM	2,6	2,8	3
AG100	1,1	1	1,1

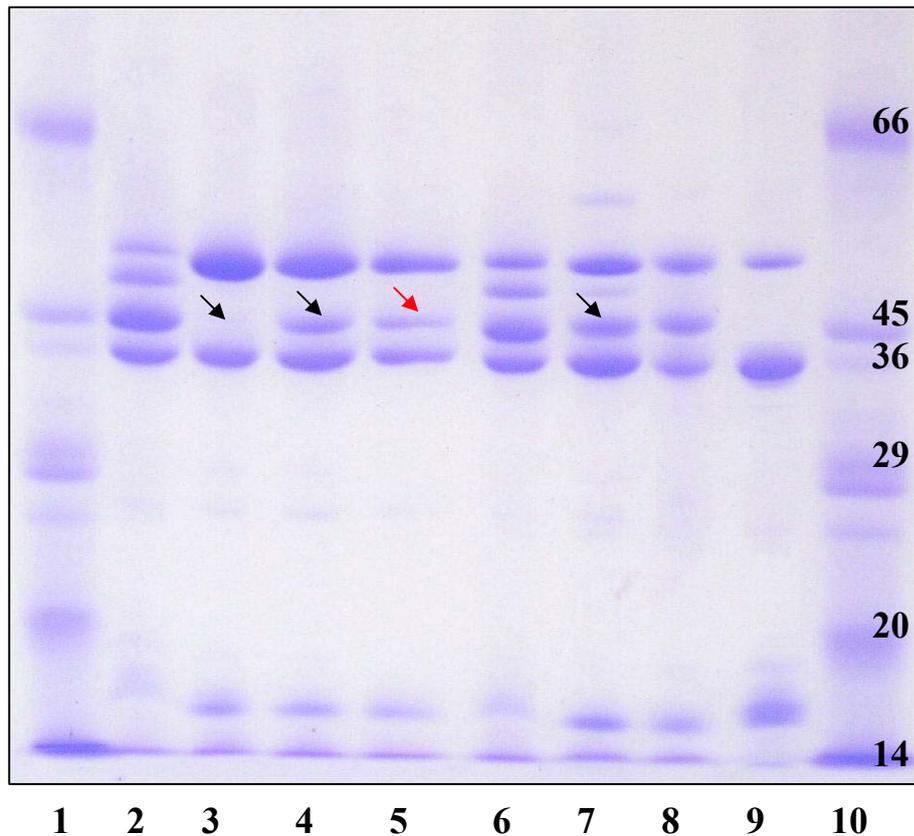
**Tabla N° 27**

<b>Inducción con Salicilato de sodio 5 mM</b>			
<b>Cepas</b>	<b>Incremento en la Tolerancia al CH</b>		
	<b>6hs</b>	<b>9hs</b>	<b>24hs</b>
<b>PS11</b>	3,5	3,7	3,7
40 mM + SL	3,9	4,3	4,4
60 mM + SL	4,8	4,6	4,9
80 mM + SL	5	4,9	5,2
AG100 + SL	3,8	3,9	3,8
<b>Sin inducción</b>			
<b>PS11</b>	1,3	1,3	1,4
40 mM	2,2	2,4	2,5
60 mM	2,4	2,8	2,7
80 mM	2,6	3	3,1
AG100 inducida	1,1	1,1	1



**Figura N° 21:** Comparación del nivel de tolerancia al ciclohexano, en función del tiempo, de la cepa AG100, las cepas origen PS7 y PS11 y de las seleccionadas con salicilato bajo el efecto inductor de 5mM de salicilato. La cepa AG100 sin inducir no está representada en los gráficos.

## 7. Análisis de la expresión de la OmpF



**Figura N° 22:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana externa (OMP) en gel de poliacrilamida al 9 % suplementado con SDS y 6M de Urea.

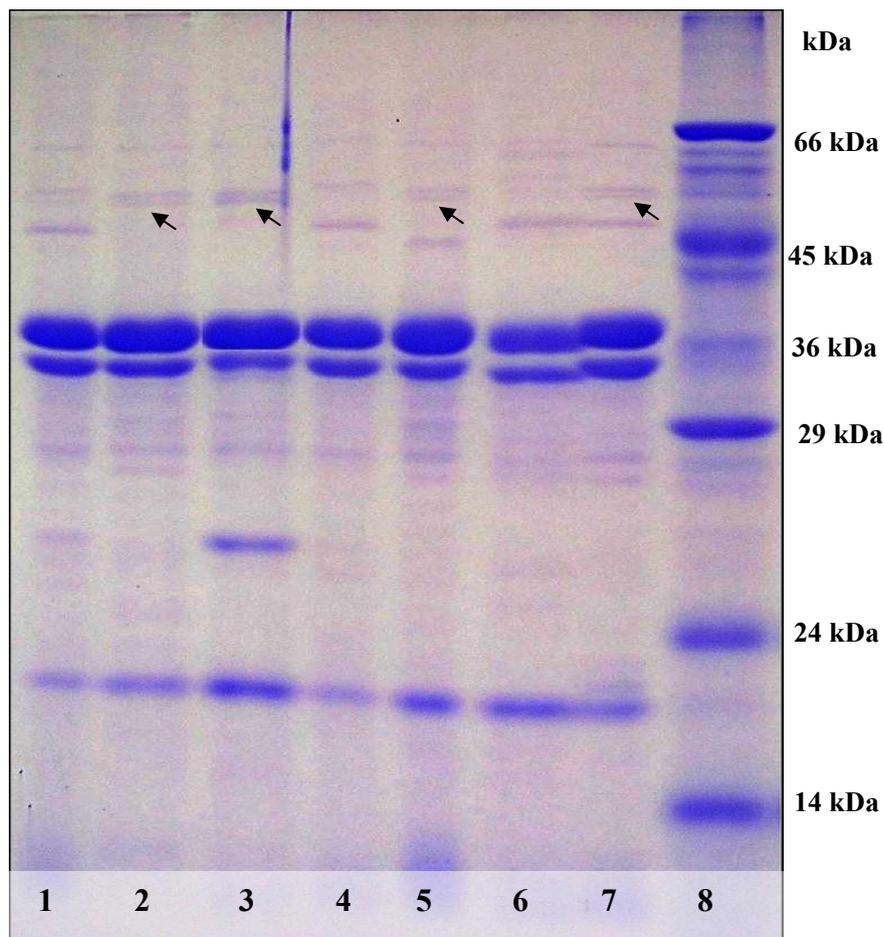
**Líneas:**

1. PM
2. *E. coli* PS7
3. *E. coli* CazE7
4. *E. coli* LmfE7
5. *E. coli* CazE7  
en 1,35% NaCl
6. *E. coli* PS11
7. *E. coli* CazE1
8. *E. coli* AG100
9. *E. coli* AG112
10. PM

**Tinción:** Azul de Coomassie

**PM, Marcador de peso molecular en kDa:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).

## 8. Análisis de la expresión de TolC



**Figura N° 23:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana externa en gel de poliacrilamida al 12,5 %.

**Líneas:**

1. *E. coli* PS7
2. *E. coli* CazE7
3. *E. coli* LmfE7
4. *E. coli* PS11
5. *E. coli* Caz E11
6. *E. coli* AG100
7. *E. coli* AG100 + salicilato 5mM
8. PM

**Tinción:** Kit de Tinción Imperial

**PM, Marcador de peso molecular en kDa:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).

## 9. Análisis de la expresión de *acrB*

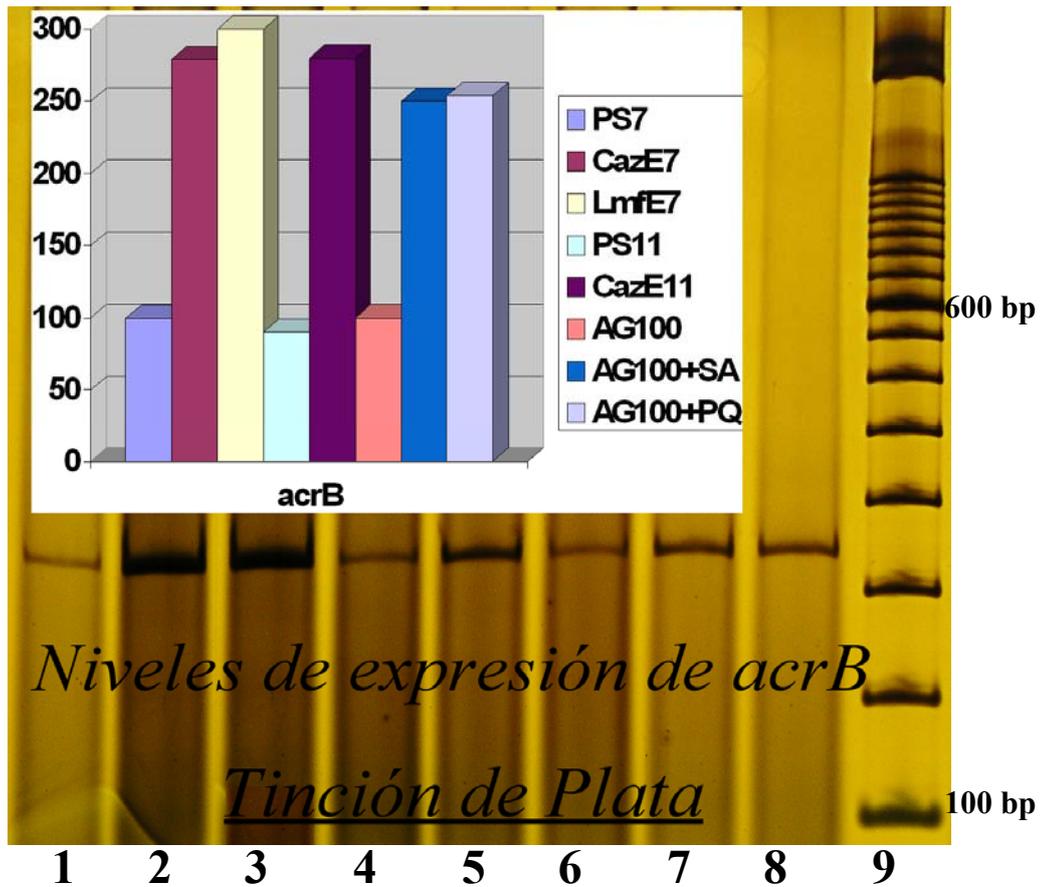


Figura N° 24: Análisis del producto de RT-PCR en gel de poliacrilamida.

### Líneas:

1. *E. coli* PS7
2. *E. coli* CazE7
3. *E. coli* LmfE7
4. *E. coli* PS11
5. *E. coli* Caz E11
6. *E. coli* AG100
7. *E. coli* AG100 + salicilato (SA) 5mM
8. *E. coli* AG100 + paraquat (PQ) 200  $\mu$ M
9. Escala de ADN

## 10. Actividad hidrolítica de los extractos periplásmicos crudos

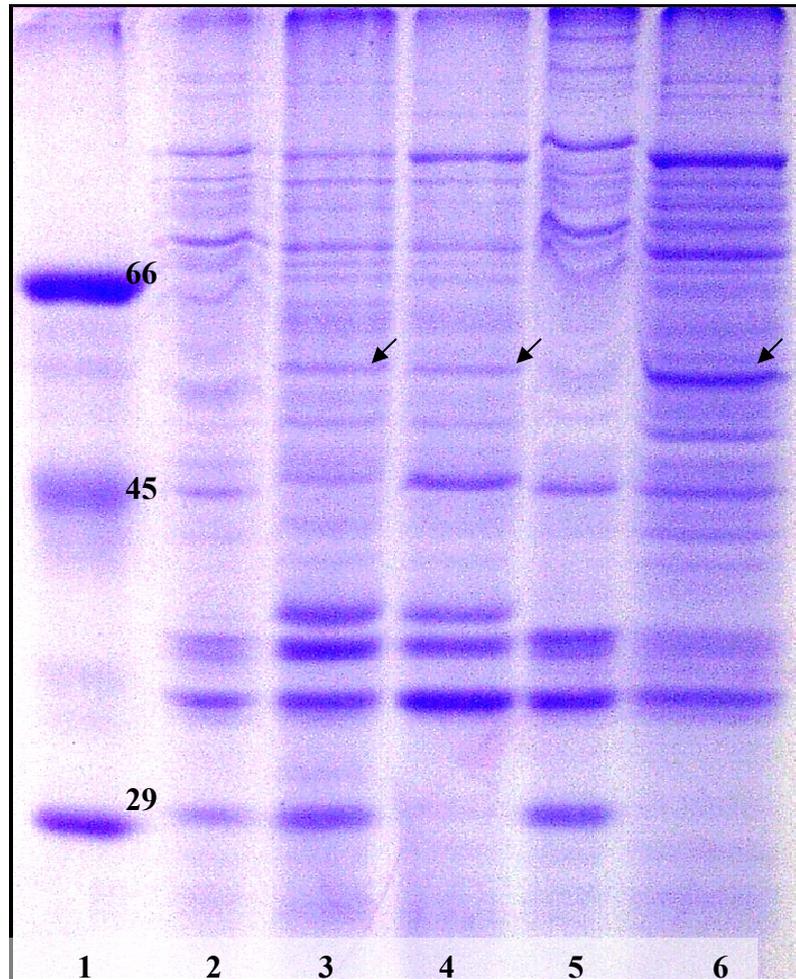
**Tabla N° 28:** *Actividad enzimática de los extractos crudos de las cepas origen y mutantes sobre los sustratos Bencilpenicilina y Cefaloridina, expresados en nanomoles de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. ND: no se detecta actividad hidrolítica sobre los sustratos utilizados.*

### Actividad en mU\*/mg de proteína total

Sustrato	PS7	LmfE7	CazE7	PS11	CazE11
<b>Bencilpenicilina 100 <math>\mu</math>M</b>	700 $\pm$ 45	795,2 $\pm$ 57	ND	612 $\pm$ 17	519 $\pm$ 51
<b>Cefaloridina 100 <math>\mu</math>M</b>	74,2 $\pm$ 3	77,3 $\pm$ 4,8	ND	89 $\pm$ 8	147 $\pm$ 18

\*1 U representa: 1  $\mu$ mol de sustrato hidrolizado por minuto y por ml de extracto.

## 11. Detección de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) con tinción imperial



**Figura N° 25:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de unión a penicilina en SDS-PAGE al 12,5 %.

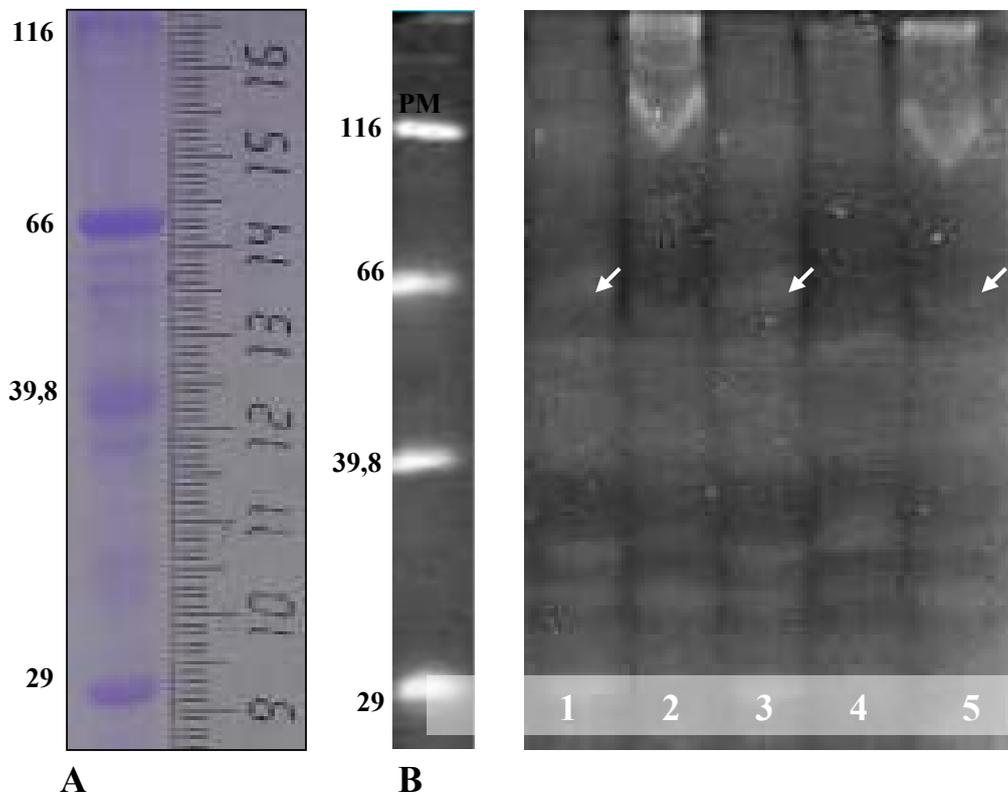
**Líneas:**

1. PM
2. *E. coli* PS7
3. *E. coli* CazE7
4. *E. coli* LmfE7
5. *E. coli* PS11
6. *E. coli* CazE11

Tinción: **KIT de tinción Imperial**

**PM, Marcador de peso molecular:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa).

## 12. Detección de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) con Bocilina y luz UV: (Figuras 25 y 26)



**Figura N° 26:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana interna marcadas con Bocilina-FL en SDS-PAGE al 12 %. **A:** muestra el marcador de PM fluorescente en gel teñido con Azul de Coomassie. **B:** muestra el mismo PM que en A pero en gel teñido con Bocilina-FL y luz UV.

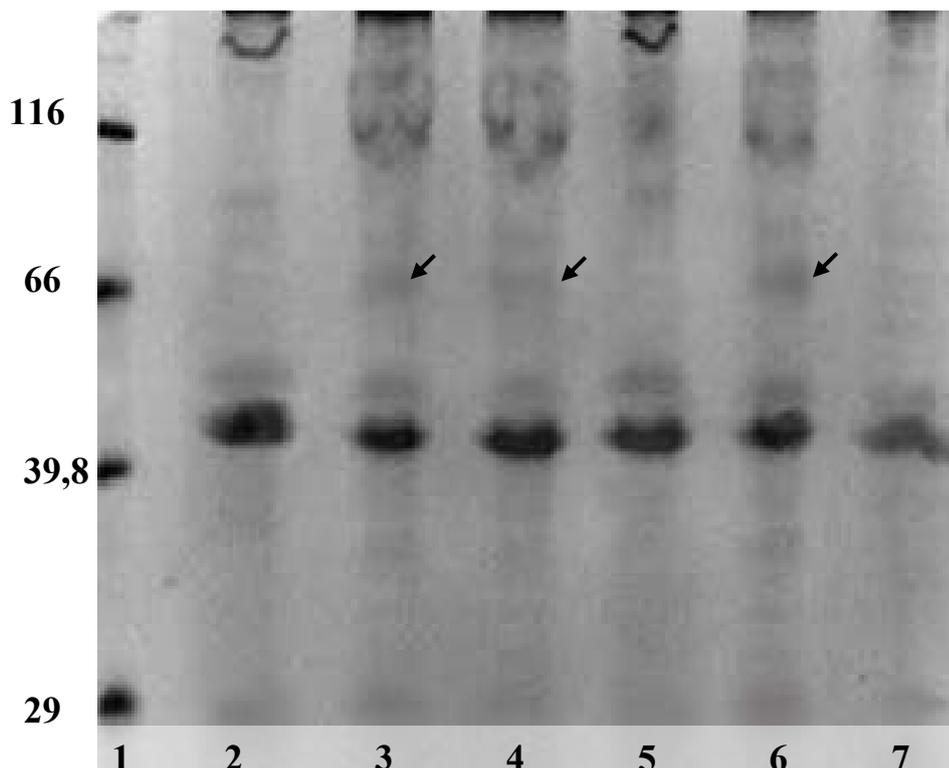
### Figura N° 7:

#### Líneas:

1. *E. coli* CazE11
2. *E. coli* PS11
3. *E. coli* LmfE7
4. *E. coli* CazE7
5. *E. coli* PS7

**Tinción:** Bocilina-FL y luz UV  
SDS-PAGE al 12 %.

**PM,** Marcador de Peso Molecular fluorescente detallado en sección material y métodos.



**Figura N° 27:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana interna marcados con Bocilina-FL en SDS-PAGE al 12,5%.

**Líneas:**

1. PM fluorescente
2. *E. coli* PS7
3. *E. coli* CazE7
4. *E. coli* LmfE7
5. *E. coli* PS11
6. *E. coli* CazE11
7. *E. coli* AG100

**Tinción:** Bocilina-FL y luz UV en ChemiDoc system (Biorad).  
SDS-PAGE 12,5%

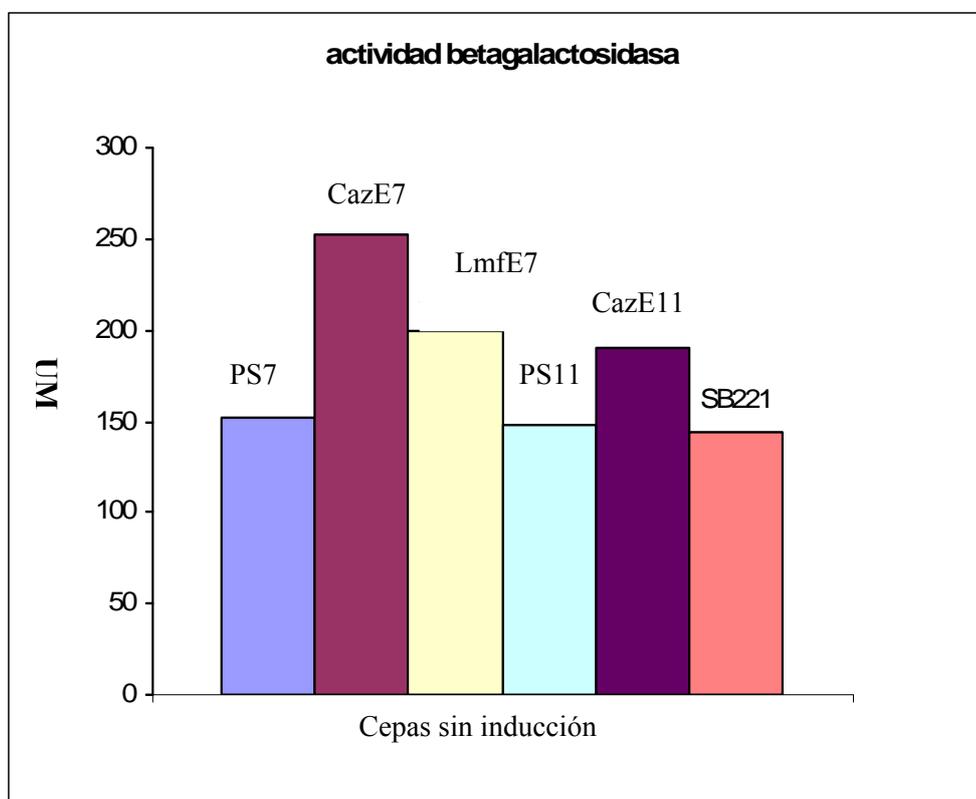
Marcador de Peso Molecular Fluorescente detallado en sección material y métodos.

En ambos geles (Figuras 25 y 26) podemos observar un incremento en una banda en torno a los 60 kDa que correspondería con la que *GENSHI ZHAO* y *cols. 1999*, han caracterizado como PBP3, y esta banda no se expresa en las cepas origen ni en la cepa sensible AG100 usada como control.

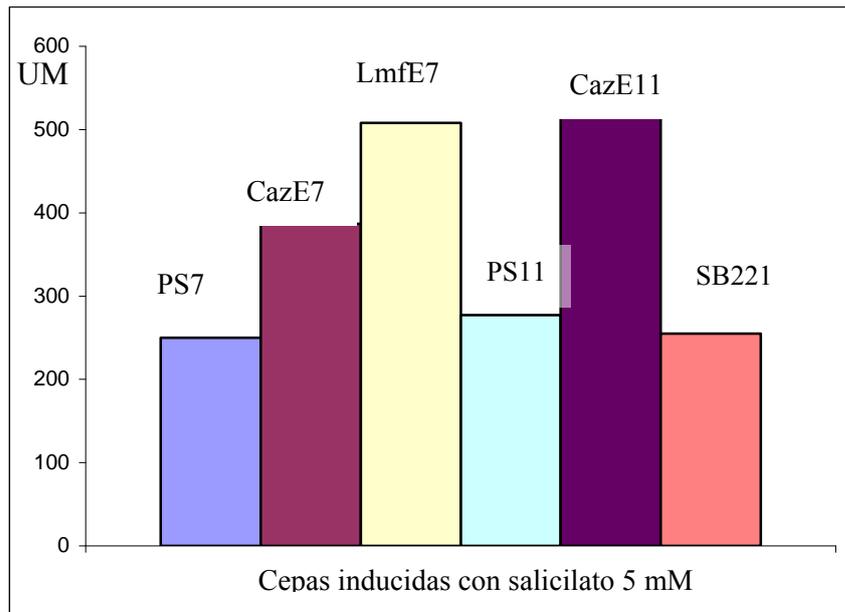
### 13. Ensayos de transducción y actividad Betagalactosidasa

Figuras 28-31

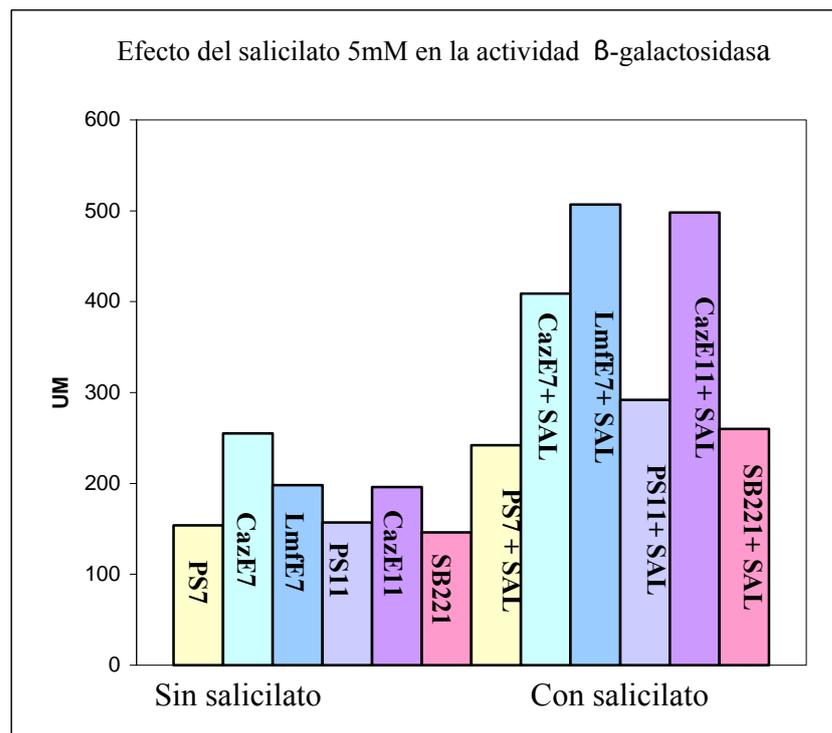
Se construyeron transductantes con la fusión *micF::lacZ* de las cepas seleccionadas, usando como donante la *Escherichia coli* SB221. Para lo que se utilizaron dos aislamientos clínicos, PS7, PS11 y los mutantes seleccionados *in vitro* con ceftazidima (CazE7 y CazE11), y lomefloxacina (LmfE7). El nivel de transcripción de *micF* se valoró mediante el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa, usando como sustrato *O*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa, expresando la actividad en unidades Miller (U).



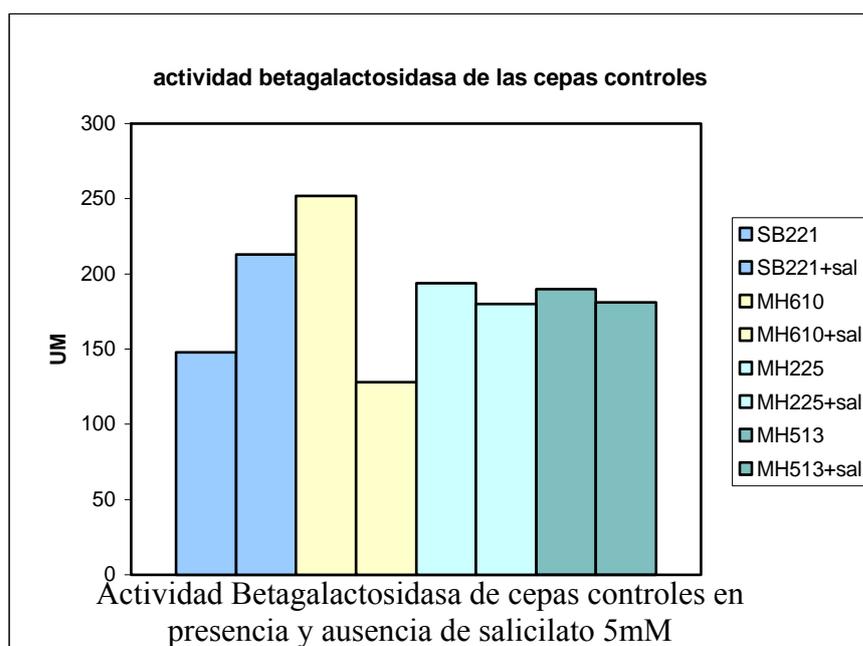
**Figura N° 28:** Actividad  $\beta$ -galactosidasa basal en Unidades Miller de los mutantes seleccionados con antimicrobianos, de las cepas origen y de la cepa control SB221.



**Figura N° 29:** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades Miller en presencia de salicilato 5 mM



**Figura N° 30:** Comparación entre la actividad basal  $\beta$ -galactosidasa observada en todas las cepas, con la obtenida mediante la inducción con salicilato 5 mM



**Figura N° 31:** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas usadas como controles en presencia y ausencia de salicilato 5mM.

El análisis de los datos reveló que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en ausencia del inductor fue 1,4-1,5 veces mayor en los mutantes que en sus cepas origen, siendo mayor en la única cepa mutante carente de OmpF (CazE7).

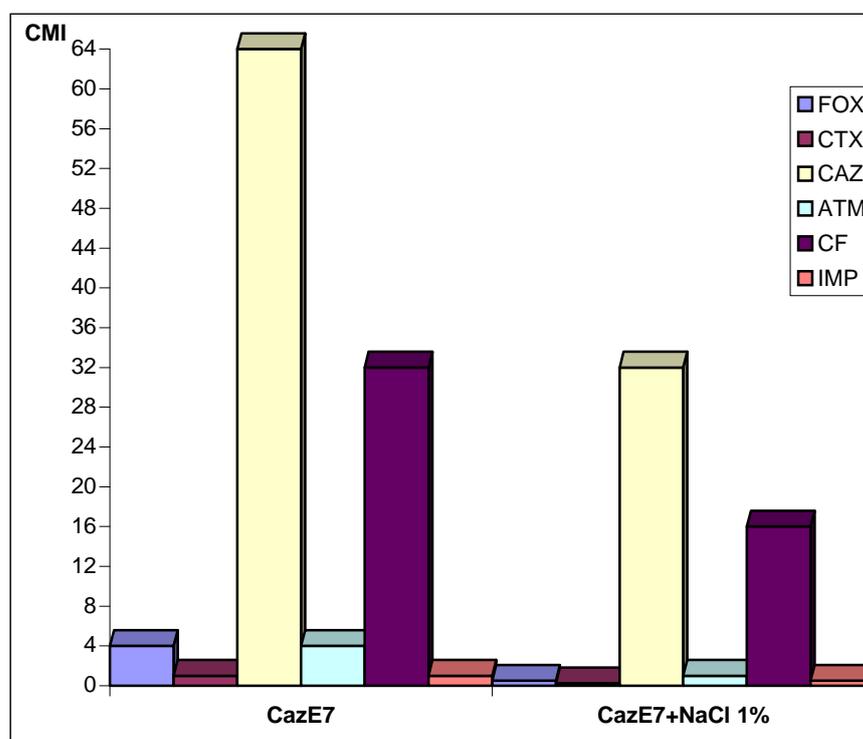
En presencia de salicilato 5 mM todas las cepas incrementaron la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, los valores en las cepas origen fueron de 1,6 a 1,8 veces superiores a los obtenidos en ausencia del inductor, en las cepas mutantes LmfE7 y CazE11 el incremento fue de 2,5 veces, y en la cepa CazE7 (OmpF-) el incremento fue de 1,7 veces respecto a la actividad del enzima en la misma cepa en ausencia del inductor.

Con respecto a las cepas controles encontramos que en presencia del salicilato 5 mM:

- Los niveles de OmpC permanecieron sin alteraciones tanto en el perfil proteico de membrana como en la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de su fusión transcripcional.
- La actividad  $\beta$ -galactosidasa halladas en la cepa MH513 (*fusión transcripcional ompF::lacZ*) y en la cepa MH610 (*fusión traduccional ompF::lacZ*) confirman que la regulación de *micF* sobre la expresión de la porina F en presencia de salicilato 5 mM está a nivel post-transcripcional.

## 14. Expresión de la porina F en presencia de > 1% cloruro de sodio

Posteriormente analizamos si la represión de la OmpF era causa de la inducción de la resistencia a antimicrobianos, puesto que muchos de ellos ingresan a la célula preferentemente por esta porina como es el caso de algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, para ello analizamos la sensibilidad a diferentes antimicrobianos en la cepa CazE7 OmpF (-) y la comparamos con la CazE7 crecida en presencia de una concentración 1,35% de Cloruro de sodio que expresaba OmpF (Figura N° 22), paralelamente a un aumento de 2-8 veces en las CMI's ( $\mu\text{g/ml}$ ) de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, ceftazidima, aztreonam, cefalotina e imipenem.



**Figura N° 32:** Comparación del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos betalactámicos entre CazE7 y CazE7 crecida en 1,35% de cloruro de sodio. FOX: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, ATM: aztreonam, CF: cefalotina, IMP: Imipenem

**Tabla N° 29:** Efecto de la expresión de *OmpF* (inducida por 1,35% de NaCl) en la susceptibilidad de la cepa *CazE7* a los antimicrobianos ensayados.

Antimicrobiano	CMI (µg/ml)	
	CazE7	CazE7+ 1,35% NaCl
<b>Cefoxitina</b>	4	0,5
<b>Cefotaxima</b>	1	0,25
<b>Ceftazidima</b>	64	32
<b>Aztreonam</b>	4	1
<b>Cefalotina</b>	32	16
<b>Imipenem</b>	1	0,5
<b>Norfloxacin</b>	4	1
<b>Cloranfenicol</b>	128	32



**Selección *in vitro* de Mutantes  
Multirresistentes  
de *Escherichia coli* con Fármacos no  
Antimicrobianos**



## Selección *in vitro* de mutantes multirresistentes a partir de diazepam y salicilato de sodio

En este trabajo se utilizaron dos cepas sensibles de *E. coli* (PS7 y PS11) aisladas de muestras clínicas y se seleccionaron *in vitro* ocho cepas mutantes multirresistentes utilizando diazepam y siete cepas utilizando salicilato de sodio.

### Selección con Diazepam

#### 1. Selección de mutantes con diazepam:

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del Diazepam en las cepas origen PS7 y PS11 fue: **0,25 mM** (en ambas)

PS7	1º escalón selectivo (0,5mM)	2º escalón selectivo (0,75mM)	3º escalón selectivo (1mM)	4º escalón selectivo (1,5mM)
<b>CMI</b>	0,5	0,75	1	1,5
<b>ΔCMI*</b>	2	3	4	6
<b>Frecuencia de selección</b>	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$

Las cepas seleccionadas fueron denominadas de acuerdo a la concentración de diazepam utilizada en cada escalón selectivo:

- **EC7/0,5**
- **EC7/0,75**
- **EC7/1**
- **EC7/1,5**

<b>PS11</b>	<b>1° escalón selectivo (0,5mM)</b>	<b>2° escalón selectivo (0,75mM)</b>	<b>3° escalón selectivo (1mM)</b>	<b>4° escalón selectivo (1,5mM)</b>
<b>CMI</b>	0,5	0,75	1	1,5
$\Delta$ CMI*	2	3	4	6
<b>Frecuencia de selección</b>	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$

Las cepas seleccionadas fueron denominadas de acuerdo a la concentración de diazepam utilizada en cada escalón selectivo:

- EC11/0,5
- EC11/0,75
- EC11/1
- EC11/1,5

\*  $\Delta$ CMI:  $CMI / CMI^{\circ}$ , siendo  $CMI^{\circ}$ : concentración inhibitoria mínima del diazepam en la cepa origen, CMI: concentración inhibitoria mínima del diazepam en la cepa mutante seleccionada en cada escalón selectivo

**2. Susceptibilidad a antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las cepas origen PS7 y PS11 y efecto del inhibidor de bombas de eflujo CCCP**

**Tabla N° 30:** *Susceptibilidad a antimicrobianos (CMI:  $\mu\text{g/ml}$ ) de las cepas origen utilizadas para la selección mutantes con fármacos no antimicrobianos, y el efecto del CCCP 50  $\mu\text{g/ml}$  sobre la CMI de los mismos.*

Diazepam Inductor	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	PS7	PS7+CCCP	PS11	PS11+CCCP
Á. Nalidíxico	32	16	16	16
Lomefloxacina	0,5	0,25	0,5	0,25
Norfloxacina	0,12	0,12	0,06	0,03
Ciprofloxacina	0,06	0,03	0,06	0,03
Cefalotina	16	8	0,5	0,25
Cefoxitina	1	1	1	1
Cefotaxima	0,25	0,12	0,25	0,06
Cefpirome	0,5	0,25	0,5	0,25
Ceftazidima	0,5	0,25	0,5	0,25
Aztreonam	0,5	0,03	0,5	0,12
Imipenem	0,25	0,12	0,25	0,12
Cloranfenicol	0,5	0,25	0,25	0,12
Tetraciclina	64	32	64	32
Mitomicina C	2	2	2	2

### 3. Susceptibilidad a antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ )

Tabla N° 31: Susceptibilidad a antimicrobianos en las mutantes seleccionadas con diazepam a partir de la cepa origen PS7

CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
Cepas					
Antimicrobiano	PS7	EC7/0,5	EC7/0,75	EC7/1	EC7/1,5
Ac. Nalidíxico	32	64	128	128	128
Lomefloxacina	0,5	2	2	4	4
Norfloxacina	0,12	0,5	1	1	2
Cefalotina	16	32	32	32	32
Cefoxitina	1	1	1	2	2
Ceftazidima	0,5	1	1	1	2
Cefotaxima	0,25	0,5	1	1	1
Aztreonam	0,5	0,5	1	1	2
Imipenem	0,25	0,25	0,5	2	2
Cloranfenicol	0,5	0,5	0,5	1	1
Cefpirome	1	2	2	2	4
Tetraciclina	64	128	128	128	128

**Tabla N° 32:** *Susceptibilidad a diferentes antimicrobianos expresadas en CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) para las mutantes seleccionadas con diazepam a partir de la cepa origen PS11.*

<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>					
<b>Cepas</b>					
<b>Antimicrobiano</b>	<b>PS11</b>	<b>EC11/0,5</b>	<b>EC11/0,75</b>	<b>EC11/1</b>	<b>EC11/1,5</b>
<b>Ac. Nalidixico</b>	32	64	128	128	128
<b>Lomefloxacina</b>	0,5	2	2	4	4
<b>Norfloxacina</b>	0,12	0,5	1	1	2
<b>Cefalotina</b>	16	32	32	32	32
<b>Cefoxitina</b>	1	1	1	2	2
<b>Ceftazidima</b>	0,5	1	1	1	2
<b>Cefotaxima</b>	0,25	0,5	1	1	1
<b>Aztreonam</b>	0,5	0,5	1	1	2
<b>Imipenem</b>	0,25	0,25	0,5	2	2
<b>Cloranfenicol</b>	0,5	0,5	0,5	1	1
<b>Cefpirome</b>	1	2	2	2	4
<b>Tetraciclina</b>	64	128	128	128	128

#### 4. Efecto del inhibidor de bombas de eflujo CCCP sobre la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos

##### Mutantes derivadas de la cepa PS7

**Tabla N° 33:** Efecto de CCCP 50  $\mu$ M en las CMI<sub>s</sub> ( $\mu$ g/ml) de los antimicrobianos en las cepas mutantes, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI<sup>o</sup>) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP (CMI<sup>+</sup>).

#### Cocientes CMI<sup>o</sup>/CMI<sup>+</sup>

Antimicrobiano	Cepas			
	EC7/0,5	EC7/0,75	EC7/1	EC7/1,5
Ac. Nalidíxico	2	4	4	4
Lomefloxacina	4	8	8	8
Norfloxacina	2	8	8	16
Ciprofloxacina	4	4	8	16
Cefalotina	2	4	4	4
Cefoxitina	2	4	2	4
Ceftazidima	4	8	8	8
Cefotaxima	2	2	2	4
Aztreonam	4	8	8	8
Imipenem	2	2	8	8
Cloranfenicol	2	8	8	8
Cefpirome	4	2	2	4
Tetraciclina	2	2	2	4

### Mutantes derivadas de la cepa PS11

**Tabla N° 34:** Efecto de CCCP 50  $\mu$ M en las CMI<sub>s</sub> ( $\mu$ g/ml) de los antimicrobianos en las cepas mutantes, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI<sup>o</sup>) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP (CMI<sup>+</sup>).

#### Cocientes CMI<sup>o</sup>/CMI<sup>+</sup>

Cepas				
Antimicrobiano	EC11/0,5	EC11/0,75	EC11/1	EC11/1,5
Ac. Nalidíxico	2	4	2	4
Lomefloxacina	4	8	4	8
Norfloxacina	8	8	16	32
Ciprofloxacina	8	8	16	32
Cefalotina	2	2	2	2
Cefoxitina	2	4	2	2
Ceftazidima	4	4	8	8
Cefotaxima	4	4	4	8
Aztreonam	4	4	4	8
Imipenem	2	8	16	16
Cloranfenicol	8	8	16	16
Cefpirome	8	8	8	16
Tetraciclina	2	2	2	4

## 5. Valoración de la susceptibilidad a Mitomicina C y efecto del CCCP sobre la CMI de la Mitomicina C.

En la Tabla 35 se muestran los valores de CMI hallados para la Mitomicina C en las mutantes seleccionadas con diazepam y la CMI valorada en presencia de CCCP.

**Tabla N° 35:** valores de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) para Mitomicina C en mutantes de *E. coli* seleccionas con diazepam: MitC: mitomicina C, CCCP: carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona

		CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )							
		Mutantes							
Origen		0,5 mM	CCCP	0,75 mM	CCCP	1 mM	CCCP	1,5 mM	CCCP
PS7		8	4	8	8	16	16	16	16
PS11		8	8	8	8	16	16	16	16

6. Valoración de cambios en la morfología de los  
mutantes respecto de las cepas origen

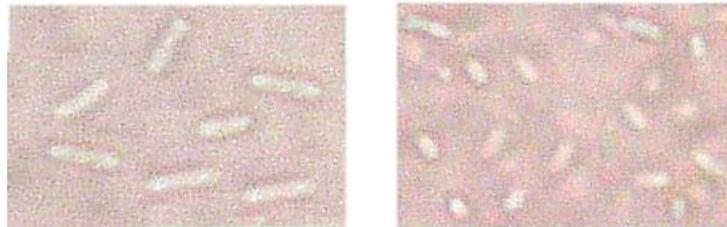
**Tinción de Gram**



**PS7**

**LmfE7**

**Examen en fresco**



**PS7**

**CazE7**



**LmfE7**

**Fig. 33:** Imágenes de la cepa origen PS7 y de los mutantes CazE7 y LmfE7 por la técnica de Gram y examen en fresco.

## **Tabla resumen de cambios morfológicos**

**Tabla N° 36:** *Tabla resumen de los cambios morfológicos observados en microscopía óptica con la tinción de Gram y en fresco.*

	<b>Tinción de Gram</b>	<b>Fresco</b>
<b>PS7</b>	+++	+++
<b>LmfE7</b>	++	++
<b>CazE7</b>	+	+
<b>PS11</b>	+++	+++
<b>CazE11</b>	++	++

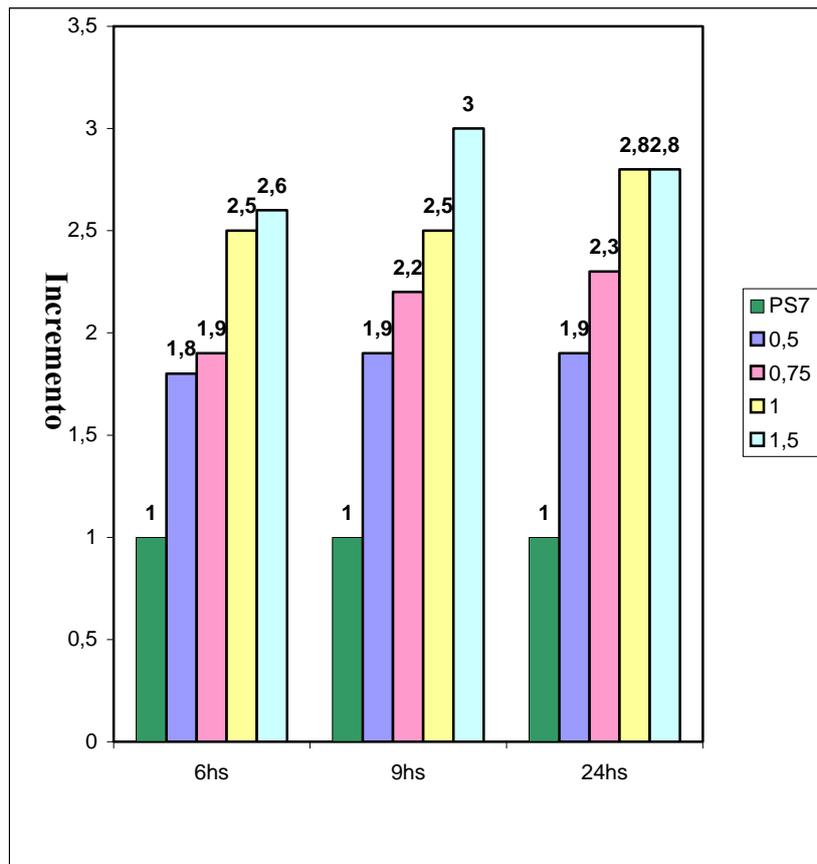
## 7. Resultados de la valoración de la tolerancia al ciclohexano en la cepa AG100, la cepa origen PS7 y los mutantes seleccionados con diazepam

En la tabla N° 37 y 38 (figuras N° 34 y 35) se observa la relación entre los valores de absorbancia obtenidos en las cepas mutantes respecto al de la cepa origen en presencia de ciclohexano, en función del tiempo. Podemos observar que los mutantes son de 1,8 a 3,0 veces más resistentes al ciclohexano que sus cepas origen.

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas de la cepa mutante en presencia de CH}}{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas de la cepa origen en presencia de CH}}$$

**Tabla N° 37:** Incremento de la tolerancia al ciclohexano para los mutantes seleccionadas con diazepam a partir de la cepa sensible PS7. Podemos observar que los mutantes son de 1,8 a 3 veces más tolerantes que la cepa origen y AG100, que no toleran el ciclohexano.

Cepas Mutantes	Tiempo ( horas)		
	6	9	24
EC7/0,5	1,8	1,9	1,9
EC7/0,75	1,9	2,2	2,3
EC7/1	2,5	2,5	2,8
EC7/1,5	2,6	3	2,8
PS7/AG100	1,0	1,0	1,0

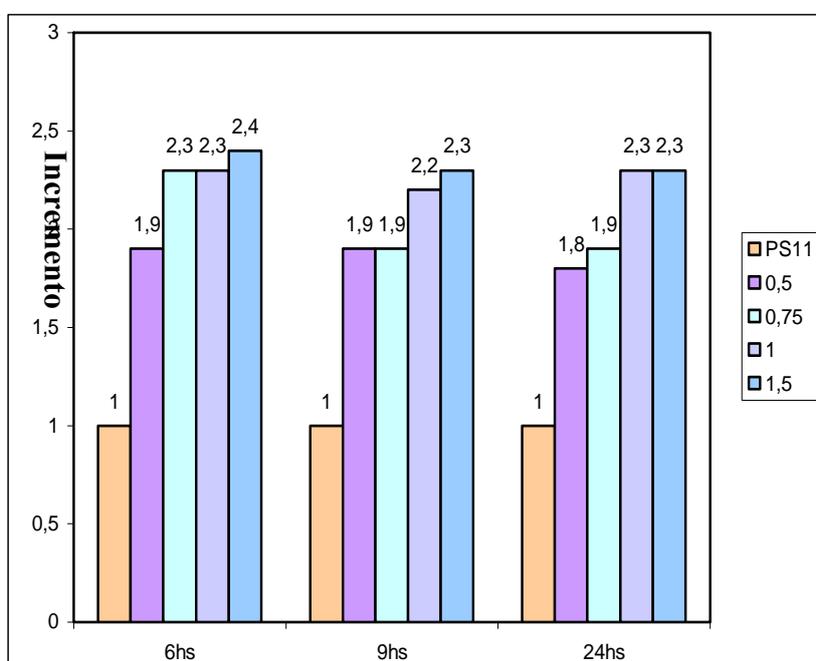


**Figura N° 34:** Incremento de la tolerancia al ciclohexano en función del tiempo para las cepas seleccionadas con diazepam a partir de la cepa origen PS7 (EC7/0,5; EC7/0,75; EC7/1; EC7/1,5).

**Tabla N° 38:** incremento en la tolerancia al ciclohexano para los mutantes seleccionadas con diazepam a partir de la cepa sensible PS11.

Podemos observar que los mutantes son de 1,9 a 3,1 veces más tolerantes que la cepa origen y AG100, que no toleran el ciclohexano.

Cepas Mutantes	Tiempo ( horas)		
	6	9	24
EC11/0,5	1,9	1,9	1,8
EC11/0,75	2,3	1,9	1,9
EC11/1	2,3	2,2	2,3
EC11/1,5	2,4	2,3	2,3
PS11/ AG100	1,0	1,0	1,0



**Figura N° 35:** Incremento de la tolerancia al ciclohexano en función del tiempo para las cepas seleccionadas con diazepam a partir de la cepa origen PS11 (EC11/0,5; EC11/0,75; EC11/1; EC11/1,5).

**8. Efecto del Salicilato de Sodio 5 mM en la tolerancia al ciclohexano de en las cepas mutantes de *E. coli* seleccionadas con Diazepam:**

Tablas 39 y 40, Figura N° 36

**CH: Ciclohexano; + SL: En presencia de Salicilato sódico 5 mM**

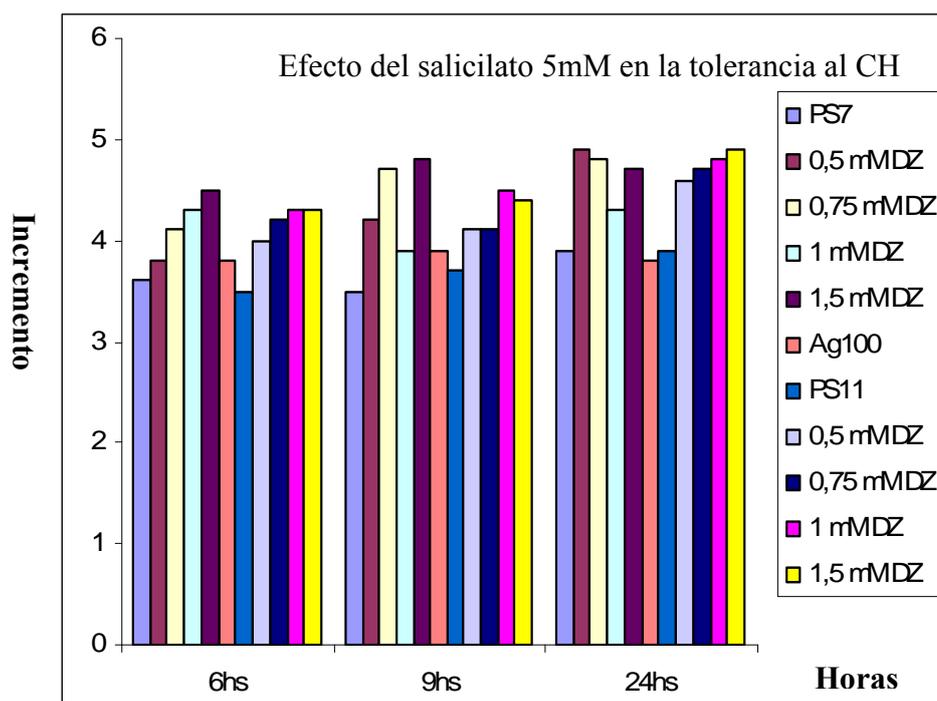
Incremento =	$\frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas}}{\text{(Abs. 3hs)}}$
en presencia de SL	$\frac{\text{(3, 6 y 24 horas posteriores al CH + SL)}}{\text{(Absorbancia en ausencia de CH + SL)}}$
Incremento =	$\frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas}}{\text{(Abs. 3hs)}}$
en ausencia de SL	$\frac{\text{(3, 6 y 24 horas posteriores al CH)}}{\text{(Absorbancia en ausencia de CH)}}$

**Tabla N° 39**

<b>Inducción con Salicilato de Sodio 5 mM</b>			
Cepas	Incremento en la Tolerancia al CH		
	6hs	9hs	24hs
<b>PS7</b>	3,6	3,5	3,9
0,5 mM DZ + SL	3,8	4,2	4,9
0,75 mM DZ + SL	4,1	4,7	4,8
1 mM DZ + SL	4,3	3,9	4,3
1,5 mM DZ + SL	4,5	4,8	4,7
AG100 + SL	3,8	3,9	3,8
<b>Sin inducción</b>			
<b>PS7</b>	1,3	1,4	1,4
0,5 mM DZ	1,8	1,9	1,9
0,75 mM DZ	1,9	2,2	2,3
1 mM DZ	2,5	2,5	2,8
1,5 mM DZ	2,6	3	2,8
AG100 inducida	1,1	1,0	1,0

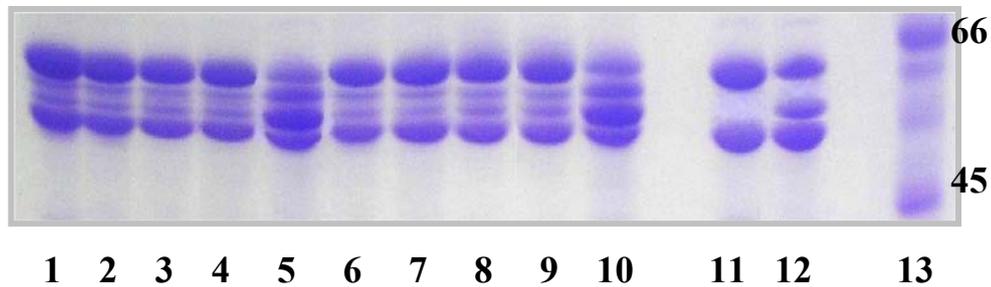
**Tabla N° 40**

<b>Inducción con Salicilato de Sodio 5 mM</b>			
<b>Cepas</b>	<b>Incremento en la Tolerancia al CH</b>		
	<b>6hs</b>	<b>9hs</b>	<b>24hs</b>
<b>PS11</b>	3,5	3,7	3,9
0,5 mM DZ + SL	4	4,1	4,6
0,75 mM DZ + SL	4,2	4,1	4,7
1 mM DZ + SL	4,3	4,5	4,8
1,5 mM DZ + SL	4,3	4,4	4,9
AG100+ SL	3,8	3,9	3,8
<b>Sin inducción</b>			
<b>PS11</b>	1,3	1,3	1,4
0,5 mM DZ	1,9	1,9	1,8
0,75 mM DZ	2,3	1,9	1,9
1 mM DZ	2,3	2,2	2,3
1,5 mM DZ	2,4	2,3	2,3
AG100 inducida	1,1	1,0	1,0



**Figura N° 36:** Representación del incremento en la tolerancia al ciclohexano en función del tiempo de las cepas origen y de las seleccionadas con diazepam bajo el efecto inductor de 5mM de salicilato. La cepa AG100 sin inducir no está representada en los gráficos.

## 9. Análisis de la expresión de la OmpF en mutantes seleccionados con diazepam



**Figura N° 37:** Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa de los mutantes seleccionados con diazepam mediante *SDS-PAGE* al 11 % suplementado con 4M de urea.

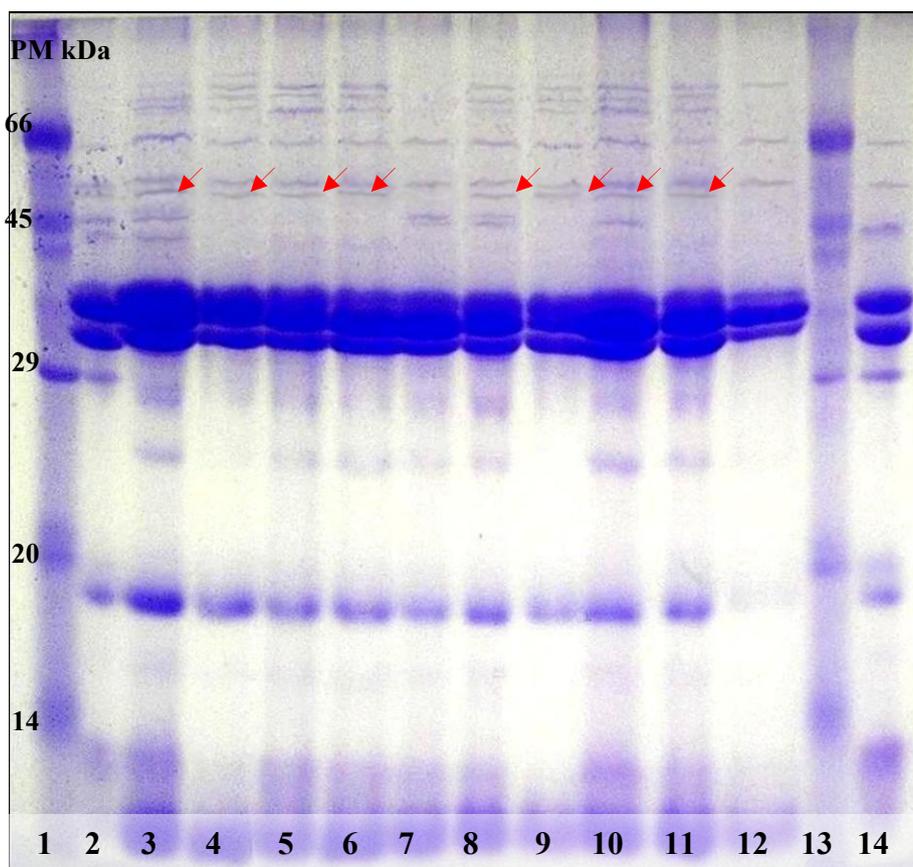
### Líneas:

- |   |   |
|---|---|
| 1. EC11/1,5 ( <i>E. coli</i> PS11<br>1,5mM)   | 8. EC7/0,75 ( <i>E. coli</i> PS7<br>0,75mM) |
| 2. EC11/1 ( <i>E. coli</i> PS11<br>1mM)       | 9. EC7/0,5 ( <i>E. coli</i> PS7<br>0,5mM)   |
| 3. EC11/0,75 ( <i>E. coli</i> PS11<br>0,75mM) | 10. PS7                                     |
| 4. EC11/0,5 ( <i>E. coli</i> PS11<br>0,5mM)   | 11. JF703 (OmpF deficiente)                 |
| 5. PS11                                       | 12. KL16                                    |
| 6. EC7/1,5 ( <i>E. coli</i> PS7<br>1,5mM)     | 13. PM                                      |
| 7. EC7/1 ( <i>E. coli</i> PS7 1mM)            |   |

**Tinción:** Imperial

**Marcador PM:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa)

## 10. Análisis de la expresión de TolC en gel de poliacrilamida



**Figura N° 38:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana externa (TolC) en gel de poliacrilamida al 12,5 % suplementado con SDS.

**Líneas:**

- |  |  |
|--|--|
| 1. PM                                      | 8. EC7/1 ( <i>E. coli</i> PS7 1mM)       |
| 2. EC11/1,5 ( <i>E. coli</i> PS11 1,5mM)   | 9. EC7/0,75 ( <i>E. coli</i> PS7 0,75mM) |
| 3. EC11/1 ( <i>E. coli</i> PS11 1mM)       | 10. EC7/0,5 ( <i>E. coli</i> PS7 0,5mM)  |
| 4. EC11/0,75 ( <i>E. coli</i> PS11 0,75mM) | 11. PS7                                  |
| 5. EC11/0,5 ( <i>E. coli</i> PS11 0,5mM)   | 12. PM                                   |
| 6. PS11                                    | 13. <i>E. coli</i> AG100                 |
| 7. EC7/1,5 ( <i>E. coli</i> PS7 1,5mM)     |  |

**Tinción Imperial**

**Marcador de peso molecular:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa)

## 11. Actividad enzimática de los extractos periplásmicos crudos

**Tabla N° 41** *Actividad enzimática de los extractos crudos de las cepas origen y mutantes sobre los sustratos Bencilpenicilina y Cefaloridina, expresados en nanomoles de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.*

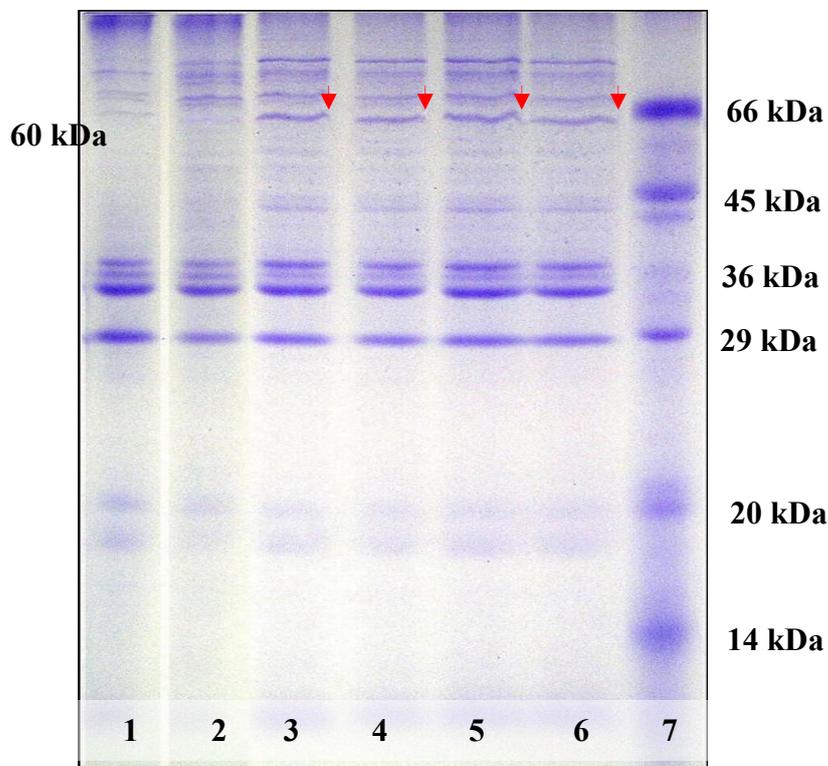
<b>Actividad en mU*/mg de proteína total</b>					
Sustrato	<b>PS7</b>	EC7/0,5	EC7/0,75	EC7/1	EC7/1,5
Bencilpenicilina 100 µM	700±45	731,1±55	698±34	664±8	712±16
Cefaloridina 100 µM	74,2±3	80,2±9	104,4±33	110,5±1	79,8±17

**Tabla N° 42**

<b>Actividad en mU*/mg de proteína total</b>					
Sustrato	<b>PS11</b>	EC11/0,5	EC11/0,75	EC11/1	EC11/1,5
Bencilpenicilina 100 µM	612 ± 17	744±5	646±31	712±9	625±18
Cefaloridina 100 µM	89±8	98 ± 9	104±17	131±20	85,4± 16

\*1 U representa: 1 µmol de sustrato hidrolizado por minuto y por ml de extracto.

**12. Análisis de proteínas de membrana interna con tinción imperial en cepas mutantes obtenidas por selección con diazepam y salicilato de sodio**

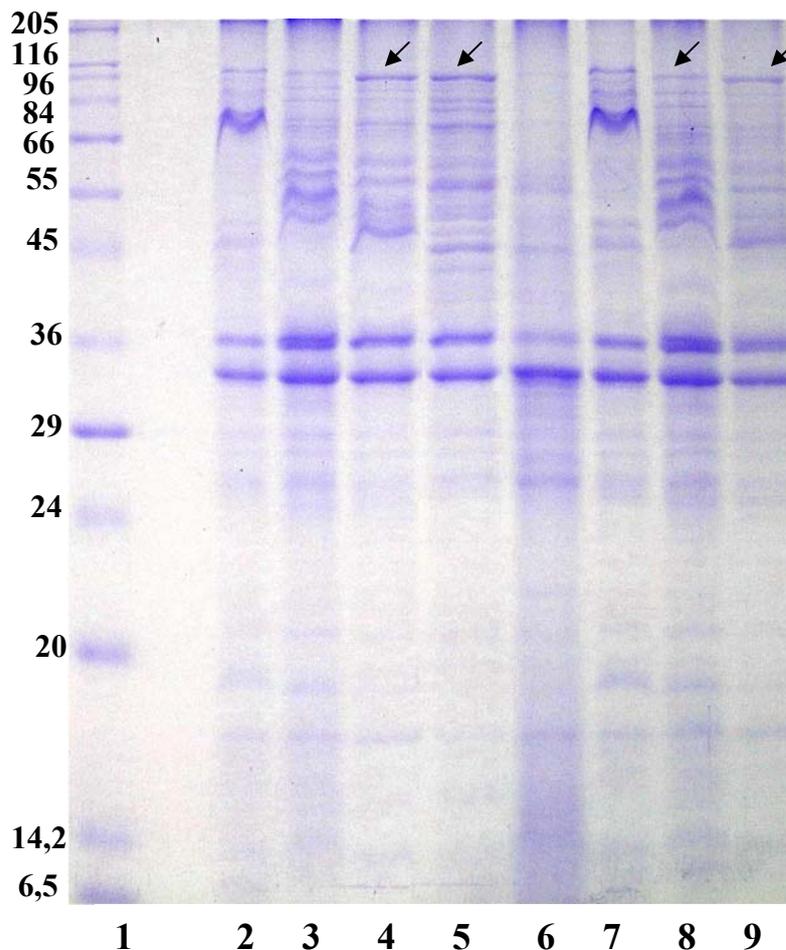


**Figura N° 39 A:** Perfil electroforético del extracto de proteínas de membrana interna en gel de poliacrilamida al 12, 5 % suplementado con SDS.

**Líneas:**

- |  |   |
|--|---|
| 1. PS7                                 | 6. EC11/80 ( <i>E. coli</i> PS11        |
| 2. PS11                                | 80mM salicilato)                        |
| 3. EC7/1,5 ( <i>E. coli</i> PS7 1,5 mM | 7. PM                                   |
| diazepam)                              |   |
| 4. EC11/1,5 ( <i>E. coli</i> PS11 1,5  |   |
| mM diazepam)                           |   |
| 5. EC7/80 ( <i>E. coli</i> PS7 80 mM   | <b>Tinción:</b> KIT de tinción Imperial |
| salicilato)                            |   |

**Marcador de peso molecular en kDa:** albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).



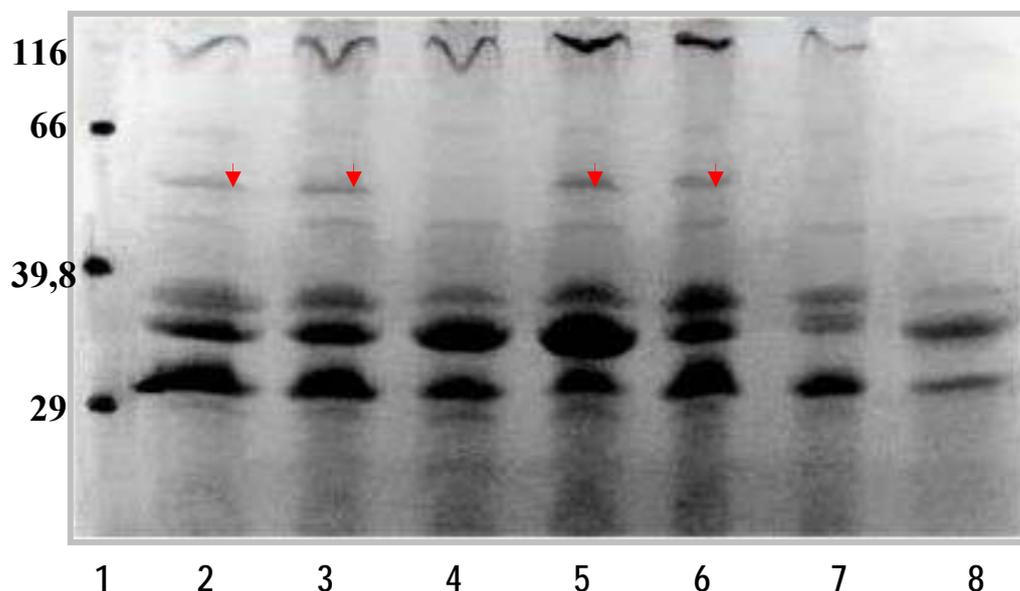
**Figura N° 39 B:** Perfil electroforético del extracto de proteínas de membrana interna en gel de poliacrilamida al 12, 5 % suplementado con SDS.

**Líneas:**

- |  |  |
|--|--|
| 1. PS7   | 6. EC11/0,5 ( <i>E. coli</i> PS11 0,5 mM diazepam) |
| 2. EC7/0,5 ( <i>E. coli</i> PS7 0,5 mM diazepam) | 7. EC11/1 ( <i>E. coli</i> PS11 1 mM diazepam)     |
| 3. EC/1 ( <i>E. coli</i> PS7 1 mM diazepam)      | 8. EC11/60 ( <i>E. coli</i> PS11 60 mM salicilato) |
| 4. EC/60 ( <i>E. coli</i> PS7 60 mM salicilato)  | 9. PM  |
| 5. PS11  |  |

**Marcador de peso molecular en kDa:** Miosina, músculo de conejo (205);  $\beta$ -galactosidasa, *E.coli* (116); fosforilasa b, músculo de conejo (97); fructosa 6 fosfato quinasa de músculo de conejo (84); albúmina bovina (66); albúmina de huevo (45); gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36); anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29); inhibidor de tripsina (20);  $\alpha$ -lactoalbumina, leche bovina (14,2); aprotinina, pulmón de conejo (6,5).

### 13. Detección de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) con Bocilina y luz UV en cepas mutantes obtenidas por selección con diazepam y salicilato de sodio



**Figura N° 40:** Gel de SDS-PAGE 12,5%.

**Líneas:**

1. PM
2. EC11/1,5 (*E. coli* PS11 1,5 mM diazepam)
3. EC11/80 (*E. coli* PS11 80mM salicilato)
4. PS11
5. EC7/1,5 (*E. coli* PS7 1,5 mM diazepam)
6. EC7/80 (*E. coli* PS7 80 mM salicilato)
7. PS7
8. AG100

**Detección:** Bocilina concentración y luz ultravioleta en ChemiDoc system (Biorad)

**PM:** Marcador de peso molecular Fluorescente (ver en capítulo de material y métodos)

## Salicilato de sodio

### 1. Selección de mutantes con salicilato de sodio:

La concentración mínima inhibitoria (CMI °) del salicilato sódico en la cepa origen PS7 y PS11 fue: **20 mM**

PS7	1º escalón selectivo 40mM	2º escalón selectivo 60mM	3º escalón selectivo 80mM	4º escalón selectivo 100mM
CMI	40	60	80	100
$\Delta$ CMI*	2	3	4	5
Frecuencia de selección	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$

Las cepas seleccionadas fueron denominadas de acuerdo a la concentración de salicilato de sodio utilizada en cada escalón selectivo:

- **EC7/40**
- **EC7/60**
- **EC7/80**
- **EC7/100**

\*  $\Delta$ CMI:  $CMI / CMI^\circ$ , siendo  $CMI^\circ$ : concentración mínima inhibitoria del Salicilato en la cepa origen, CMI: concentración inhibitoria mínima del Salicilato en la cepa mutante seleccionada en cada escalón selectivo

<b>PS11</b>	<b>1° escalón selectivo 20mM</b>	<b>2° escalón selectivo 40mM</b>	<b>3° escalón selectivo 60mM</b>
<b>CMI</b>	20	40	60
<b>ΔCMI*</b>	2	3	4
<b>Frecuencia de selección</b>	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$

Las cepas seleccionadas fueron denominadas de acuerdo a la concentración de salicilato de sodio utilizada en cada escalón selectivo:

- **EC11/40**
- **EC11/60**
- **EC11/80**
- **EC11/100**

\*  $\Delta CMI$ :  $CMI / CMI^{\circ}$  , siendo  $CMI^{\circ}$ : concentración mínima inhibitoria del Salicilato Sódico en la cepa origen,  $CMI$ : concentración inhibitoria mínima del Salicilato Sódico en la cepa mutante seleccionada en cada escalón selectivo

## 2. Susceptibilidad a antimicrobianos

- Susceptibilidad a antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las cepas mutantes seleccionadas con Salicilato de Sodio a partir de la cepa origen PS7

Tabla N° 43

<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>					
<b>Cepas</b>					
<b>Antimicrobiano</b>	<b>PS7</b>	<b>EC7/40</b>	<b>EC7/60</b>	<b>EC7/80</b>	<b>EC7/100</b>
<b>Ac. nalidíxico</b>	32	64	128	512	512
<b>Lomefloxacina</b>	0,5	2	2	2	2
<b>Norfloxacina</b>	0,12	0,5	1	1	2
<b>Cefalotina</b>	8	32	32	32	32
<b>Cefoxitina</b>	1	1	2	2	2
<b>Ceftazidima</b>	0,5	1	2	4	4
<b>Cefotaxima</b>	0,25	0,5	0,5	1	2
<b>Aztreonam</b>	0,5	0,5	1	2	2
<b>Imipenem</b>	0,25	0,5	0,5	1	1
<b>Cloranfenicol</b>	0,5	0,5	0,5	1	1
<b>Cefpirome</b>	1	1	1	2	2
<b>Tetraciclina</b>	64	128	128	128	128

- Susceptibilidad a antimicrobianos ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las cepas mutantes seleccionadas con salicilato de sodio a partir de la cepa origen PS11

Tabla N° 44

<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Cepas</b>				
<b>Antimicrobiano</b>	<b>PS11</b>	<b>EC11/40</b>	<b>EC11/60</b>	<b>EC11/80</b>
<b>Ac. nalidíxico</b>	16	64	128	128
<b>Lomefloxacina</b>	0,5	2	2	2
<b>Norfloxacina</b>	0,06	0,5	1	1
<b>Cefalotina</b>	8	16	32	32
<b>Cefoxitina</b>	1	2	2	2
<b>Ceftazidima</b>	0,5	1	1	2
<b>Cefotaxima</b>	0,25	1	1	2
<b>Aztreonam</b>	0,5	0,5	1	2
<b>Imipenem</b>	0,25	0,5	0,5	1
<b>Cloranfenicol</b>	0,25	0,5	1	1
<b>Cefpirome</b>	1	1	1	2
<b>Tetraciclina</b>	64	128	128	128

*\*Los datos numéricos expresan las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenidas utilizando la técnica de dilución en Agar para valorar la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos.*

### 3. Efecto del inhibidor de bombas de eflujo CCCP sobre la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos

**Tabla N° 45:** Efecto de CCCP 50  $\mu\text{M}$  en las CMI<sub>s</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los antimicrobianos en los mutantes seleccionadas con salicilato sódico a partir de la cepa PS7, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI°) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  CCCP (CMI+)

<b>Cocientes CMI°/CMI+</b>				
<b>Cepas</b>				
<b>Antimicrobiano</b>	<b>EC7/40</b>	<b>EC7/60</b>	<b>EC7/80</b>	<b>EC7/100</b>
<b>Ac. Nalidíxico</b>	2	2	8	8
<b>Lomefloxacina</b>	2	2	2	4
<b>Norfloxacina</b>	4	4	8	16
<b>Cefalotina</b>	2	2	4	4
<b>Cefoxitina</b>	2	2	2	4
<b>Ceftazidima</b>	2	2	4	4
<b>Cefotaxima</b>	2	2	2	4
<b>Aztreonam</b>	2	2	4	4
<b>Imipenem</b>	2	2	4	4
<b>Cloranfenicol</b>	2	2	4	8
<b>Cefpirome</b>	2	2	4	4
<b>Tetraciclina</b>	2	2	2	4

**Tabla N° 46:** Efecto de CCCP 50  $\mu$ M en las CMI<sub>s</sub> ( $\mu$ g/ml) de los antimicrobianos en los mutantes seleccionadas con salicilato sódico a partir de PS11, expresado como cociente entre la CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP (CMI<sup>0</sup>) y la CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP (CMI<sup>+</sup>)

<b>Cocientes CMI<sup>0</sup>/CMI<sup>+</sup></b>			
<b>Cepas</b>			
<b>Antimicrobiano</b>	<b>EC11/40</b>	<b>EC11/60</b>	<b>EC11/80</b>
<b>Ac. Nalidíxico</b>	2	4	8
<b>Lomefloxacina</b>	4	4	8
<b>Norfloxacina</b>	4	8	8
<b>Cefalotina</b>	2	2	2
<b>Cefoxitina</b>	2	2	2
<b>Ceftazidima</b>	2	2	2
<b>Cefotaxima</b>	2	2	4
<b>Aztreonam</b>	2	2	4
<b>Imipenem</b>	2	2	2
<b>Cloranfenicol</b>	4	8	8
<b>Cefpirome</b>	2	2	2
<b>Tetraciclina</b>	4	4	4

*CMI<sup>0</sup>: CMI del antimicrobiano en ausencia de CCCP*

*CMI<sup>+</sup>: CMI del antimicrobiano en presencia de 50  $\mu$ g/ml CCCP*

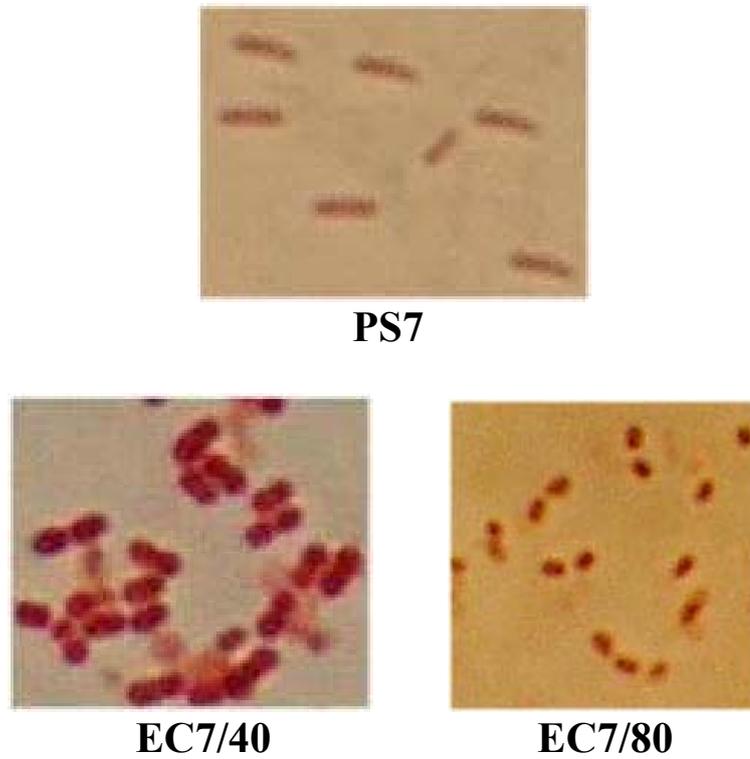
#### 4. Valoración de la susceptibilidad a Mitomicina C y efecto del CCCP sobre la CMI de la Mitomicina C

En la tabla se muestran los valores de CMI hallados para la Mitomicina C en las mutantes seleccionadas con diazepam y la CMI valorada en presencia de CCCP.

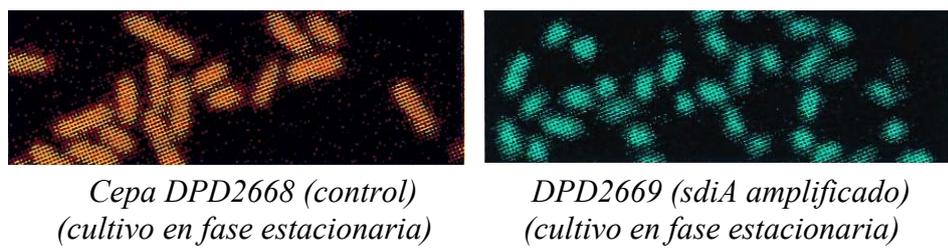
**Tabla N° 47:** valores de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) para Mitomicina C en mutantes de *E. coli* seleccionas con diazepam: MitC: Mitomicina C, CCCP: carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona

CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )								
Origen	Mutantes							
	40 mM	CCCP	60 mM	CCCP	80 mM	CCCP	100 mM	CCCP
PS7	4	4	4	4	4	4	4	4
PS11	4	4	8	8	8	8	-	-

**5. Valoración de cambios en la morfología de los mutantes respecto de las cepas origen**



**Fig. 41:** Imágenes de la morfología de los mutantes seleccionados con salicilato y de la cepa origen PS7



**Wei Y. y cols., 2001**

*Examen microscópico del cultivo de una noche de la cepa DPD2669 portadora de sdiA amplificado*

## Tabla resumen de cambios morfológicos

**Tabla N° 48:** *Tabla resumen de los cambios morfológicos observados en microscopía óptica con la tinción de Gram y en fresco de las cepas mutantes seleccionadas con diazepam o salicilato sódico a partir de las cepas PS7 y PS11.*

Cepa	Tinción de Gram	Fresco
<b>PS7</b>	+++	+++
<b>EC7/0,5</b>	++	++
<b>EC7/1</b>	+	+
<b>EC7/1,5</b>	+	+
<b>EC7/40</b>	++	++
<b>EC7/60</b>	+	+
<b>EC7/80</b>	+	+

Cepa	Tinción de Gram	Fresco
<b>PS11</b>	+++	+++
<b>EC11/0,5</b>	++	++
<b>EC11/1</b>	+	+
<b>EC11/1,5</b>	+	+
<b>EC11/40</b>	++	++
<b>EC11/60</b>	+	+
<b>EC11/80</b>	+	+

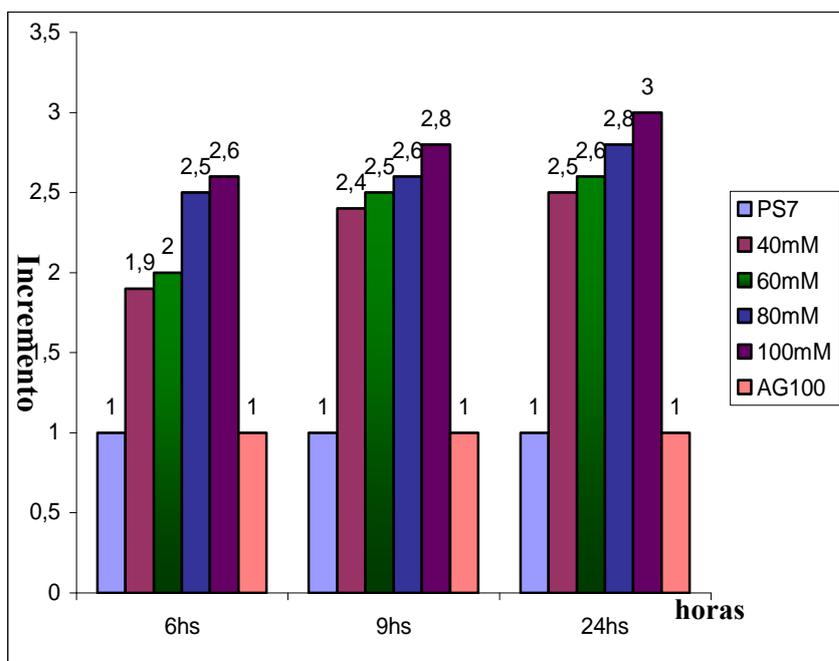
## 6. Resultados de la valoración de la tolerancia al ciclohexano en los mutantes seleccionados con salicilato sódico.

En la tabla N° 49 y 50 (figura N° 42 y 43) se observa la relación entre los valores de absorbancia obtenidos en las cepas mutantes respecto al de la cepa origen en presencia de ciclohexano, en función del tiempo. Podemos observar que los mutantes son de 1,9 a 3,1 veces más resistentes al ciclohexano que sus cepas origen.

$$\text{Incremento} = \frac{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas de la cepa mutante en presencia de CH}}{\text{Abs.6 horas o 9 horas o 24 horas de la cepa origen en presencia de CH}}$$

**Tabla N° 49:** incrementos en la tolerancia al ciclohexano de los mutantes seleccionados con salicilato de sodio a partir de la cepa origen PS7. Observamos que los mutantes son 1,9 a 3 veces más tolerantes que la cepa origen y AG100, dichas cepas no toleran el ciclohexano.

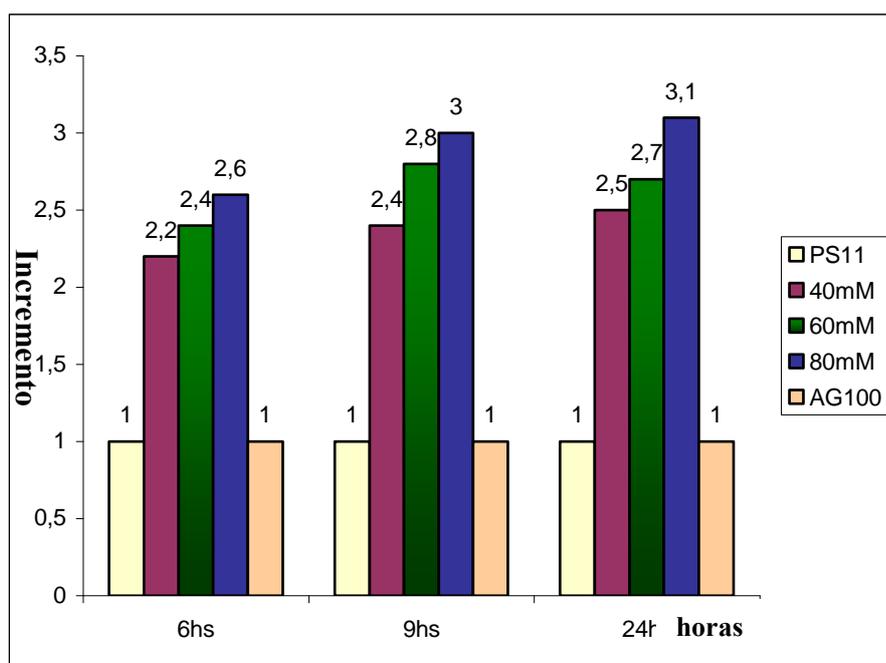
Cepas Mutantes	Tiempo (horas)		
	6 horas	9 horas	24 horas
PS7	1,0	1,0	1,0
EC7/40	1,9	2,4	2,5
EC7/60	2	2,5	2,6
EC7/80	2,5	2,6	2,8
EC7/100	2,6	2,8	3
AG100	1,0	1,0	1,0



**Figura N° 42.**

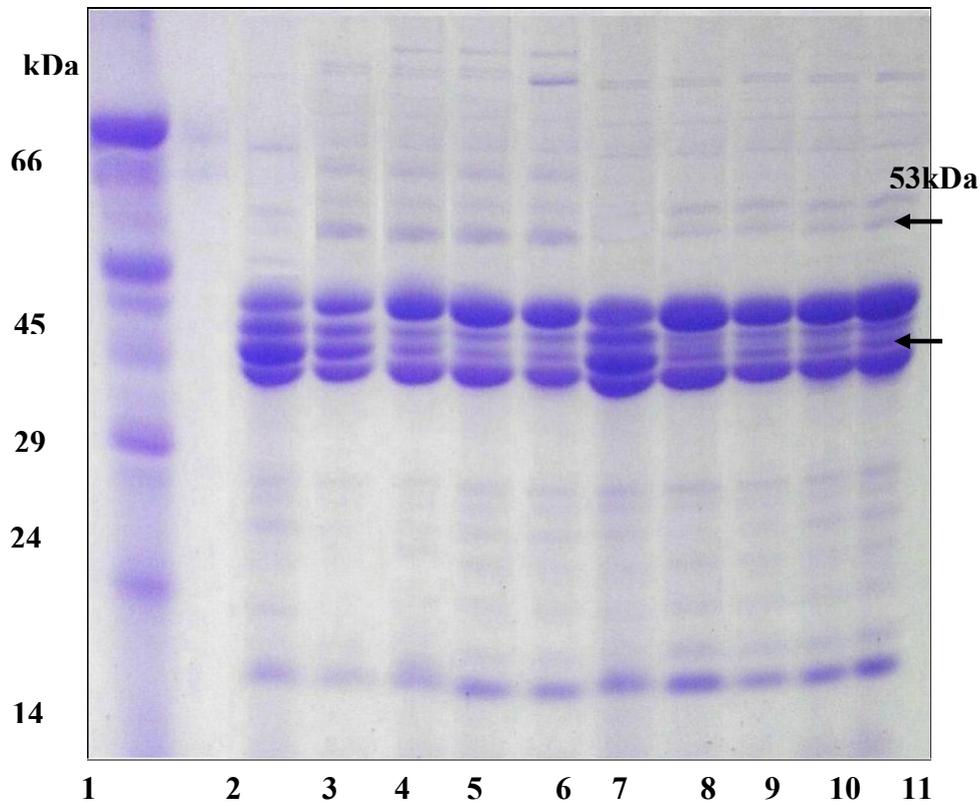
**Tabla N° 50:** incrementos en la tolerancia al ciclohexano de los mutantes seleccionados con salicilato de sodio a partir de la cepa origen PS11. Observamos que los mutantes son 2,2 a 3,1 veces más tolerantes que la cepa origen y AG100, dichas cepas no toleran el ciclohexano.

Cepas Mutantes	Tiempo (horas)		
	6 horas	9 horas	24 horas
PS11	1,0	1,0	1,0
EC11/40	2,2	2,4	2,5
EC11/60	2,4	2,8	2,7
EC11/80	2,6	3	3,1
AG100	1,0	1,0	1,0



**Figura N° 43**

## 7. Análisis de la expresión de las proteínas de membrana externa de los mutantes seleccionados con Salicilato Sódico en geles de poliacrilamida



**Figura N° 44:** Perfil electroforético de los extractos de proteína de membrana externa en gel de poliacrilamida al 11 % suplementado con SDS y 4 M de Urea.

### Líneas:

1. PM
2. PS7
3. EC7/40 (*E. coli* PS7 40mM salicilato)
4. EC7/60 (*E. coli* PS7 60mM salicilato)
5. EC7/80 (*E. coli* PS7 80mM salicilato)
6. EC7/100 (*E. coli* PS7 100mM salicilato)
7. PS11
8. EC11/40 (*E. coli* PS11 40mM salicilato)
9. EC11/60 (*E. coli* PS11 60mM salicilato)

10. EC11/80 (*E. coli* PS11 80mM salicilato)
11. EC11/80 (*E. coli* PS11 80mM salicilato).

### **Tinción:** Imperial

**PM:** Marcador de peso molecular: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), Tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa).

## 8. Resultados de la actividad hidrolítica de los extractos crudos

*Actividad enzimática de los extractos crudos de las cepas origen y mutantes sobre los sustratos Bencilpenicilina y Cefaloridina, expresados en nanomoles de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. ND: no se detecta actividad hidrolítica sobre los sustratos utilizados.*

**Tabla N° 51**

<b>Actividad en mU/mg de proteína total</b>					
<b>Sustrato</b>	<b>PS7</b>	<b>EC7/40</b>	<b>EC7/60</b>	<b>EC7/80</b>	<b>EC7/100</b>
<b>Bencilpenicilina 100 µM</b>	700±45	725±30	670±29	718±3	597±18
<b>Cefaloridina 100 µM</b>	74,2±3	87±10	69±8	78±9	101±3

**Tabla N° 52**

<b>Actividad en mU/mg de proteína total</b>				
<b>Sustrato</b>	<b>PS11</b>	<b>EC11/40</b>	<b>EC11/60</b>	<b>EC11/80</b>
<b>Bencilpenicilina 100 µM</b>	612 ± 17	628±15	519±20	490±12
<b>Cefaloridina 100 µM</b>	89±8	100±11	78±5	95±7

\*1 U representa: 1 µmol de sustrato hidrolizado por minuto y por ml de extracto.

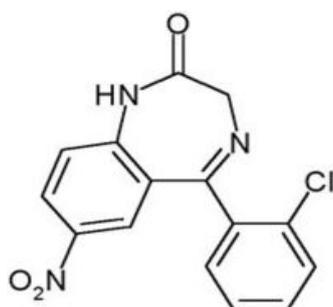
# DISCUSIÓN

**Inducción de fenotipos de multirresistencia en la cepa de *E. coli***  
**AG100 con salicilato de sodio y nueve fármacos no antimicrobianos**  
**utilizados en cirugía**

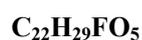
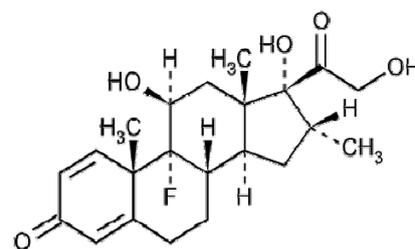
Trabajos previos han descrito una respuesta inmune deficitaria e infecciones refractarias en pacientes como efectos secundarios a los tratamientos con benzodiazepinas y anestésicos, así como con drogas antiinflamatorias como la dexametasona, fundamentalmente en cirugía (Kress HG., 1992; Hensler T., 1997). El Diazepam (una benzodiazepina) ha sido recientemente identificado como un inductor dosis dependiente del fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos en cepas sensibles de *E. coli* AG100 (Tavío MM. y cols, 2004). En el mismo trabajo se confirmó que también la inducción de fenotipos de multirresistencia por salicilato y benzoato sodio en la misma cepa era concentración-dependiente. En ambos casos el fenotipo de multirresistencia se caracterizó por la disminución o total desaparición de la porina F así como un incremento del eflujo activo de norfloxacin, condicionando ambos cambios una disminuida susceptibilidad a antimicrobianos que son sustratos de bombas de expulsión y/o utilizan la porina F como canal preferente de entrada en la célula bacteriana (Tavío MM. y cols, 2004). Ésto nos llevó a estudiar la posible inducción del fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos en *E. coli* AG100 utilizando medicamentos usados como pre-anestésicos o medicación de post-quirúrgica, por lo que para este estudio empleamos nueve fármacos no antimicrobianos: clonazepan, ketorolaco, clorpromazina, dexametasona, haloperidol, metamizol, diclofenaco, fenobarbital, propacetamol.

## Formulas químicas de los compuestos utilizados en este estudio

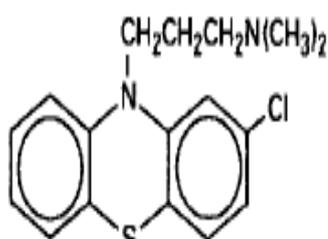
### Clonazepam



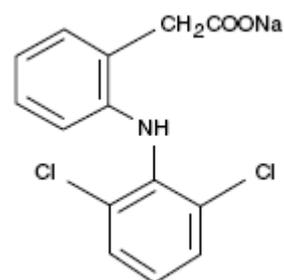
### Dexametasona



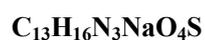
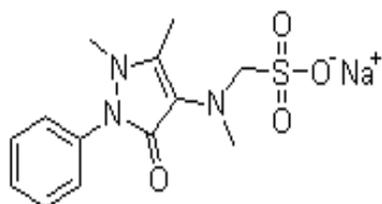
### Clorpromazina



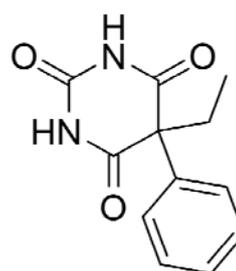
### Diclofenaco



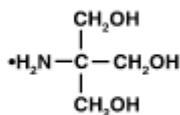
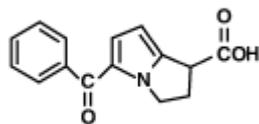
### Dipirona o Metamizol



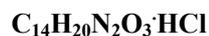
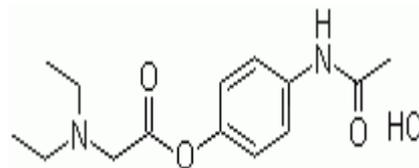
### Fenobarbital



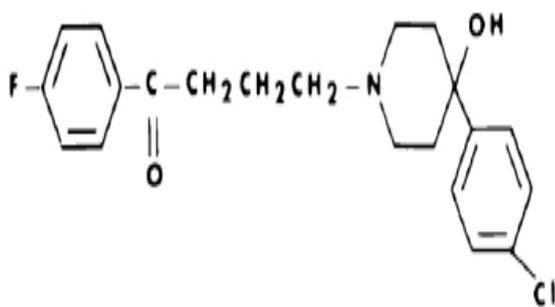
### Ketorolaco



### Propacetamol



### Haloperidol



Todos estos compuestos presentan una estructura compleja con anillos aromáticos. Al analizar sus estructuras podemos llegar a clasificarlos en 3 grupos: esteroides (dexametasona), di-aril-amina (diclofenaco) y compuestos aril-heterociclos (clonazepam, clorpromazina, metamizol, fenobarbital, ketorolaco, haloperidol) (*Morrison y Boy, ed. 1998; Remington ed., 2003; Ege S. ed. 1998*)

## Inducción de la Disminución de Permeabilidad de la Pared Bacteriana

Se observó que la expresión de la porina F en la membrana externa bacteriana disminuye cuando se induce a la cepa de *E. coli* AG100 con concentraciones subinhibitorias comprendidas entre 1/4 y 1/128 de las CMI de cualquiera de los nueve medicamentos estudiados, al igual que lo descrito anteriormente para fármacos como el diazepam o para el benzoato utilizando la misma cepa que en este estudio (Tavío MM. y cols, 2004). Así concentraciones  $\geq 1/16$  de la CMI de haloperidol,  $\geq 1/32$  de la CMI de clonazepam, ketorolaco, clorpromazina, fenobarbital, propacetamol, diclofenaco,  $\geq 1/128$  de la CMI de dexametasona, metamizol (dipirona), inducen en la AG100 un perfil de proteínas de membrana externa (OMP) similar al de la cepa *E. coli* AG112 (mutante *marR* derivado de *E. coli* AG100). Sin embargo, esto no sucede cuando se utilizan concentraciones de los medicamentos inferiores a las antes mencionadas. Obtuvimos un efecto similar en la expresión de OmpF cuando sometimos a *E. coli* AG100 a la acción del salicilato a concentraciones comprendidas entre 0,16; 0,32; 0,63, 1,25; 2,5 o 5 mM, concentraciones que son equivalentes a 1/128 - 1/4 de la CMI del salicilato en la AG100. Demostrándose así un efecto dependiente de la concentración de la droga en la disminución en la permeabilidad de la membrana inducido en la cepa AG100 por los nueve fármacos ensayados, tal como se había descrito previamente en el caso del salicilato y diazepam (Tavío MM. y cols, 2004).

Con respecto a la susceptibilidad a antimicrobianos, observamos que concentraciones comprendidas entre 1/64 y 1/4 de los medicamentos estudiados incrementaban de 2 a 32 veces las CMI de cefoxitina, ácido nalidíxico, norfloxacin, tetraciclina y cloranfenicol, similar al resultado obtenido utilizando concentraciones equivalentes a 1/64 y 1/4 de la CMI de salicilato en la cepa AG100. Además concentraciones 0,156 mM de salicilato (1/128), 5 mM de metamizol (1/128) y 0,039 mM de dexametasona (1/128) también disminuyeron de 2 a 4 veces la susceptibilidad de la cepa AG100 a los antibióticos ensayados.

Estos resultados se deben en parte a la disminución de la expresión de la porina F tal como ha sido descrito en trabajos previos, en los que se observó que la alteración de permeabilidad de la membrana externa por pérdida de dicha porina contribuía a incrementar la resistencia a antibióticos no relacionados

estructuralmente como quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina (*Komatsu T. y cols, 1991*). Sin embargo, bajo el efecto de concentraciones menores a 1/128 de la CMI de cada uno de los medicamentos estudiados no se observaron diferencias en la susceptibilidad de la cepa AG100 a los antibióticos testados respecto de la misma cepa sin inducir (*Komatsu T. y cols, 1991*).

*Tavío MM. y cols.-1999* compararon la sensibilidad de *E. coli* KL16 (cepa salvaje sensible) con la cepa JF703 (mutante exclusivamente deficiente en OmpF), observando que la pérdida de dicha porina contribuía a incrementar la CMI del ácido nalidíxico en 2 veces, de 2- 4 veces la CMI de norfloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina y 2 veces las CMI de tetraciclina y cefalotina. Sin embargo, al comparar éstos resultados con los obtenidos en este estudio mediante la inducción de los fármacos antes mencionados observamos que los incrementos en las CMI fueron muy superiores (2-32 veces), lo que nos sugiere que la cepa AG100 bajo el efecto de cualquiera de los fármacos ensayados expresa otros mecanismos de resistencia, además de la pérdida de OmpF.

De la misma forma *Cohen SP. y cols., 1993* valoraron el efecto de 5 mM de salicilato sobre la cepa sensible AG100 y una mutante *mar* derivada de la anterior carente de la porina F(AG100-Tc2.5-1), observando que en ausencia del inductor la mutante *mar* era de 2,7 a 4,8 veces más resistente a tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina que la cepa sensible AG100, pero en presencia de salicilato 5mM las CMI de dichos fármacos son eran sólo 1,5 a 1,9 veces superiores en la Mutante *mar* que en la cepa AG100, sugiriendo que ante la presencia de este inductor la cepa AG100 muestra un patrón de sensibilidad similar al de AG100-Tc2.5-1 (mutante *mar* que expresa el fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos).

En este trabajo de tesis, las CMI de los agentes antimicrobianos ensayados en la cepa AG100 crecida en presencia de salicilato o con cualquiera de los nueve medicamentos eran más altas que las de la cepa AG112 (mutante *marR*) no inducida (cultivada en ausencia medicamentos o salicilato), ello también sugiere que otros mecanismos de resistencia, diferentes a la pérdida de OmpF, también pueden estar activados bajo la inducción con cualquiera de los medicamentos, tal como se describió para el salicilato, benzoato sódico y diazepam (*Tavío MM. y cols., 2004*). Por lo tanto, está justificada la valoración de un posible incremento de eflujo activo de antimicrobianos bajo el efecto inductor de los fármacos ensayados.

## **Inducción de la Expulsión o Eflujo Activo de Antimicrobianos**

La mayor inducción del operón *marRAB* se ha descrito con una concentración de salicilato equivalente a 1/4 de la CMI (5 mM) (Cohen SP. y cols., 1993). Por lo que para simplificar el estudio del efecto de los nueve fármacos en los ensayos de acumulación intracelular de norfloxacin, se utilizaron concentraciones equivalentes a 1/4 de las CMIs de las drogas en estudio. Los resultados de este estudio confirmaron que la pérdida de la OmpF en la cepa AG100 por la acción de 1/4 de la CMI de los diferentes medicamentos estuvo acompañada de una disminución del 69,3 a un 90 % en la acumulación de norfloxacin. El clonazepan y dexametasona produjeron la mayor disminución en la acumulación de norfloxacin equivalente a la producida por una concentración 5 mM de salicilato sobre la cepa AG100. Por su parte, los siete medicamentos restantes redujeron la acumulación de norfloxacin entre 69,3-82 %, alcanzándose un nivel de intracelular de norfloxacin no superior al observado en la cepa AG112.

Tavío MM. y cols, 2004 utilizando 1/4 de la CMI de diazepam y benzoato de sodio obtuvieron una disminución de la acumulación de norfloxacin de 84,3% y 86,4% respectivamente utilizando la cepa AG100, dichos resultados fueron similares a los que produce una concentración 5 mM de salicilato (90%) sobre la misma cepa. Éstos datos coinciden con resultados anteriores sobre la respuesta fluoroquinolonas en mutantes *mar* derivadas de la cepa AG100, en donde la acumulación de norfloxacin disminuyó entre 36,9% y 84% con respecto a la cepa origen, en dicho trabajo los mutantes multirresistentes que mostraron la menor acumulación sobre-expresaban el gen *marA* y presentaban mutaciones en *gyrA* (Oethinger M. y cols., 2000).

En este trabajo de tesis, cuando 50 o 100  $\mu$ M CCCP fueron añadidos para disipar la fuerza de protón motriz, la acumulación de norfloxacin aumentó en orden de 2 veces con los medicamentos utilizados a excepción de fenobarbital para el que el incremento obtenido fue de 7 veces, similar a lo que ocurre cuando este inhibidor de bombas protón dependientes es usado en cepas que tienen el operón *marRAB* activado en las que también se observó un incremento en la acumulación de norfloxacin en 2 veces con respecto a la cepa sin CCCP (Oethinger M. y cols., 2000).

Sin embargo, la acumulación intracelular de norfloxacin en la cepa AG100 crecida en presencia de los fármacos ensayados y estimuladas por CCCP, era siempre menor que en la observada en la cepa AG100 no inducida ni energizada por CCCP. Los resultados obtenidos fueron de 2 a 6,6 veces menor que los hallados con la cepa AG100, a excepción del fenobarbital en donde la diferencia sólo fue de 1,3 veces. Ésto probablemente es debido a que la pérdida OmpF inducida por los medicamentos disminuye la permeabilidad externa de pared bacteriana a norfloxacin, sugiriendo además que el fenobarbital sería el medicamento que menos efecto tendría sobre la permeabilidad de la pared bacteriana a dicho antimicrobiano. Los datos obtenidos por *Tavío MM. y cols., 2004* muestran el mismo comportamiento, en este artículo se describió cómo al inducir cepas de *E. coli* AG100 con diazepam y benzoato de sodio en presencia de CCCP, la acumulación de norfloxacin era de 2-2,6 veces menor que la que presenta la cepa AG100 en la cepa AG100 no inducida ni energizada por CCCP.

Además, la disminución en la acumulación de norfloxacin fue concomitante con el incremento de 4-32 veces en la CMI a norfloxacin, ésto concuerda con lo que se describió anteriormente para la CMI de ciprofloxacina (16-133 veces) en diferentes mutantes multirresistentes derivadas de *E. coli* AG100 (*Oethinger M. y cols., 2000*) y para la CMI de norfloxacin en la cepa AG100 con el fenotipo de multirresistencia inducido por drogas como diazepam, benzoato de sodio y salicilato (*Tavío MM. y cols., 2004*).

Según los resultados de esta tesis, las concentraciones subinhibitorias de cualquiera de los nueve medicamentos ensayados así como de salicilato (1/128-1/4 de su CMI en la cepa AG100) reprimieron la síntesis OmpF en la cepa salvaje ya mencionada y disminuyeron su sensibilidad a agentes antimicrobianos, que son sustratos de bombas de eflujo y / o llegan al espacio periplásmico a través de la porina F. De la misma manera, 1/4 de las CMIs de los nueve fármacos en la cepa AG100 así como el salicilato también indujeron el eflujo activo y el desarrollo de fenotipo de multirresistencia en la misma cepa. En este sentido datos previos describen que concentraciones de salicilato comprendidas entre 0,5 y 10 mM (equivalentes a 1/40 y 1/2 de la CMI de la cepa AG100) inducen marcadamente la expresión del operón *marRAB*, mientras que a concentraciones entre 0,01 y 0,1 mM (equivalen a 1/256 y 1/2048 de la CMI del salicilato de la AG100) muestran poco o ningún efecto sobre este operón (*Cohen SP. y cols., 1993*), avalando así nuestros

resultados puesto que encontramos efecto inductor en el rango de concentraciones comprendidas entre 1/4 (5 mM) y 1/128 de la CMI (0,156 mM) del salicilato en la cepa AG100.

Para corroborar la presencia de eflujo activo en la cepa AG100 inducida con los nueve fármacos y que dicha expresión también es dependiente de la dosis utilizada, valoramos el efecto del CCCP sobre las CMIs de ácido nalidíxico, norfloxacin, cefoxitina, cloranfenicol y tetraciclina, en presencia de dos concentraciones inductivas: 1/4 y 1/128 de las CMIs de dichos fármacos. Resultando que ante la presencia del CCCP y en presencia de 1/4 de las CMIs de los diferentes inductores se produjo un aumento en la sensibilidad de 2-8 veces para todos los fármacos ensayados (clonazepam, ketorolaco, clorpromazina, dexametasona, haloperidol, metamizol, diclofenaco, fenobarbital, propacetamol).

No se encontró disminución en las CMIs de los antimicrobianos ensayados bajo la inducción con 1/128 de las CMIs de diclofenaco, clorpromazina, propacetamol, ketorolaco, haloperidol, fenobarbital, clonazepam, mientras que se observó un incremento en la sensibilidad de 2-4 veces en la sensibilidad cuando se utilizaba 1/128 de las CMIs de metamizol, dexametasona y salicilato. Esto se correlaciona con lo observado en el perfil de sensibilidad antibiótica resultante de la inducción con 1/128 de las CMIs de los fármacos ensayados. Observamos que la AG100 ante la inducción con 1/128 de las CMIs de los fármacos ensayados tiene el mismo perfil de sensibilidad antibiótica que la cepa AG100 sin inducir, excepto para metamizol, dexametasona y salicilato que producen un incremento de 2 veces en las CMIs de los antimicrobianos en 1/128 de su CMI.

Estos resultados corroboran también la presencia de sistemas de eflujo protón-dependientes contribuyendo en parte a los incrementos en la resistencia a los antimicrobianos ensayados, y que la expresión de estos sistemas también dependió de la dosis utilizada.

## **El Aumento de la Tolerancia al Ciclohexano bajo Inducción con Medicamentos de Uso Clínico**

La inducción del operón *marRAB* conduce a la hiperexpresión de MarA pero además de esta proteína se han identificado en *E. coli* otros tres reguladores globales (SoxS, Rob, SdiA) involucrados en el incremento del eflujo activo y/o disminución del influjo de antimicrobianos a la célula bacteriana (*Giuliodori AM., y cols., 2007*).

Los sistemas de eflujo activo no sólo expelen antimicrobianos al exterior sino compuestos que resultan tóxicos para la célula entre los que se encuentran los solventes orgánicos. Sabemos que existe una estrecha relación entre la tolerancia a los solventes orgánicos y el eflujo activo, ya que TolC es canal externo común para múltiples bombas de eflujo activo a la vez que responsable de la tolerancia al ciclohexano en *E. coli* (*Koronakis V. y cols., 2004; Ramos J. y cols., 2002; Hayashi S. y cols., 2003; Aono R. y cols., 1998; Kobayashi K., 2001*), por lo que el incremento en la tolerancia al ciclohexano puede utilizarse como un marcador de la presencia de sistemas activos de expulsión de drogas, y nos orienta ante la presencia de cepas con fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos (*Hiroyuki A. y cols., 1997; Aono R. y cols., 1998; Giuliodori AM y cols., 2007*). A su vez, el incremento de la tolerancia a dicho solvente es un claro indicio de la hiperexpresión de esta porina en la membrana externa bacteriana (*Aono R. y cols., 1998, Asako H. y cols., 1999*).

Como se mencionó anteriormente, igual que fue previamente descrito para el salicilato y el diazepam los nueve fármacos ensayados incrementan la resistencia a antibióticos no relacionados estructuralmente, y esta inducción es dependiente de la dosis o concentración utilizada. Estos resultados se correlacionan con los que hallamos cuando valoramos el incremento en la tolerancia al ciclohexano en presencia de salicilato de sodio y de los nueve fármacos en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/512 de sus CMIs en la cepa *E. coli* AG100. Podemos observar que la cepa AG100 crecida en presencia de los medicamentos estudiados en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/128 de la CMI de cada uno de ellos fueron de 3,8 veces más tolerantes al ciclohexano que la cepa origen.

El mayor incremento en la tolerancia al ciclohexano fue obtenido utilizando 1/4 de la CMI de todos los medicamentos ensayados y como era de esperar el

mayor valor de incremento en la tolerancia al ciclohexano (3,8-4,5) fue obtenido con el salicilato de sodio en 1/4 de su CMI (5 mM), lo que concuerda con el hallazgo ya descrito de la máxima inducción del operón *marRAB* por salicilato en una concentración 5 mM (*Cohen SP. y cols., 1993*). Incrementos de 2,5 a 2,7 fueron obtenidos con 1/4 de la CMI de metamizol, ketorolaco, haloperidol, clorpromazina, clonazepam, dexametazona y diazepam, a excepción del diclofenaco que incrementó 3,4 veces la tolerancia al ciclohexano con 1/4 de su CMI, acercándose al valor de tolerancia al observado en la cepa AG100 inducida con salicilato 5 mM. Asimismo se observó que la tolerancia al ciclohexano disminuyó a medida que disminuyó la concentración del medicamento en estudio, de manera que a concentraciones  $\leq 1/64$  de la CMI para haloperidol y  $\leq 1/128$  de la CMI del resto de los fármacos no se produjo incremento en la tolerancia al ciclohexano, apreciándose el mismo comportamiento frente al ciclohexano que la cepa AG100 sin inducir. Estos datos se correlacionan con los hallados para la inducción con salicilato de sodio, donde observamos que a concentraciones  $\leq 1/128$  de la CMI, la cepa AG100 inducida no tolera el ciclohexano al igual que la cepa AG100 no inducida, así *Asako H. y cols.* en 1997 publicaron que la exposición a 0,5 mM de salicilato no tenía efecto sobre la tolerancia al ciclohexano en la cepa de *E. coli* utilizada en su estudio.

Si comparamos estos resultados con los encontrados en la valoración de la susceptibilidad antibiótica bajo el efecto inductor de concentraciones equivalentes a 1/128 de las CMIs de los medicamentos en estudio (excepto al haloperidol), encontramos que la cepa AG100 expresa prácticamente la misma susceptibilidad antibiótica que la cepa sensible sin inducir, excepto con haloperidol que a una concentración 1/64 sólo incrementa 2 veces su resistencia a tetraciclina y por debajo de esta concentración la cepa inducida expresa la misma susceptibilidad que la cepa AG100 sin inducir, lo que concuerda con el hecho de que a partir de esta concentración la cepa no es más tolerante al ciclohexano, sugiriendo la importancia del eflujo activo en la tolerancia al ciclohexano y en la resistencia a antimicrobianos.

En el análisis de las proteínas de membrana externa observamos que se produce el incremento en una banda en torno a los 53Kda. que se corresponde a la que *Aono R. y cols, 1998* describen como TolC usando la misma metodología. Además podemos observar que dicha expresión también es dependiente de la dosis

del medicamento utilizada para la inducción de la cepa AG100. El análisis de los estos geles reveló que esta banda tiene la mayor expresión cuando se induce a la cepa con 1/4 de la CMI de cada uno de los medicamentos ensayados, al igual que lo que ocurre con salicilato 5 mM y ésto se correlaciona con el hecho de que a esta concentración se produce el mayor incremento en la tolerancia al ciclohexano. Asimismo podemos observar que la intensidad de dicha banda va disminuyendo a medida que nos acercamos a concentraciones comprendidas entre 1/64 y 1/128 de la CMI. Con concentraciones menores a estas últimas el perfil de proteínas de membrana externa se asemeja al de la cepa AG100 sin inducción.

Estos resultados concuerdan con los anteriormente expuestos puesto que a partir de estas concentraciones la cepa AG100 inducida con los medicamentos vuelve a adquirir la misma sensibilidad que la cepa origen, no incrementa la tolerancia al ciclohexano, y expresa la OmpF en su membrana externa.

## **Relevancia Clínica de los Resultados**

La medicación utilizada tanto antes como después de una cirugía tiene como finalidad reducir la ansiedad de los pacientes, prevenir complicaciones en la anestesia, proporcionar amnesia anterógrada y retrógrada, prevenir efectos indeseables de algunos fármacos en la anestesia, proporcionar analgesia pre y post operatoria, prevenir la liberación de histamina en pacientes predispuestos y generar profilaxis de infecciones que se pueden desarrollar durante el proceso quirúrgico. Para intentar reducir la ansiedad, los medicamentos más utilizados son las benzodiazepinas como el diazepam o clonazepam, que producen relajación muscular central y amnesia. Hay que mencionar que dicho medicamento hoy en día suele ser usado crónicamente para el tratamiento de fobias y ansiedades (*Romero-Ruiz y cols., 2006*). En cuanto a la analgesia tanto pre como post-operatoria se suelen utilizar analgésicos como diclofenaco, salicilato, paracetamol, propacetamol, ketorolaco o metamizol (dipirona) que tienen una eficacia suficiente, reservando los derivados de los opiáceos para casos de dolor intenso. Además suelen utilizarse medicamentos co-adyuvantes de anestesia como el fenobarbital o clorpromazina o co-adyuvantes para el tratamiento del dolor crónico como el haloperidol. La dexametasona es un corticosteroide de acción local que también es muy utilizado antes o después de una cirugía pues funciona como antiinflamatorio, antialérgico y antipruriginoso, pero a su vez a esta droga se suele prescribir en asociación con antibióticos como ciprofloxacina para prevenir diferentes infecciones causadas por microorganismos susceptibles. Las asociaciones entre muchos de los analgésicos-antiinflamatorios y antibióticos suelen ser recomendadas para disminuir la sintomatología de las patologías infecciosas independientemente de un proceso quirúrgico (*Romero-Ruiz y cols., 2006*).

Como podemos observar todos los fármacos ensayados en este trabajo son utilizados en la medicación pre o post operatoria y también en asociación con antimicrobianos para el tratamiento de patologías infecciosas.

Lo que hay que resaltar es que algunas de las dosis habituales usadas en dosificaciones para adultos de siete de los fármacos ensayados (diclofenaco, dexametazona, haloperidol, fenobarbital, metamizol, clonazepam, propacetamol) podrían alcanzar las concentraciones plasmáticas que son capaces de inducir la expresión de fenotipos de multirresistencia en *E. coli*, quizás a través de la

inducción de la expresión de activadores transcripcionales como MarA u otras proteínas homólogas en *E. coli*.

Por los datos anteriormente relatados y tal como *Tavío MM. y cols.-2004* lo habían establecido con diazepam, benzoato y salicilato, dicha inducción resultó ser dosis dependiente y generalmente comprendida en un rango de concentraciones que oscilan entre 1/4 y 1/128 de la CMI de cada uno de ellos.

Como podemos ver a continuación la concentración en plasma alcanzado por siete de los medicamentos ensayados son suficientes para inducir la expresión del fenotipo de multiple resistencia a drogas en cepas de *E. coli* AG100:

- Diclofenaco: el rango plasmático de esta droga oscila entre 0,03 y 0,17 mM, que corresponde a 1/32-1/128 de la CMI de la *E. coli* AG100 a dicho medicamento.
- Metamizol: el rango plasmático de esta droga oscila entre 4,3 y 8,8 mM, que corresponden a concentraciones comprendidas entre 1/64 y 1/128 de la CMI de la AG100 a dicho fármaco.
- Dexametasona: el rango plasmático de esta droga esta comprendida entre 0,003 y 0,13 mM, que corresponden a concentraciones comprendidas entre 1/32 y 1/128 de la CMI de la AG100 a dicho fármaco.
- Clonazepam: el rango plasmático de esta droga oscila entre 0,001 y 0,025 mM, que corresponden a concentraciones comprendidas entre 1/8 y 1/128 de la CMI de la AG100 a dicho fármaco.
- Haloperidol: el rango plasmático de esta droga oscila entre 0,003 y 0,03 mM, que corresponden a concentraciones comprendidas entre 1/16 y 1/128 de la CMI de la AG100 a dicho fármaco.
- Propacetamol: el rango plasmático de esta droga oscila entre 2,1 y 8,8 mM, que corresponden a concentraciones comprendidas entre 1/8 y 1/16 de la CMI de la AG100 a dicho fármaco.
- Fenobarbital: el rango plasmático de esta droga oscila entre 0,03 y 0,8 mM, que corresponden a concentraciones comprendidas entre 1/32 y 1/64 de la CMI de la AG100 a dicho fármaco.

Los fármacos ensayados en este trabajo inducen *in vitro* la pérdida de la porina F, activan el eflujo activo para norfloxacin, disminuyen la susceptibilidad a múltiples antibióticos, incrementan la tolerancia a solventes orgánicos e incrementan la expresión de TolC en la membrana externa, todos atributos de las cepas que poseen el fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos (Tavío MM. y cols., 2001; Barbosa T. & S. Levy, 2000; Randall L.P. & Woodward M.J., 2002; Aono R y cols., 1998; Hayashi S. y cols., 2003 Oethinger M., 1998; Tavío MM. y cols., 2004).

En estos casos observamos que el desarrollo del fenotipo de multirresistencia estuvo asociado a concentraciones cercanas a las CMIs de la cepa salvaje, lo que sugeriría que es un mecanismo que pone en marcha la bacteria como respuesta a situaciones límite por exceso de dosis. Por lo que el mencionado fenotipo podría ser parte de la respuesta bacteriana al estrés, cuya activación es dosis o concentración dependiente (Giuliodori AM. y cols., 2007) y no depende simplemente de la sustancia química como se creía hasta ahora.

## **Inducción de fenotipos de multirresistencia en cepas de *E. coli***

### **AG100 con paraquat y cloruro de sodio**

El estrés ambiental puede ser definido como todas aquellas situaciones adversas que tienen un efecto nocivo sobre la fisiología celular bacteriana, alteran el normal crecimiento y en situaciones extremas pueden llevar a la inhibición o muerte celular.

Estas condiciones incluyen estrés oxidativo, cambios extremos de temperatura, pH extremos, anaerobiosis, shock osmótico, shock por calor, agotamiento de nutrientes, y la presencia de compuestos tóxicos o inhibitorios, incluyendo los antibióticos. Se ha observado que ante estas condiciones se inducen reorganizaciones en el genoma e incluso mutaciones en la célula bacteriana, y estos mecanismos adaptativos han sido asociados al desarrollo de múltiple resistencia a los antibióticos (*McMahon y cols., 2007*).

En muchas de estas situaciones de estrés se induce el operón *marRAB*, que regula múltiples genes (*Barbosa TM. & Levy SB., 2000*), muchos de los cuales están vinculados al desarrollo de resistencia a antibióticos, lo que nos sugiere la estrecha relación que existe entre respuesta bacteriana al estrés y el desarrollo del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos (*Giuliodori AM., y cols, 2007*).

En este trabajo sometimos a la *E. coli* AG100 a otras condiciones de estrés, induciéndola con compuestos como paraquat y cloruro de sodio, para comparar si en estas condiciones de estrés se inducía el fenotipo de múltiple resistencia antibiótica al igual que con los fármacos no antibióticos.

Recordemos que el paraquat (compuesto cíclicos redox) genera estrés oxidativo al generar diferentes especies reactivas del oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno y radical del oxidrilo) que puede causar daño en el ADN, proteína y membranas (*Li Z., 1994*) y que el cloruro de sodio genera estrés osmótico al incrementar la osmolaridad del medio (*Csonka Laszlo N., 1989; Asako H. y cols., 2000*).

Analizando la susceptibilidad a antimicrobianos de la *E. coli* AG100 ante estas situaciones de estrés, observamos que concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/256 de paraquat incrementaban la resistencia de 2 a 32 veces para los antimicrobianos ensayados, encontrando incrementos de 2 a 8 veces para cefoxitina, de 4 a 8 veces para ácido nalidíxico, de 4 a 16 veces para norfloxacin,

de 2 a 32 veces para tetraciclina, y de 4 a 32 veces para cloranfenicol, y con concentraciones inferiores a estas la susceptibilidad a los antibióticos era prácticamente la misma que la observada en la cepa salvaje AG100 sin inducir.

Cuando analizamos la susceptibilidad a los mismos antimicrobianos en presencia de cloruro sódico observamos que de nuevo en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/256 de la CMI la resistencia incrementaba de 4 a 16 veces para norfloxacin, de 2 a 16 veces para tetraciclina y cloranfenicol, y de 2-8 veces para cefoxitina y ácido nalidíxico. En concentraciones inferiores la susceptibilidad a antimicrobianos era la misma que en la cepa AG100 sin inducir.

Si comparamos los perfiles de susceptibilidad bajo la inducción con fármacos en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/128, observamos que aumento de de 4 a 8 veces la CMI de cefoxitina, de 2 a 16 veces la CMI del ácido nalidíxico, de 2 a 32 veces la CMI de norfloxacin, de 2 a 32 veces la CMI de tetraciclina y de 2 a 16 veces la CMI de cloranfenicol, es decir el rango de los incrementos obtenidos varió de 2-32 veces al igual que lo observado en la inducción con paraquat y cloruro de sodio. Diferentes sistemas de respuesta bacteriana al estrés podrían estar involucrados en estos cambios de sensibilidad a antimicrobianos. Como mencionamos anteriormente el paraquat es el principal inductor del operón *soxRS*. SoxS estimula la transcripción de genes vinculados en la resistencia a antibióticos y en la tolerancia a los solventes orgánicos como *marRAB* (operón involucrado en la múltiple resistencia a antibióticos), *acrAB* (sistema de eflujo activo), *tolC* (porina) y *micF* (ARN regulatorio antisentido a OmpF)(Word T. y cols., 1999; Pomposiello P., 2001). Por su parte, la regulación de la expresión de las porinas en situaciones de estrés osmótico involucra un sistema de dos componentes EnvZ-OmpR, que reprime la síntesis de la porina F en condiciones de alta osmolaridad (Goh Ee-Been y cols., 2004). En *E. coli* los niveles de OmpF también disminuyen en condiciones de alta temperatura (Andersen C. y cols., 1989), y ante la presencia de salicilato (Nikaido H., 2003; Rosner y cols., 1991) por un incremento en la expresión de *micF* (ARN antisentido) que inhibe la traducción de *ompF* (Asako H. y cols, 2000). Asimismo el sistema de dos componentes CpxA-CpxR también regula la expresión de porinas, y responde a diferentes condiciones asociadas al estrés tal como pHs alcalinos y superproducción de proteínas secretadas, incremento de osmolaridad y también a la adhesión de células a las superficies. La regulación de la expresión de las porinas asociadas al estrés de la envoltura también está también regulado por

otro factor independiente denominado  $\sigma^E$ . Mientras que la activación de  $\sigma^E$  disminuye la expresión de *ompF* y *ompC*, la activación del operón *Cpx* resulta en una disminución en la expresión de *ompF* y un incremento en la expresión de *ompC* (Giuliodori AM. y cols., 2007; Batchelor E. y cols., 2005). Por lo que procedimos a analizar el perfil de proteínas de membrana externa y observamos que la AG100 crecida en concentraciones comprendidas entre 1/4 y 1/128 de la CMI, tanto en la inducción con paraquat como con cloruro sódico, disminuía la expresión de OmpF. Sin embargo, en concentraciones inferiores a ese rango, la cepa AG100 inducida tiene el mismo perfil que la AG100 sin inducir. El mismo resultado que se observó bajo el efecto inductivo de las mismas concentraciones subinhibitorias de los nueve fármacos ensayados. En ningún caso se observó la pérdida o notable disminución en la expresión de OmpC, tal como sería de esperar por un efecto regulador del sistema EnvZ-OmpR (Nikaido H., 2003; Srividhya KV. & Krishnaswamy S., 2004; Goh Ee-Been y cols., 2004).

## Incremento en la Tolerancia al Ciclohexano por Inducción con Paraquat o NaCl

Los incrementos en la resistencia observados en la cepa AG100 bajo inducción con Paraquat o con NaCl no podían explicarse por la sola pérdida de la OmpF, dado el alto rango de incrementos de la CMI de antimicrobianos cuyo paso a través de la pared bacteriana no es exclusivamente por la porina F, tal es el caso de ácido nalidíxico, cloranfenicol, y tetraciclina. En este sentido, *Komatsu T. y cols., 1991* no observaron diferencias significativas en las CMI de ácido nalidíxico, cloranfenicol y tetraciclina al comparar la resistencia entre cepas de *E. coli* que expresan o no la porina F en sus membranas.

Valorando la tolerancia al ciclohexano para poner en evidencia la expresión de sistemas de eflujo activo dependientes de TolC, encontramos que la AG100 inducida con paraquat o con cloruro de sodio era más tolerante que la AG100 sin inducción y al igual que lo que ocurre con los medicamentos anteriormente ensayados el máximo valor se obtuvo con 1/4 de la CMI para ambos compuestos y osciló entre 3,8 y 4,5, siendo de 3,9 a 4,5 para el paraquat y de 3,8 a 4,2 para cloruro sódico. Estos valores son prácticamente los mismos que obtuvimos con salicilato 5 mM (3,8-4,5) y son 1,3 a 1,5 veces superiores a los obtenidos con la inducción de fármacos (2,5 a 3,4). *Asako H. y cols., 2000* también observaron que cepas de *E. coli* en presencia de cloruro de sodio (NaCl) eran más tolerantes a dicho solvente que en ausencia del mismo, avalando así su efecto inductor.

Asimismo, pudimos observar que los incrementos en la tolerancia fueron también dosis dependiente. El mayor incremento lo encontramos en 1/4 de la CMI y vemos que son cada vez menores a medida que disminuye la concentración del inductor hasta la concentración 1/256 de su CMI, nivel por debajo del que la cepa AG100 tiene el mismo comportamiento que la cepa salvaje ante el ciclohexano. En presencia de paraquat se observó similar comportamiento de la tolerancia al ciclohexano que con cloruro sódico.

Como mencionamos anteriormente el incremento en la tolerancia al ciclohexano es marcador de la presencia de sistemas de eflujo activo dependientes de TolC, y la adquisición del fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* también está ligado a la sobre-expresión de AcrAB-TolC (*Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*).

Cuando analizamos el perfil de proteínas de membrana externa, observamos que la cepa AG100 inducida con paraquat y cloruro de sodio, al igual que lo que se observó en los ensayos de inducción con cualquiera de los nueve fármacos testados, se sobre-expresaba una banda en torno a los 53 kDa. que podría corresponder a TolC, dada su movilidad electroforética (Aono R. y cols, 1998). La expresión de dicha banda resultó ser dependiente de la concentración de paraquat y cloruro de sodio, y estuvo comprendida entre 1/4 y 1/128 de las CMI de ambos compuestos en la cepa AG100, el mismo efecto que observamos mediante la inducción con los nueve fármacos. La mayor expresión de TolC la observamos en 1/4 de la CMI de dichos compuestos y va disminuyendo a medida que disminuimos las concentraciones de agente inductor, tanto para el caso de Paraquat o del NaCl. A concentraciones inferiores a 1/128 de la CMI la AG100 tiene el mismo patrón de proteínas que la que manifiesta la cepa sin inducción.

En trabajos anteriores se ha descrito que compuestos cíclicos redox inducen el operón *soxRS*, e incrementan la tolerancia al ciclohexano al mismo nivel que en aquellas cepas de *E. coli* en las que se sobre-expresa el gen *soxS* (Asako H., y cols 1997). Es obvio que al ser el Paraquat un inductor reconocido del activador transcripcional SoxS (Li Z. & Demple B., 1994; Word T. y cols., 1999; Koutsolioutsou A. y cols., 2005) su acción como inductor de tolerancia al ciclohexano y multirresistencia pudo ser también derivada de la activación del operón *soxRS*.

La mayor resistencia a los antimicrobianos ensayados observada en la cepa AG100 en presencia de paraquat y cloruro sódico se podría entonces explicar por la disminución de la expresión de la porina F bajo inducción con cualquiera de los fármacos ensayados y por lo tanto, al menor influjo de antibióticos a la célula, ello sumado al incremento en la expresión de bombas de eflujo TolC dependientes, siendo esta porina el componente primordial en la maquinaria implicada en la tolerancia a los solventes orgánicos (Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Webber & Piddock L. , 2001; Oethinger M. y cols., 1998; Aono R. y cols., 1998; Nakajima Harushi y cols., 1995; Griffith K. y cols., 2004). Llegando a la conclusión que compuestos como el paraquat y el cloruro sódico inducen *in vitro*, al igual que con los medicamentos antes ensayados y el salicilato, el fenotipo de múltiple resistencia, de forma dosis o concentración dependiente. Quizás este tipo de respuesta bacteriana ante una osmolaridad creciente esté vinculada a los

mecanismos de respuesta bacteriana al estrés en la que activadores como MarA, SoxS, Rob y SdiA han sido involucrados (*Giuliodori AM., y cols., 2007, Levy SB., 2002; Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Martin R. y cols., 2000; Rahmati S. y cols., 2002*).

## **Selección de mutantes estables multirresistentes con antimicrobianos**

En la selección de mutantes de *E. coli* con ceftazidima, se obtuvo una frecuencia de selección que osciló entre  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  para el primer escalón selectivo,  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  en el segundo escalón y tercer escalón selectivo. Las frecuencias de selección con lomefloxacin fueron algo menores,  $10^{-7}$  para el primer escalón selectivo y  $10^{-9}$  para el segundo escalón selectivo. Los mutantes resistentes desarrollados en esta tesis son estables, un carácter adquirido que no se perdió tras las sucesivas resiembras en medios de cultivo con ausencia del agente selectivo. En esta tesis sólo se caracterizaron los mutantes resultantes del mayor escalón selectivo (CazE7, LmfE7, CazE11) que resultaron ser los que mayor nivel de resistencia presentaban a los antimicrobianos testados.

Las frecuencias de selección resultantes fueron coincidentes con los descritos en otros trabajos en los que la frecuencia de selección de mutantes con fluoroquinolonas siempre es menor ( $10^{-11}$ - $10^{-9}$ ) (Heisig P. y cols., 1994; Olofsson S. y cols., 2006, Tavío MM. y cols., 1999) que aquellas derivadas de la selección con otros antimicrobianos como cloranfenicol ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$ ) (Cohen SP. y cols., 1989) y  $\beta$ -lactámicos. Jaffé A. y cols. en 1983 seleccionaron mutantes a partir de cepas de *E. coli* con ampicilina, carbenicilina, cefaloridina, cefazolina, cefotaxima, cefoxitina, aztreonam, moxalactam y obtuvieron frecuencias de selección que oscilaron entre  $10^{-9}$ - $10^{-6}$ , frecuencias similares a las obtenidas en este trabajo de tesis. Asimismo cabe mencionar que en el presente trabajo no obtuvimos mutantes de *E. coli* seleccionados *in vitro* con imipenem y cefotaxima.

Al igual que lo observado por otros autores (Cohen SP. y cols., 1989), dichos mutantes seleccionados con ceftazidima (CazE7 y CazE11) o con lomefloxacin (LmfE7) incrementaron la resistencia al agente selectivo, pero además en estos se apreció un incremento simultáneo de la resistencia a diversos antibióticos no relacionados estructuralmente como  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina y cloranfenicol, y dicha resistencia se mantuvo estable en ausencia del agente selectivo. En concreto pudimos observar un incremento en la resistencia de 4-64 veces al ácido nalidíxico, 16-32 veces a lomefloxacin, 2-32 veces a norfloxacin, 2-4 veces a cefalotina e imipenem, 2-4 veces a cefoxitina y cefotaxima, 64-128 veces a ceftazidima, 4-8

veces a aztreonam, 2 veces a tetraciclina, 2-256 veces a cloranfenicol, 4-32 veces a ceftirome en comparación con las cepas origen PS7 y PS11.

Los incrementos obtenidos en la resistencia a ácido nalidíxico, norfloxacin y lomefloxacin son equiparables a los observados en otros mutantes seleccionados con quinolonas que poseen una o más mutaciones en *gyrA* (Oetheinge M. y cols., 2000; Hirai K. y cols., 1986; Tavío MM. y cols., 1999; Heisig P. y cols., 1994), sin embargo, en el caso de esta tesis, en el mutante LmfE7 ya se había caracterizado previamente la existencia la misma sustitución en *gyrA* que en la cepa origen PS7 sin la presencia de otras sustituciones en *gyrB*, *parC* y/o *parE* (Tavío MM. y cols., 1999) que pudieran justificar el incremento de resistencia en LmfE7 a esas quinolonas. Sin embargo, en trabajos previos se describen menores valores de CMI de quinolonas cuando la selección es con otros antimicrobianos como tetraciclina, cloranfenicol (Cohen SP. y cols., 1983) o  $\beta$ -lactámicos (Sanders C. y cols., 1984).

Otros trabajos que caracterizan mutantes de *E. coli* y otras enterobacterias seleccionados *in vitro* con  $\beta$ -lactámicos han descrito CMI similares a las alcanzados por algunos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos ensayados en este estudio (cefalotina, cefoxitina, cefotaxima) (Jaffé A. y cols., 1983) no así para ceftazidima, aztreonam y ceftirome, para los que las CMI halladas en este estudio fueron superiores a las descritas (Jaffé A. y cols., 1983; Sanders C. y cols., 1984).

A la vista de los resultados comentados, está claro que estos mutantes seleccionados *in vitro* a partir de aislamientos clínicos expresan el fenotipo de resistencia a múltiples antimicrobianos tras la presión selectiva que ejercieron las concentraciones suprainhibitorias de lomefloxacin y ceftazidima.

El fenotipo de resistencia a múltiples antimicrobianos suele con frecuencia asociarse a incrementos importantes en las CMI de quinolonas (8-64 veces e incluso más de 256 veces en algunas cepas si el agente selectivo es una quinolona y de 8-32 si es un beta-lactámico) (Tavío MM. y cols., 1999; Sanders C. y cols., 1984), tal como se ha observado en las cepas mutantes seleccionadas en este trabajo. Asimismo cabe destacar el marcado incremento de resistencia a ceftazidima que presentaron LmfE7, CazE7 y CazE11.

Debido a que los mutantes seleccionados expresan altos niveles de resistencia a antimicrobianos de diferentes familias es de esperar que expresen diferentes mecanismos de resistencia, puesto que estos niveles de resistencia no pueden

justificare sólo por un mecanismo (*Tavío MM. y cols, 1999; Randall LP. y MJ. Woodward, 2002; Sanders C. y cols., 1984; Poole K., 2002; Mazzariol A., 2000*).

## Papel de la Permeabilidad en la Multirresistencia de los Mutantes

### Seleccionados *in vitro*

El papel de las proteínas de membrana externa en el desarrollo de la múltiple resistencia a antimicrobianos se estudió mediante comparación de los distintos mutantes con sus cepas origen. El análisis de geles de poliacrilamida con dodecilsulfato-sódico y urea reveló que el incremento de múltiple resistencia está en parte asociado a una menor expresión de la porina F en las cepas LmfE7 y CazE11, y a una falta de expresión de la misma porina en la cepa CazE7, obteniendo un perfil proteico similar a la AG112 (mutante *marR*) usada como control.

La pérdida de la OmpF debió influir en la penetración de antibióticos como cefalotina o cefoxitina y otras cefalosporinas cuya difusión relativa a través de esta porina es notable (*Yoshimura F, Nikaido H., 1985*) en este sentido observamos que la cepa CazE7 es 2 veces más resistente a norfloxacin, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, aztreonam e imipenem que la cepa LmfE7, que no pierde dicha porina. Mientras que mostraron la misma sensibilidad a otros antimicrobianos como ceftazidima, cloranfenicol, lomefloxacin y tetraciclina. Ambas cepas fueron seleccionadas a partir de la misma cepa origen PS7. Resultados comparables han sido descritos por *Komatsu T., 1991*. En dicho trabajo compararon mutantes de *E. coli* que expresaban OmpF con aquellas que no y observaron un incremento de 2-4 veces en la resistencia a norfloxacin, cefotaxima y cefoperazona, pero no constataron diferencias en la sensibilidad a algunos antibióticos como ácido nalidixico, cloranfenicol y tetraciclina.

Si bien la pérdida de OmpF incrementa la resistencia a diversos antimicrobianos, no justifica por si sola los marcados incrementos de resistencia observados en los mutantes seleccionados. Observamos que las cepas LmfE7 y CazE11, aún en presencia de dicha porina en sus membranas, incrementaron la resistencia a los antibióticos ensayados.

En diferentes trabajos bibliográficos se plantea que las mutantes de *E. coli* seleccionadas *in vitro* y deficientes en la porina F son de 2 a 4 veces más resistentes a penicilinas, de 8 a 16 veces a cefalosporinas (cefazolina, cefalotina, cefaloridina, cefoxitina, cefpirome) (*Chapman J. & Georgopapadakou N., 1988; Jaffé A. y cols., 1982; Sawai T., 1982*), y de 2 a 4 veces más resistentes a antibióticos como el aztreonam (*Hiraoka M., 1989*) e imipenem (*Poirel L. y cols., 2004; Cornaglia G., 1992; Sawai T., 1982*). Si bien las cepas mutantes

seleccionadas en esta tesis mostraron incrementos 2 a 4 veces para algunos  $\beta$ -lactámicos (cefoxitina, cefotaxima y cefalotina, imipenem) al igual que lo descrito en los trabajos anteriormente citados, pero también incrementos mucho mayores se observaron para antimicrobianos como ceftazidima (64-128 veces), cefpirome (4-32 veces) y aztreonam (4-8 veces).

Lo mismo ocurre con las quinolonas ensayadas, puesto que se ha descrito que la pérdida de OmpF contribuye a incrementar de 2 a 8 veces la concentración mínima inhibitoria para quinolonas como ácido nalidíxico y norfloxacin en cepas de *E. coli* (Chapman J. & Georgopapadakou N., 1988; Tavío MM. y cols., 2004, Cohen SP. y cols 1989), sin embargo en esta tesis los valores hallados fueron mayores, las mutantes seleccionadas incrementaron la resistencia de 4 a 32 veces a norfloxacin, de 16 a 32 veces a lomefloxacin y de 4 a 64 veces al ácido nalidíxico.

Por su parte, Cohen SP. y cols., 1988 observaron incrementos de sólo 4 a 8 veces en la resistencia a cloranfenicol cuando *E. coli* pierde OmpF, a diferencia de nuestros mutantes (CazE7 y CazE11) en los que el incremento de la CMI del cloranfenicol fue hasta 256 mayor que en la respectivas cepas origen.

## Regulación de la Expresión de la Porina F en las Cepas Mutantes Seleccionadas con Antimicrobianos

La expresión de la porina F se ve influenciada por la presencia de diferentes compuestos químicos presentes en el medio, el más conocido es el salicilato (*Rosner JL. y cols, 1991*), aunque se han caracterizado otros como diazepam, antimicrobianos, etc. (*Tavío MM. y cols., 2004*), se sabe que la regulación de la porina F en estos casos es porque están involucradas algunas de las proteínas regulatorias que pertenecen a la familia XylS-AraC de activadores transcripcionales como son MarA, SoxS y Rob (*Gallegos M. y cols., 1997*).

La expresión de *ompF* está regulada a nivel traduccional y transcripcional. El sistema osmosensor OmpR/EnvZ modula la expresión transcripcional de *ompF* dependiendo del estado de fosforilación del regulador OmpR, por otra parte existe una regulación traduccional negativa a través de *micF*, un ARNm antisentido que interacciona con mARN *ompF*, e inhibe su traducción. La transcripción de *micF* es inducible por el salicilato y otros compuestos como los ariloalcanoicos (*Balagué C., 2001*). El incremento en la expresión de *micF* puede atribuirse también a la sobre-expresión de MarA (activador transcripcional de *marRAB*), así como de SoxS (*Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Aono R. y cols., 1998*) y Rob (*Jair K. y cols, 1995; Jair K. y cols., 1996, Bennik M. y cols., 2000; Lee Eun-Hee y cols., 1996; Ariza R. y cols, 1995*) proteínas homólogas a MarA, que pueden producir un incremento en la expresión de *micF* independientemente del locus *marRAB*.

*Cohen S. y cols., 1993* han observado que la actividad  $\beta$ -galactosidasa se incrementaba en presencia del salicilato 5 mM en cepas con el locus *mar* delecionado y fusión *micF::lacZ* aunque en menor medida que en la cepa origen con la misma fusión. Es decir, el salicilato 5 mM incrementó la transcripción de *micF* y condujo a una menor expresión de OmpF aún en ausencia del locus *marRAB*.

En este trabajo además valoramos el nivel de expresión de *micF* en presencia y en ausencia de salicilato 5 mM midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades Miller en transductantes con la fusión *micF::lacZ* de las cepas seleccionadas con antibióticos (CazE7, LmfE7 y CazE11), usando como donante la *Escherichia coli* SB221 que a su vez usamos como cepa sensible control.

El análisis de los datos reveló que la actividad basal fue 1,4-1,5 veces mayor en los mutantes que en sus cepas origen, siendo mayor en la única cepa mutante carente de OmpF (CazE7). Resultado que indica que en los mutantes se encuentran implicadas vías regulatorias que influyen en la expresión de *micF* tal como se describe en *Balagué C. y cols., 2001*.

En presencia de salicilato 5 mM todas las cepas incrementaron la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, los valores en las cepas origen fueron de 1,6 a 1,8 veces superiores a los obtenidos en ausencia del inductor. Mientras que en las cepas mutantes LmfE7 y CazE11 el incremento fue de 2,6 veces, ésto se correlaciona con el hecho de que estos mutantes tenían una mayor actividad basal a la que se suma la derivada de la inducción con salicilato. Una situación diferente se observa en la cepa CazE7 (deficiente en OmpF) donde el incremento fue de 1,7 veces respecto a la actividad basal de la enzima en la misma cepa.

El salicilato de sodio es un conocido inductor del operón *marRAB* (*Randall LP. & Woodward MJ., 2002*) de manera que al activarse dicho operón se incrementa la expresión de *micF* que produce una disminución de OmpF en la membrana externa bacteriana (*Cohen SP. y Levy SB., 1988*). Como dicho operón es constitutivo en *E. coli* y otras enterobacterias (*Randall LP. & Woodward MJ., 2002; Barbosa T. & Levy S., 2000; Goldman J. y cols. 1996*) es de esperar que también en las cepas origen se produzca un incremento en la expresión de *micF* por inducción con salicilato 5 mM. Asimismo, estos resultados son coincidentes con los obtenidos por *Balagué C., y cols, 2001*, en dicho trabajo se observó un incremento en la actividad  $\beta$ -galactosidasa, respecto de la actividad basal, de 1,7 a 2 veces en cepas de *E. coli* transductantes con fusión *micF::lacZ* e inducidas con ácidos arilo-alcanoicos como el 2,4 diclorofenoxiacético.

Esto explicaría la respuesta al salicilato en las cepas origen PS7 y PS11. Por su parte, también el fenotipo de múltiple resistencia desarrollado en las mutantes CazE7, LmfE7 y CazE11 se asoció a una mayor expresión de *micF* respecto de las cepas origen. Los mutantes LmfE7 y CazE11 expresan una alta actividad  $\beta$ -galactosidasa basal (aunque menor que CazE7) que se relaciona con la menor expresión de OmpF en la membrana externa de dichas bacterias, todo ello en concordancia con la posible activación del regulón *mar* por mutaciones que conduzcan a la sobre-expresión de cualquiera de los reguladores MarA, SoxS o Rob que comparten en otros muchos, la regulación positiva de *micF* (*Gallegos M. y*

*cols.*, 1997; Word T. y cols., 1999; Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Aono R. y cols., 1998; Jair K. y cols., 1995; Jair K. y cols., 1996, Bennik M. y cols., 2000)

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa a su vez se incrementó marcadamente en LmfE7 y CazE11 ante la presencia del salicilato 5 mM, resultado que indica que la posible sobre-expresión de MarA o incluso SoxS en respuesta al salicilato (Randall LP. & Woodward MJ., 2002).

Por su parte, el mutante CazE7 presentó el mayor nivel basal de expresión de *micF*, resultado que se también se relaciona con el hecho de que es el único mutante carente de OmpF, sugiriendo un mayor nivel basal de represión de *ompF* por medio de *micF*, quizás debido a la presencia de varias mutaciones simultáneas que puedan estar incidiendo en el nivel de expresión de *micF*. Así Aiba H. y cols., 1987 describieron la estrecha asociación existente entre el nivel de expresión de *micF* y el nivel de represión de *ompF*, de manera que bajos niveles de *micF* se correspondían con una baja o nula represión de *ompF* y asimismo, altos niveles de *micF* se asociaban a una alta represión de *ompF*.

Ante la inducción con salicilato 5 mM el menor aumento en la expresión de *micF* se observó CazE7, este mutante difirió en 1,5 veces de la actividad  $\beta$ -galactosidasa observada en LmfE7 y CazE11, quizás debido al ya muy alto nivel de expresión basal de *micF* en CazE7 o bien a la acción de mecanismos de auto-regulación directa o indirecta del nivel de *micF* por la propia proteína *ompF*.

Además de *micF*, el nivel de expresión de la porina F fluctúa en respuesta a cambios ambientales como la temperatura y la osmolaridad del medio. Los niveles de expresión de OmpF son máximos a baja temperatura y baja osmolaridad (Cohen S., 1988). En este trabajo hicimos crecer la cepa CazE7 carente de OmpF en Medio Antibiótico N° 3 (dicho medio aporta 0,35% de cloruro de sodio) suplementado con 1% de cloruro de sodio, y al analizar el perfil electroforético de las proteínas de membrana externa observamos que dicha cepa incrementaba el nivel de expresión de OmpF en presencia de una concentración de NaCl mayor al 1% en comparación con la misma cepa crecida en una concentración de NaCl menor al 1%, a la par que no mostraba variación en la expresión de OmpC. Como se mencionó anteriormente los niveles de OmpF además pueden verse reducidos ante la hiperexpresión de alguno de los activadores transcripcionales MarA, Rob y SoxS debido a que incrementan la transcripción de *micF*. En este sentido, Asako H. y cols. en 1999, analizaron la síntesis de OmpF ante la sobre-expresión de dichos

activadores transcripcionales en un medio de alta salinidad u osmolaridad (1% de cloruro de sodio), observando que la represión sobre la expresión de OmpF ejercida por MarA era independiente de la salinidad del medio, que SoxS reprime marcadamente la expresión de esta porina en presencia de cloruro de sodio y que la represión de OmpF por Rob es alta en ausencia de cloruro de sodio.

Es probable el activador transcripcional Rob esté involucrado en el desarrollo de multirresistencia en *CazE7*, de manera que un medio con alta salinidad (1,35% de cloruro de sodio) condiciona un incremento en la síntesis de la porina F y no una disminución como cabría esperar si tenemos en cuenta la regulación que ejerce EnvZ/OmpR en función de la osmolaridad del medio sobre la expresión de OmpF y OmpC (*Asako H. y cols. en 1999*). En condiciones de alta osmolaridad EnvZ/OmpR reprime la expresión de *ompF* e incrementa la de *ompC* (*Nikaido H., 2003; Srividhya KV. & Krishnaswamy S., 2004*).

Por lo que el sistema EnvZ/OmpR no parece tener un papel decisivo determinando el nivel de expresión de OmpF en las cepas mutantes seleccionadas con antimicrobianos, resultado que resulta coincidente con lo observado en los ensayos de transducción. En dichos ensayos medimos la actividad beta-galactosidasa en las cepas controles y encontramos que en presencia del salicilato 5 mM, los niveles de OmpC permanecieron sin alteraciones tanto en el perfil proteico de membrana como en la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de su fusión transcripcional. Estos resultados demuestran que el mecanismo OmpR/EnvZ no está involucrado en la respuesta al tratamiento con Salicilato 5 mM, dado que OmpR/EnvZ controla recíprocamente los niveles de ambas porinas en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio (*Mizuno T. & S. Mizushima, 1990*) y coincidiendo con los resultados de *Ramani N. & Boakye K., 2001*.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa MH513 (*fusión transcripcional ompF::lacZ*) no varió ante la presencia de salicilato 5 mM mientras que con la cepa MH610 (*fusión traduccional ompF::lacZ*) se observó una marcada disminución en la expresión de *ompF* ante la presencia del inductor.

Estos resultados confirman que la regulación de *micF* sobre la expresión de la porina F en presencia de salicilato 5 mM es a nivel post-transcripcional o traduccional.

## **Papel de la Expulsión o Eflujo Activo de Antimicrobianos en el fenotipo de Multirresistencia**

Los tres mutantes seleccionados en este estudio incrementaron su resistencia a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina y cloranfenicol, y a pesar de ello sólo no expresó la porina F en su membrana, por lo que es apropiado pensar en la expresión simultánea de otros mecanismos de resistencia en estos mutantes, éste podría ser el caso de los sistemas de expulsión de drogas, que podrían contribuir a explicar los valores de CMI hallados.

Los transportadores transmembrana protón-dependientes suelen expeler al exterior de la célula sustancias que resultan nocivas para ella, expulsando antimicrobianos como cloranfenicol, rifampicina, acriflavina, fluoroquinolonas, ácido nalidíxico, tetraciclina (*Koronakis V. y cols., 2004*),  $\beta$ -lactámicos como la cefalotina que ha sido descrita como sustrato del sistema de AcrAB en *E. coli* (*Ma D. y cols 1993; Ma D. y cols., 1995; Okusu H. y cols, 1996*), y diferentes cefalosporinas identificadas como sustratos de bombas de expulsión activa en diferentes bacterias gram negativas (*Nikaido H., 1996; Paulsen IT. y cols., 1996*).

- **Papel de la expulsión o eflujo activo en la resistencia a quinolonas**

Si comparamos las CMIs de las quinolonas ensayadas sobre la única mutante seleccionada con quinolonas (LmfE7), podemos observar que el mayor valor de CMI fue para el ácido nalidíxico (quinolona no fluorada) (CMI: 2.056), mientras que para quinolonas monofluoradas (norfloxacin) o bifluoradas (lomefloxacin) (*Chu DT. y cols., 1989*) y por ende de carácter más hidrofílico, las CMIs halladas fueron de 2 y 16 respectivamente. Es decir que norfloxacin y lomefloxacin tienen mayor poder inhibitorio que el ácido nalidíxico sobre la ADN girasa de la cepa LmfE7, que al igual que su cepa origen PS7 ya que presentaba la sustitución serina por leucina en la posición 83 en GyrA (*Tavío MM., y cols., 1999*). Sin embargo, a pesar de tener la misma mutación en *gyrA*, el mutante LmfE7 fue 64 veces más resistente a ácido nalidíxico, 16 veces más resistente a norfloxacin y 32 veces más resistente a lomefloxacin que la cepa origen PS7. En el estudio ya publicado, tanto PS7 como LmfE7 mostraron un notable eflujo activo de norfloxacin.

Para poner de manifiesto la sobre-expresión de estos sistemas de eflujo, procedimos a la valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos en presencia de

50  $\mu\text{M}$  de CCCP (inhibidor de los sistemas protón dependientes) observando que este compuesto producía disminución de las CMI de todos los antimicrobianos ensayados, hallando un aumento en la sensibilidad de 4 veces a ácido nalidíxico y norfloxacin y de 2 a 4 veces a lomefloxacin. Por su parte, las cepas origen PS7 y PS11 disminuyeron la sensibilidad 2 veces a ácido nalidíxico y a norfloxacin en presencia del CCCP. Sin embargo la sensibilidad a lomefloxacin en las cepas origen no se vio alterada en presencia de CCCP.

El efecto del CCCP fue de 2 a 4 veces superior en los mutantes seleccionados que en las cepas origen y si bien PS7 y LmfE7 poseen la misma mutación, el efecto del CCCP fue dos veces superior en dicho mutante.

Los resultados obtenidos en la sensibilidad antibiótica ante la presencia de CCCP son comparables a los que *Mazzariol A. y cols., 2002* obtuvieron al comparar la CMI a ciprofloxacina en presencia y ausencia del inhibidor de sistemas de eflujo protón dependiente MC-207,110, en cepas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas. En esa descripción, en cepas que sobre-expresaban *acrA* la CMI a ciprofloxacina disminuía de 2 a 4 veces en presencia del inhibidor MC-207,110.

Como se describió en los antecedentes de esta tesis, AcrA es la proteína de fusión necesaria en el sistema de eflujo activo AcrAB, en la que AcrB es la bomba propiamente dicha (*Sulavik M. y cols., 2001, Levy SB., 2002; Nikaido H. & Zgurskaya HI., 2001*). Su expresión es controlada por el operón *acrAB* cuyo regulador represor es AcrR (*Ma D. y cols., 1996; Ma D. y cols., 1994*). La función de AcrR es la de regular negativamente su transcripción y la de *acrAB* y así prevenir la excesiva producción de AcrAB que resultaría nociva para la bacteria (*Grnovic S. y cols., 2002*). Cuando se inestabiliza o inactiva AcrR se produce un incremento conjunto en la transcripción de *acrA* y *acrB* (*Wang Hui y cols., 2001; Gerken H. & Rajeev M., 2004; Mikolosko J. y cols., 2006*).

En el caso de los mutantes estudiados se demostró la mayor expresión de *acrB* respecto de las cepas origen PS7 y PS11. Así, mientras PS7 y PS11 mostraron un nivel de *acrB* similar al de la cepa sensible AG100, los mutantes LmfE7 y CazE7 mostraron un nivel de expresión de 2,9 y 3 veces superior a su origen e incluso algo superior al nivel observado en la cepa AG100 inducida con 5 mM de salicilato o con 200  $\mu\text{M}$  de paraquat. El incremento de expresión observado en los mutantes derivados de la cepa PS7 coincidió con el descrito en un mutante *acrR*

derivado de la cepa AG100 por *Schneiders T. y cols., 2003*. Por su parte, el mutante CazE11 mostró un nivel de expresión de *acrB* de 2 veces el de PS11.

La resistencia a quinolonas es un problema clínicamente importante, el incremento en la resistencia puede ocurrir por diferentes mecanismos, como mutaciones que conducen a incrementar el eflujo activo (*Giraud y cols., 2000; Hooper, 2000; Oethinger y cols., 2000*). De los muchos transportadores caracterizados en *E. coli*, sólo AcrAB AcrEF, MdfA y YdhE han mostrado expulsar quinolonas como ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina (*Rahmati S., 2002; Jellen-Ritter A.S & Kern W.V.; 2001; Tikhonova E.B. y Zgurskaya H.I.; 2004; Shirley Y.,2003*). Asimismo cabe mencionar que AcrD, por sí sólo, confiere resistencia a los aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina, tobramicina) que son drogas hidrofílicas, pero cuando forma parte de un sistema multicomponente, puede expulsar ácido nalidíxico y norfloxacin (*Sulavik M. y cols., 2001; Masi M. & Pradel E., 2003; Elkins CA. & Nikaido H., 2002*). Dentro de todos los sistemas mencionados el sistema de eflujo AcrAB-TolC es el sistema de eflujo más frecuentemente identificado en *E. coli* (*Nikaido H., 2001*) y es de expresión constitutiva en dichas cepas.

AcrD y AcrEF no se expresan o se expresan en bajo nivel en cepas salvajes de *E. coli* pero sí se han identificado en mutantes que expresan el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos (*Nikaido H., 1996; Ayush Kumar, 2005*). Los otros sistemas no han mostrado conferir hasta el momento cambios en la susceptibilidad a antimicrobianos en cepas salvajes de *E. coli*, sugiriendo que no juegan un papel significativo en la resistencia a antimicrobianos.

- **Papel de la expulsión o eflujo activo en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos**

Asimismo cabe mencionar que LmfE7 al igual que CazE7 y CazE11 además de incrementar la resistencia a quinolonas, mostraron un incremento marcado en la  $\beta$ -lactámicos.

Los  $\beta$ -lactámicos son también sustratos de diferentes sistemas de eflujo activos como AcrAB, AcrEF y AcrD en *E. coli* (Nishino K. y cols, 2003) por lo que alguno que éstos podrían contribuir a la elevada resistencia a este tipo de antimicrobianos observada en los mutantes. Para poner en evidencia estos posibles sistemas protón dependientes, valoramos de la susceptibilidad a antimicrobianos en presencia de 50  $\mu$ M de CCCP (inhibidor de los sistemas protón dependientes), observando una clara disminución de las CMI de todos los antimicrobianos ensayados, hallando un aumento en la sensibilidad de 2 veces a cefpirome, 4 veces a cefoxitina, cefotaxima, de 2 a 4 veces a cefalotina, ceftazidima, aztreonam, de 2 a 8 veces a imipemen, demostrando en estas cepas mutantes la presencia de sistemas de eflujo protón dependientes.

También debemos valorar el carácter hidrofílico/ hidrofóbico de los antimicrobianos ensayados, puesto que diferentes autores citan que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos  $\beta$ -lactámicos se ve afectada cuando se sobre-expresa el principal sistema de eflujo AcrAB, pero de forma diferente dependiendo de la mayor o menor hidrofobicidad de la molécula de antimicrobiano, de manera que se verían más afectados aquellos que poseían sustituyentes más lipofílicos, que serían sustrato preferente de estas bombas (Nikaido H. y cols., 1998; Elkins C. y cols., 2002; Nishino K. y cols., 2003). Así, cefalotina y la cefoxitina tienen el mismo coeficiente de partición, pero podemos observar que ante la presencia de CCCP el mayor efecto ocurrió sobre la CMI de cefoxitina (disminución de 4 veces en todas las mutantes seleccionadas). Por otra parte, si bien ambas cefalosporinas tienen un carácter más hidrofóbico que la cefotaxima se apreció la misma disminución (4 veces) en la CMI de cefotaxima en presencia de CCCP. Coincidiendo con estos resultados, la sobre-expresión de *acrB* en los mutantes respecto de las cepas origen avala la hipótesis de que el incremento de resistencia a cefoxitina y cefalotina observado en los tres mutantes se pudo deber fundamentalmente a la sobre-expresión del sistema de eflujo AcrAB, unido a

la disminución en LmfE7 y CazE11 y la pérdida en CazE7 de la porina F. Aunque la participación de otros sistemas de eflujo activo no se descartan. Si bien ambos cambios no son suficientes para explicar el importante aumento de la resistencia a ceftazidima, cefpirome o aztreonam observado en los mutantes, tal como describieron *Mazzariol A. y cols., 2000* la inactivación de *acrAB* no afecta a la CMI de ceftazidima o cefpirome. En este sentido, la CMI de ceftazidima y cefpirome disminuyó sólo 2 veces ante la presencia de CCCP en CazE7 y LmfE7, aunque sin readquirir el nivel de susceptibilidad de la cepa origen PS7 a pesar de la presencia de la porina F en la cepa LmfE7. Si bien el uso del CCCP puso en evidencia la presencia de sistemas de eflujo protón dependientes operando en la resistencia adquirida a ceftazidima y cefpirome, aunque sin ser suficiente para explicar plenamente la elevada resistencia a ceftazidima (64-128 veces) y cefpirome (4-32) obtenida en estas mutantes.

Cabe mencionar que si bien AcrAB y AcrEF son los sistemas de bombeo más importantes en *E. coli* desde el punto de vista de la resistencia a antimicrobianos, recientemente se ha visto que AcrD también es capaz de expulsar un amplio número de sustratos. *Nishino K. y cols., 2003* observaron que la sobre-expresión de *acrD* produce un incremento en la resistencia de 32 veces a oxacilina, 16 veces a cloxacilina, 32 veces a nafcilina, 2 a veces cefamandole, 16 veces a carbenicilina, 32 veces a sulbenicilina y de 8 veces a aztreonam. En este estudio de tesis, la resistencia a aztreonam en los mutantes seleccionados se incrementó de 4 a 8 veces en comparación con las cepas origen, por lo que no es descartable que la sobre-expresión de AcrD esté presente en los mutantes estudiados.

Debido al incremento en la sensibilidad antimicrobiana por efecto del CCCP podemos intuir que los sistemas de eflujo activo protón dependientes están de alguna manera implicados en la resistencia a los antimicrobianos observada en estas cepas mutantes caracterizadas. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de otro tipo de bombas de expulsión activa no protón dependientes que pudieran estar contribuyendo al incremento en la resistencia a los antimicrobianos, como el sistema MacAB (ABC dependientes de ATP) en *E. coli*. Este sistema se acopla a TolC y confiere resistencia a macrólidos (*Kobaysshi N. y cols., 2001*). Si bien en este estudio no hemos estudiado el perfil de resistencia a macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina), se ha citado que MacAB al igual que

otros sistemas protón dependientes EmrAB, EmrKY, MdfA, EmrE y MdtK no confieren, hasta el momento, resistencia a  $\beta$ -lactámicos en cepas de *E. coli* (Nishino K. y cols, 2003) a diferencia de lo que ocurre en las cepas mutantes seleccionadas en este estudio.

- **Papel del eflujo activo en la resistencia a cloranfenicol y tetraciclina**

Asimismo los mutantes LmfE7, CazE7 y CazE11 incrementaron la resistencia a cloranfenicol y tetraciclina. Ambos antimicrobianos son sustratos del sistema de eflujo AcrAB-TolC en cepas de *E. coli* (Hiroshi N., 1996; Elkins C., 2007), que como hemos demostrado resultó hiperexpresado en los tres mutantes.

Mediante la valoración de la susceptibilidad a antimicrobianos en presencia de 50  $\mu$ M de CCCP observamos una disminución de 4 veces en las CMI's a cloranfenicol y de 4 a 16 veces en las CMI's de tetraciclina en los mutantes estudiados, mientras que en las cepas origen el CCCP sólo consiguió disminuir en 2 veces las CMI's de dichos antimicrobianos.

El mayor efecto del CCCP fue sobre la CMI de tetraciclina. Como mencionamos anteriormente las mutantes seleccionadas resultaron ser 2 veces más resistentes a tetraciclina que la cepa origen, hallazgo que fue independiente de la pérdida de OmpF puesto que CazE7 muestra el mismo valor de resistencia que LmfE7 y CazE11, sin embargo ante la presencia del CCCP la CMI de tetraciclina disminuyó de 4 a 16 veces. Elkins C. y cols., 2002 observaron que la sobre-expresión de *acrB* en cepas de *E. coli* con fenotipo *mar*, producía incrementos de 16 veces en la resistencia a tetraciclina y 4 veces a cloranfenicol, lo que explica el mayor efecto del CCCP en la CMI de tetraciclina en los mutantes desarrollados en esta tesis coincidiendo con la sobre-expresión de *acrB* en tales mutantes.

- **Posibles reguladores responsables de la sobre-expresión de sistemas de eflujo en los mutantes seleccionados**

Las condiciones ambientales están involucradas en la regulación de la expresión de los sistemas activos de eflujo (*Kumar A., 2005*). Durante la selección de mutantes con ceftazidima y lomefloxacina se pudieron producir mutaciones en los operones *marRAB/soxRS* o *rob* que condujeron a la sobre expresión de MarA, SoxS, Rob. Estas proteínas regulatorias activan la trascricpción de *acrAB*, *tolC* y *micF* y resultan en un incremento en la resistencia a antimicrobianos, debido a una disminución en la expresión de OmpF y a un incremento en el eflujo activo (*Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Aono R. y cols., 1998; Jair K. y cols., 1996; Ariza R. y cols, 1995*). Asimismo la sobre-expresión de otro regulador, SdiA, conduce a un aumento en la expresión de AcrA, AcrB, AcrE, AcrF, AcrD y TolC (*Rahmati S. y cols., 2002; Wei Y. y cols., 2001*). Estas proteínas regulatorias activan independientemente un grupo común de promotores vinculados en la múltiple resistencia a antimicrobianos (*Martin R. y cols., 1999*).

Los niveles de resistencia en los mutantes se elevaron a niveles muy superiores a los de las cepas origen no justificables por la pérdida de OmpF debido a que sólo una de ellas (CazE7) no expresó dicha porina en la membrana. Asimismo observamos un mayor efecto del CCCP sobre los mutantes que sobre las cepas origen. Por lo que suponemos que el aumento de la resistencia a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina y cloranfenicol es en parte debido a la sobre-expresión de alguno de los sistemas protón dependientes.

En definitiva, se puede concluir que alguna o varias de las proteínas regulatorias antes mencionadas podrían estar sobre-expresadas en los mutantes seleccionados con ceftazimida y lomefloxacina y debido a ello se producen incrementos en la expresión de sistemas de eflujo activo que favorecen el desarrollo de altos niveles resistencia a diversos antimicrobianos.

## Tolerancia al Ciclohexano y Expresión de TolC en los Mutantes

En diversas investigaciones se han podido seleccionar bacterias resistentes a solventes orgánicos a partir de poblaciones sensibles a ellos, sugiriendo que las bacterias son capaces de adaptarse de alguna manera a la presencia de estos solventes en el medio (*Weber y cols., 1993*).

Diferentes genes están involucrados en la tolerancia a los solventes orgánicos. En estudios anteriores mutantes de *E. coli* que expresaban fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos y sobre-expresan *marA* (AG102) mostraron ser más tolerantes que la cepa origen AG100 (*White D. y cols., 1997*).

La sobre-expresión de *marA*, *soxS* y *rob* en *E. coli* incrementa la tolerancia al ciclohexano (*White D. y cols., 1997*) y esto es debido al incremento que inducen en la expresión de TolC. Los solventes orgánicos son sustratos de sistemas de eflujo activo TolC dependientes (*White D. y cols., 1997; Oethinger M. y cols., 1998, Randall L., 2002; Aono R. y cols., 1998*). En este sentido procedimos a valorar el incremento en la tolerancia al ciclohexano (técnica en medio líquido) en los mutantes seleccionados con antibióticos, encontrando que todos ellos presentaban una mayor tolerancia a dicho solvente que las respectivas cepas origen y que la cepa control AG100.

El incremento de tolerancia observado en los mutantes tras la adición de un 10% de ciclohexano al medio de cultivo fue de 1,7 a 2,1 veces superior al de las respectivas cepas origen. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por *Asako y cols., 1997* utilizando el mismo método, en dicho estudio se observaron incrementos de 2,1 a 2,6 veces en mutantes de *E. coli* que sobre-expresaban MarA.

Cabe mencionar que a diferencia del método en medio sólido, una técnica cualitativa que evidencia o no el crecimiento ante la presencia de dicho solvente (*White D. y cols., 1997; Oethinger M. y cols., 1998; Tsukagoshi N. & Aono R., 2000*), la técnica en medio líquido utilizada en esta tesis nos permitió cuantificar el incremento de tolerancia.

Evidentemente y como se describe la bibliografía la pérdida de la porina F no está involucrada en la tolerancia al ciclohexano (*Randall L., 2002*), este dato se correlaciona con los resultados de este trabajo de tesis, al encontrar que la cepa CazE7, que carece de la porina F, incrementó la tolerancia al ciclohexano de forma similar a la observada en los otros dos mutantes estudiados.

El incremento en la tolerancia al ciclohexano observado en los mutantes estudiados (LmfE7, CazE7, CazE11) coincidió con la múltiple resistencia observada en el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos ( $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, norfloxacin, ácido nalidíxico, tetraciclina), con la disminución de dichas CMI's ante la presencia de CCCP (inhibidor de sistemas de eflujo protón dependientes) y con la sobre-expresión de *acrB*.

En *E. coli* se han caracterizado 5 sistemas RND: AcrAB, AcrEF, AcrD, MdtEF, MdtABC que necesitan de TolC para sus funciones, como así también los dos sistemas MFS: EmrAB, EmrKY y un sistema de eflujo de la familia ABC (ATP dependiente): MacAB (*Michán C. y cols., 2003*). MacAB confiere resistencia a macrólidos

EmrAB/TolC expulsa al exterior preferentemente cationes lipofílicos, ácido nalidíxico y CCCP (*Putman M. y cols., 2000*). El sistema MdtABC es responsable de la resistencia a desoxicolato, sales biliares y novobiocina aunque recientemente se lo ha asociado a resistencias de bajo nivel a norfloxacin (*Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*) y a resistencias a ciertos  $\beta$ -lactámicos como Oxacilina, nafcilina, carbenicilina sulbenicilina, cloxacilina, no así a aztreonam (*Hirakawa H. y cols 2006; Nishino K. y cols. 2003*). El espectro de resistencia a  $\beta$ -lactámicos obtenido por AcrD es similar al de MdtABC (a excepción del aztreonam), teniendo similitud en la especificidad por sustratos como novobiocina, desoxicolato, y SDS (*Hirakawa H. y cols 2006; Nishino K. y cols. 2003*). La implicación de otros sistemas como EmrKY en la resistencia a antibióticos debe de ser aún demostrada (*Putman M. y cols., 2000*). Asimismo se ha citado que los sistemas EmrAB, EmrKY, MdfA, EmrE y MdtK al igual que MacAB (ATP dependiente) no han mostrado conferir resistencia a  $\beta$ -lactámicos hasta el momento (*Nishino K. y cols., 2003*).

Por su parte, los sistemas de eflujo activo AcrAB/AcrEF (RND) expelen al exterior acriflavina, sales biliares,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, cristal violeta, ciprofloxacina, fluoroquinolonas, ácido nalidíxico, tetraciclina (*Koronakis V. y cols., 2004*).

Por la especificidad de sustrato y el incremento observado en las CMI's de  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, norfloxacin, ácido nalidíxico y tetraciclina, es posible que además del sistema de eflujo activo AcrAB-TolC, pudiera estar implicado también AcrEF-TolC en los fenotipos de multirresistencia presentes en los

mutantes CazE7, LmfE7 y CazE11. Sin embargo no podemos descartar la presencia simultánea y adicional de otros sistemas de eflujo activo TolC dependientes en estas cepas mutantes. *Bohnert Jürgen A. y cols., 2006*).

Ésto se correlacionó con los resultados obtenidos posteriormente al analizar el perfil de proteínas de membrana externa, donde observamos el incremento en la expresión de una banda en torno a los 53 kDa., que se corresponde con la que *Aono y cols., 1998* con la misma metodología identificaron como TolC. Esta banda no se expresa en las cepas origen ni en la cepa sensible AG100 usada como control.

## Otros Mecanismos de Resistencia a Antibióticos $\beta$ -lactámicos

### Involucrados

Sin embargo algún otro mecanismo de resistencia, además de los sistemas de eflujo activo y la pérdida de OmpF en CazE7, deberían estar presente para justificar el marcado incremento en los  $\beta$ -lactámicos ceftazidima (64-128), aztreonam (4-8) y cefpirome (4-32), no plenamente explicados por el eflujo activo y/o la pérdida de OmpF. Estos incrementos fueron superiores a los observados en la CMI de los otros  $\beta$ -lactámicos (cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, imipenem) cuyo incremento fue sólo de 2-4 veces.

Jaffé A. y cols. en 1983 seleccionaron mutantes de *E. coli* con diferentes  $\beta$ -lactámicos, observando que cuando el agente selectivo era cefaloridina dicha cepa mutante (carente de OmpC y OmpF) disminuía la sensibilidad de 2 a 16 veces a los  $\beta$ -lactámicos ensayados (2 veces a ampicilina, carbenicilina, cefotaxima y aztreonam, 8 veces a cefoxitina y cefaloridina y 16 veces a moxalactam), mientras que en la selección con aztreonam la mutante carente de OmpF resultó ser de 2 a 4 veces más resistente (2 veces a ampicilina, carbenicilina, cefotaxima y aztreonam y 4 veces a cefoxitina). En la selección con cefotaxima (mutación no caracterizada en esta tesis) descrita por estos autores las CMI de ampicilina, carbenicilina, cefotaxima y aztreonam se incrementaron 4 veces a y 8 veces para cefoxitina. Otros trabajos también muestran que la pérdida de OmpF contribuye a incrementar 2 veces la resistencia a cefalotina en cepas de *E. coli* (Tavío MM. y cols, 1999), al igual que lo observado con la cepa AG112 (mutante *marR* carente de OmpF) que mostró ser 2 veces más resistente a cefalotina y 8 veces a cefoxitina que la cepa sensible AG100 (Tavío MM. y cols, 2004).

Por su parte, Nikaido H, 1998 observó que la inactivación de *acrAB* en *E. coli*, conduce a incrementar de 2 a 4 veces la sensibilidad para ampicilina y benzilpenicilina. Resultados similares a los citados por Mazzariol A. y cols., 2000, quien observó que al inactivar *acrAB* en cepas mutantes de *E. coli* disminuían las CMI de ampicilina, penicilina G y cefaloridina en un factor de 2 y en un factor de 4 las CMI de carbenicilina y cefoxitina. Mientras que las CMI de cefsulodin, ceftriaxona, cefmetazole, cefazolina, cefepime, ceftazidima, cefpirome e imipenem no variaron en comparación con las de la cepa origen. Como podemos observar y al igual que lo citado en la bibliografía, la pérdida de la OmpF no implicó diferencia en las CMI a ceftazidima entre CazE7 y LmfE7, y sólo el doble para

aztreonam y ceftirome. Asimismo el incremento en el eflujo activo tampoco puede justificar por si solo dichos incrementos.

Además de los mecanismos antes mencionados (pérdida de OmpF y sistemas de eflujo), la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos puede ocurrir por degradación enzimática (enzimas  $\beta$ -lactamasas) y alteraciones del sitio blanco (PBP) (*Tenover, F.C., 2006; Owe Källman y cols., 2003*). Por lo que procedimos a valorar la actividad hidrolítica  $\beta$ -lactamasa sobre bencilpenicilina y cefaloridina en los extractos crudos de las cepas mutantes y de las cepas origen. Los mutantes no mostraron incrementos significativos de actividad enzimática en comparación con las cepas origen, y las cepas LmfE7 y CazE11 mostraron un bajo nivel de actividad hidrolítica de beta-lactamasas, insuficiente para explicar el notable incremento de resistencia a ceftazidima, ceftirome o aztreonam, a tenor de lo descrito en trabajos previos (*Jacoby G.A., y L. Sutton, 1985*). Incluso en CazE7 no se detectó actividad hidrolítica sobre los sustratos utilizados. Por lo que la actividad  $\beta$ -lactamasa no sería un mecanismo que contribuya a la elevada resistencia a  $\beta$ -lactámicos observada en los mutantes.

De esta manera que sólo nos quedaba analizar la presencia de posibles alteraciones en las proteínas de unión a penicilina, sitios blancos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Como mencionamos anteriormente los mutantes seleccionados resultaron ser muy resistentes a ceftazidima, ceftirome y a aztreonam (antimicrobianos que inhiben preferentemente PBP3) e incrementaron aunque de menor manera la resistencia a los otros  $\beta$ -lactámicos como imipenem que posee afinidad por PBP2. Por lo que no sería descartable la presencia de cambios en la expresión de tales PBP.

PBP3 (FtsI) actúa durante la septación, catalizando uniones cruzadas entre los péptidos del septo de peptidoglicano de la pared durante la división celular (*Piette A. y cols., 2004*) y a pesar de su papel en la septación, hasta el momento la hiperexpresión de PBP3 no se asocia con cambios en la morfología de las células bacterianas (*Broome-Smith JR., 1985; Piette A., 2004*). Lo que nos condujo a estudiar el perfil electroforético de proteínas de unión a penicilinas en estas cepas mutantes. En el perfil de proteínas de membrana interna de estas cepas utilizando dos métodos de detección diferentes, Tinción Imperial de Azul de Coomassie y Bocillina fluorescente/luz ultravioleta. Con la separación de extractos crudos de

proteína de membrana interna en geles de poliacrilamida al 12,5 %, observamos un incremento en la expresión de una banda en torno a los 60 kDa. que podría corresponderse a PBP3 (*Liao X. y cols., 1995; Liao X. y cols., 1997*). *Curtis N., 1979* también estableció que la PBP3 tenía un peso molecular aparente de 60 kDa en 12.5% SDS-PAGE. Asimismo, utilizando la misma técnica descrita por *Genshi Zhao y cols. 1999* se detectó el incremento de una banda que por su movilidad electroforética podría corresponderse a la que ellos caracterizaron como PBP3. Esta banda no se expresaba en las cepas origen ni en la cepa sensible AG100 usada como control.

De esta manera podemos suponer que el incremento en la expresión de PBP3 en los mutantes seleccionados con antibióticos, es uno de los mecanismos implicados en la resistencia a ceftazidima, aztreonam y cefpirome sin por ello afectar la morfología bacteriana. La sobre-expresión de PBP3, aunque ha sido descrito, no suele identificarse como mecanismo muy difundido entre bacterias gram negativas, por lo que habría que analizar que posibles reguladores podrían estar condicionando dicho cambio. Además, si bien las mutaciones en PBP3 se han vinculado a la aparición de formas alargadas en las células bacterianas (*Georgopapadakou NH. 1993*), sin embargo la hiperexpresión de PBP3 no se ha asociado a cambios morfológicos detectables en microscopía óptica (*Broome-Smith J.R., 1985; Piette A., 2004*). Pues bien, los mutantes desarrollados mostraron una longitud menor que las respectivas cepas origen, ésto es, en el examen microscópico se presentaban como bacilos algo más cortos que las cepas origen, recordando a la descripción previa de cepas de *E. coli* en las que la sobre-expresión del regulador transcripcional *sdiA* daba lugar a bacilos más cortos a la par que a un incremento de la resistencia a mitomicina C. Este podría ser el caso de los mutantes que caracterizamos en esta tesis, en los que la disminución de susceptibilidad a la mitomicina C no fue revertida por la presencia de CCCP, puesto que tal resistencia no derivaría de la activación de sistemas de eflujo protón dependientes sino directamente de la regulación transcripcional ejercida por *sdiA* tal como han descrito *Wei Y. y cols., 2001*.

La mitomicina C es un antitumoral aislado de cultivos de *Streptomyces*, y usada en quimioterapia. Este compuesto se intercala en el ADN formando un aducto y dispara la respuesta SOS. La resistencia a mitomicina (que no ha sido empleada para la selección de mutantes) es causada por la sobre-expresión de

alguno de los 4 genes de *E. coli* genes (*mdfA*, *gyrI*, *rob*, y *sdiA*). *mdfA* codifica una bomba de eflujo activo cuya sobre-expresión es responsable de resistencia a múltiples drogas, el producto del gen *gyrI* (también llamado *sbmC*) inhibe *in vitro* la actividad de la ADN, *rob* es un activador transcripcional de sistemas de eflujo activo entre ellos el AcrAB y *sdiA* es un activador transcripcional de los genes implicados en la división celular *ftsQAZ*. SdiA también activa la expresión de otros genes como *uvrY* y *uvrC* (protección ultra violeta), *acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, y *acrF* cuyos productos son responsables del eflujo activo de diferentes antimicrobianos. AcrAB interacciona con TolC para formar un eficiente sistema de eflujo activo (Wei Y. y cols., 2001).

Los mutantes seleccionados con antimicrobianos en este trabajo de tesis resultaron ser 2 veces más resistentes a la mitomicina C (4 µg) que las cepas origen PS7 y PS11, por lo que en estas cepas pueden estar sobre-expresado alguno de estos 4 genes : *mdfA*, *gyrI*, *rob*, y *sdiA*.

Al igual que lo planteado anteriormente podemos suponer que en las cepas seleccionadas además de los otros activadores transcripcionales conocidos (MarA, SoxS, Rob) se podría sobre-expresar conjuntamente SdiA, cuya función conocida es la de activar la trascrición de los genes vinculados en la división celular *ftsQAZ* (*ddlB*, *ftsQ*, *ftsA*, y *ftsZ*) ( Wei Y. y cols., 2001) y quizás la sobre-expresión de SdiA pudiera favorecer la expresión de *ftsI* o *pbp3* y por ello estas cepas sobre-expresan la PBP3 como mecanismo complementario que sumado a la disminución de la permeabilidad en la membrana externa y al incremento en el eflujo activo explicaría el alto nivel de resistencia a ceftazidima, ceftiprome y aztreonam en las mutantes.

## **Selección de mutantes multirresistentes a partir de fármacos no antibióticos: Diazepam y Salicilato sódico**

Trabajos previos han descrito que la inducción de múltiple resistencia a antimicrobianos por diferentes agentes terapéuticos tiene como consecuencia una disminución de la expresión de porina F y un incremento en el eflujo activo, uno de los agentes caracterizado por *Tavío MM. y cols., 2004* fue el diazepam.

Hasta el momento sólo se han descrito mutantes multirresistentes seleccionados con antimicrobianos (*Cohen SP. y cols., 1989; Tavío MM. y cols., 1999; Oethinger M. y cols., 2000; Ruiz J. y cols., 2001; Mazzariol A. y cols., 2002; Olofsson S. y cols 2006*).

En la selección con diazepam las frecuencias de selección oscilaron en el orden de  $10^{-7}$  para el primer escalón selectivo y  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  el segundo, tercer y cuarto escalón selectivo. En la selección con salicilato las frecuencias obtenidas fueron de  $10^{-7}$  para el primer escalón selectivo,  $10^{-8}$  para el segundo y tercer escalón selectivo, y de  $10^{-9}$  para el cuarto escalón selectivo. Dichas frecuencias son similares a las obtenidas con ceftazidima ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$ ) y lomefloxacin ( $10^{-9}$ - $10^{-7}$ ) en este estudio. Por lo que las frecuencias de selección están en el rango de las frecuencias observadas para la selección de mutantes con lomefloxacin en esta tesis. *Tavío MM. y cols., 1999*, hallaron frecuencias entre  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  en la selección de mutantes con norfloxacin y lomefloxacin, sin embargo este amplio rango se justificaba en que cuatro de las cepas madre ya presentaban alguna mutación en *gyrA* lo que facilitaba la selección de mutantes con fluoroquinolonas en los primeros escalones selectivos. Por su parte, *Jaffé A. y cols. en 1983* seleccionaron mutantes con diferentes  $\beta$ -lactámicos con frecuencias de selección que fueron  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  para ampicilina,  $10^{-7}$  para carbenicilina, cefotaxima y  $10^{-8}$  para cefaloridina, cefazolina, moxalactam. Las CMI's de las cepas origen sensibles utilizadas en dicho trabajo oscilaron entre 1-2  $\mu\text{g/ml}$  para los diferentes agentes selectivos y los mutantes resultantes presentaron CMI's entre 4-16  $\mu\text{g/ml}$ .

En este trabajo caracterizamos todos los mutantes obtenidos en los diferentes escalones selectivos. Las mutaciones producidas son estables, carácter adquirido que no se perdió tras sucesivas resiembras en medios de cultivo carentes del agente selectivo. Asimismo se constató que los mutantes seleccionados representaban diferentes clones ya que mostraron diferente perfil de susceptibilidades frente a los

antimicrobianos ensayados.

En esta tesis se han desarrollado y caracterizado mutantes estables multirresistentes seleccionados con diazepam y con salicilato sódico a partir de cepas sensibles de *E. coli*, al objeto de compararlos con aquellos otros seleccionados con antimicrobianos en este mismo estudio.

Los mutantes seleccionados con concentraciones suprainhedorias crecientes de salicilato sódico o de diazepam mostraron una disminución de la susceptibilidad a los antimicrobianos ensayados, adquiriendo el mismo comportamiento que mostraron las mutantes seleccionadas con antibióticos.

### • **Susceptibilidad a antimicrobianos en mutantes seleccionados con diazepam**

Para las cepas mutantes seleccionadas con diazepam a partir de las cepas origen PS7 y PS11 observamos que la resistencia incrementa de 2 a 4 veces al ácido nalidíxico, de 4 a 8 veces a lomefloxacin, de 4 a 16 veces a norfloxacin, 2 veces a cefalotina, cefoxitina y cloranfenicol, de 2 a 4 veces a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam, y ceftiprome, de 2 a 8 veces a imipenem, y 2 veces a tetraciclina.

Según los escalones selectivos podemos observar que para el primer escalón selectivo las CMI's aumentan en un factor de 2 a ácido nalidíxico, 4 a lomefloxacin y norfloxacin, 2 a cefalotina, cefotaxima, ceftazidima y ceftiprome mientras que no se observó variación en la CMI's de cefoxitina, aztreonam, imipenem, cloranfenicol.

En el segundo escalón selectivo los mutantes muestran un incremento de 2 veces en las CMI's de las quinolonas respecto al primer escalón selectivo (4 veces a ácido nalidíxico, y lomefloxacin y 8 a norfloxacin). Asimismo la resistencia a cefotaxima, imipenem y aztreonam se incrementó dos veces respecto del primer escalón selectivo. No se encontró diferencia entre las CMI's de cefoxitina, ceftazidima, tetraciclina y cloranfenicol entre el primer y segundo escalón selectivo.

En el tercer escalón selectivo la resistencia a quinolonas, cefalotina, ceftazidima, aztreonam, cefoperazona y cefotaxima es la misma que la observada en el segundo escalón selectivo. Estos mutantes sin embargo incrementaron 2 veces la resistencia a cloranfenicol y cefoxitina y 4 veces a imipenem respecto del escalón anterior.

En el cuarto escalón selectivo se obtuvieron los mutantes más resistentes, dichas cepas fueron 2 veces más resistentes a norfloxacin, ceftazidima, aztreonam y cefoperazona que los mutantes del escalón anterior.

Las CMI's de cefalotina y tetraciclina se incrementaron 2 veces en el primer escalón selectivo y se mantuvieron sin cambios en los demás escalones.

En esta tesis en la selección de mutantes con antimicrobianos, caracterizamos los mutantes del tercer escalón selectivo en la selección con ceftazidima (CazE7 y CazE11) y el mutante del segundo escalón selectivo para lomefloxacin (LmfE7).

Si comparamos estos con el correspondiente escalón selectivo en la selección

con diazepam observamos que:

LmfE7 mostró incrementos de 64 veces a ácido nalidíxico, 32 a lomefloxacina, 16 a norfloxacina, 2 cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, imipenem y tetraciclina, 4 a aztreonam, cefpirome, 128 a ceftazidima, y 256 a cloranfenicol.

EC7/0,75 y EC11/0,75 mutantes seleccionados con diazepam en el segundo escalón selectivo mostraron incrementos de 4 veces a ácido nalidíxico, lomefloxacina, 8 a norfloxacina, 2 a cefalotina, imipenem, cefpirome y tetraciclina.

CazE7 y CazE11 mostraron incrementos en la resistencia en un factor de 4-32 veces a ácido nalidíxico, 16-32 veces a lomefloxacina, 2-32 veces a norfloxacina, 2-4 veces a cefalotina e imipenem, 2-4 veces a cefoxitina y cefotaxima, 64-128 veces a ceftazidima, 4-8 veces a aztreonam, 2 veces a tetraciclina, 2-256 veces a cloranfenicol, 8-32 veces a cefpirome en comparación con las cepas origen PS7 y PS11.

EC7/1 y EC11/1 mutantes correspondientes al tercer escalón selectivo fueron 4 veces más resistentes a ácido nalidíxico, 8 a lomefloxacina, 16 a norfloxacina, 2 a cefalotina, cefoxitina, cloranfenicol y tetraciclina, 4 a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam, cefpirome.

→ Observamos que las CMIs a quinolonas son las se ven afectadas en mayor grado y en menor grado las CMIs de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina.

#### • **Susceptibilidad a antimicrobianos en mutantes seleccionados con salicilato**

En general podemos decir que los mutantes seleccionadas con salicilato de sodio incrementaron la resistencia de 2 a 16 veces para ácido nalidíxico, 4 veces a lomefloxacina, de 4 a 16 veces a norfloxacina, 4 veces a cefalotina, 2 veces a cefoxitina, cefpirome, y aztreonam, de 2 a 8 veces a ceftazidima, de 2 a 8 veces a cefotaxima, de 2 a 4 veces a imipenem y cloranfenicol, y 2 veces a tetraciclina.

Al analizar los diferentes escalones selectivos observamos que en el primer escalón selectivo las CMIs se incrementan en un factor de 2-4 a ácido nalidíxico, 4 veces a lomefloxacina, y de 4-12 veces a norfloxacina, de 2-4 veces a cefalotina y cefotaxima, 2 veces a ceftazidima, imipenem, cloranfenicol y tetraciclina. No se hallaron diferencias en las CMIs de cefoxitina, aztreonam y cefpirome con las cepas origen.

En el segundo escalón selectivo y al igual que en la selección con diazepam

se incrementa 2 veces la resistencia a quinolonas, a excepción de lomefloxacin cuya CMI se mantuvo estable entre los diferentes escalones selectivos. Asimismo se produce un incremento de 2 veces en la resistencia a cefoxitina, aztreonam, cloranfenicol, y ceftazidima respecto del anterior escalón, no encontrando diferencias en las CMIs de imipenem, ceftiofima, tetraciclina y cefotaxima.

En el tercer escalón selectivo se incrementa 2 veces la resistencia a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam, imipenem y ceftiofima con respecto al escalón anterior. Las demás CMIs son coincidentes a las del escalón anterior.

Solamente obtuvimos un mutante en el 4 escalón selectivo que fue 2 veces más resistente a norfloxacin y cefotaxima que la del tercer escalón.

Si comparamos los mutantes seleccionados con antimicrobianos con los seleccionados con salicilato de sodio correspondientes al mismo escalón selectivo observamos que:

LmfE7 (mutante del 2º escalón selectivo) mostró incrementos de 64 veces a ácido nalidíxico, 32 a lomefloxacin, 16 a norfloxacin, 2 cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, imipenem y tetraciclina, 4 a aztreonam, ceftiofima, 128 a ceftazidima, y 256 a cloranfenicol.

Mientras que EC7/60 y EC11/60 (mutantes del 2º escalón selectivo) incrementaron la resistencia en un factor de de 4 a 8 a ácido nalidíxico, 4 a lomefloxacin, 8-16 a norfloxacin, 4 cefalotina, cefotaxima, aztreonam, 2-4 ceftazidima, 2 cefoxitina, imipenem, tetraciclina, 1-4 a cloranfenicol. No variando la CMI a ceftiofima.

CazE7 y CazE11 (mutantes del 3º escalón selectivo) mostraron incrementos en la resistencia en un factor de 4-32 veces a ácido nalidíxico, 16-32 veces a lomefloxacin, 2-32 veces a norfloxacin, 2-4 veces a cefalotina e imipenem, 2-4 veces a cefoxitina y cefotaxima, 64-128 veces a ceftazidima, 4-8 veces a aztreonam, 2 veces a tetraciclina, 2-256 veces a cloranfenicol, 8-32 veces a ceftiofima en comparación con las cepas origen PS7 y PS11.

Mientras que EC7/80 y EC11/80 (mutantes del 3º escalón selectivo) incrementaron la resistencia en un factor de 8-16 a ácido nalidíxico, 4 a lomefloxacin, 8-16 a norfloxacin, 4-8 ceftazidima y cefotaxima, 4 a cefalotina, aztreonam, imipenem, cloranfenicol, 2 a cefoxitina, tetraciclina y ceftiofima.

➔ Observamos que al igual que lo observado en la selección con diazepam, las CMIs a quinolonas son las que se ven afectadas en mayor grado y en menor grado

las CMI's de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina.

El incremento de la resistencia observado en la selección con diazepam y salicilato es coincidente con el incremento en el escalón selectivo y/o concentración de agente selectivo utilizado. Podemos observar que en general hay un incremento de 2-4 veces en la resistencia a diversos antimicrobianos entre los diferentes escalones selectivos.

*Cohen SP. y cols., 1989* seleccionó mutantes con cloranfenicol y tetraciclina que mostraron mayor resistencia a medida que se incrementaba la concentración del agente selectivo en el medio y el escalón selectivo. Asimismo describieron que la resistencia a tetraciclina y cloranfenicol se incrementaba 2 veces a medida que aumentaba la concentración del agente selectivo en el medio de cultivo, de forma similar a lo que ocurrió en los mutantes seleccionados con diazepam o salicilato en esta tesis.

Estos resultados a su vez coinciden con los expresados por *Kern y cols., 2000*, en dicho trabajo seleccionaron mutantes con fluoroquinolonas, y observaron que en el primer escalón selectivo se afectan principalmente las CMI's de ácido nalidíxico, ofloxacina y ciprofloxacina, sin embargo, en este escalón no se vieron afectadas las CMI's a cefoxitina, tetraciclina y cloranfenicol. En el segundo y tercer escalón selectivo dichas resistencias se incrementan de 2-4 veces respecto del escalón anterior. En este trabajo a pesar de que la selección fue con drogas que no son antimicrobianos también observamos que las CMI's de las quinolonas son las que primeras que se ven afectadas, y luego la de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina.

El perfil de resistencia obtenido en la selección con diazepam es similar al obtenido en la selección con salicilato de sodio.

Si a su vez comparamos estos valores con los obtenidos en la selección de mutantes con antibióticos, podemos observar que para algunos antimicrobianos los mutantes seleccionados con antibióticos fueron de 8 a 16 veces más resistentes a ceftazidima, de 4 a 8 veces a lomefloxacina, 2 a 4 veces a ácido nalidíxico y aztreonam, 2 veces a cefpirome, y para el cloranfenicol, si bien algunos mutantes no mostraron diferencia, otras fueron hasta 64 veces más resistentes que los mutantes seleccionados con diazepam y salicilato, sin embargo las CMI's para norfloxacina, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, imipenem y tetraciclina los incrementos fueron similares a los hallados en la selección con diazepam y

salicilato.

→ Por lo que podemos observar similares comportamientos entre los mutantes seleccionados con antimicrobianos y los seleccionados con fármacos no antibióticos. Sin embargo hay que resaltar que las CMIs a ceftazidima fueron muy superiores en la selección con antimicrobianos que en la selección con diazepam y salicilato.

## **Papel de la Permeabilidad en la Multirresistencia de los Mutantes Seleccionados *in vitro* con diazepam y salicilato**

Como mencionamos anteriormente los mutantes seleccionados *in vitro* con diazepam y salicilato mostraron un incremento simultáneo en la resistencia a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina, y ésto es frecuente en los mutantes que expresan fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos (*Alekshun M. y Levy SB. 1997; Goldman J., 1996; Cohen SP. & Levy SB., 1993*).

En este sentido, la disminución en la susceptibilidad a quinolonas, antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina está asociada a la sobreexpresión de proteínas regulatorias como MarA, SoxS, Rob y SdiA. En concreto, MarA (*Barbosa T. & Levy SB., 2000*), SoxS (*Koutsolioutsou A. y cols., 2005; Aono R. y cols., 1998*) y Rob (*Lee Eun-Hee y cols., 1996*) activan la expresión de múltiples genes, entre ellos *micF*.

*micF* controla la expresión post transcripcional de *ompF* codificando un ARN parcialmente complementario al ARNm *ompF*, de manera que se forma un complejo *micF* ARN/ *ompF* ARN que induce la degradación del ARNm *ompF* y por lo tanto, se inhibe la traducción de *ompF*. Ésto lleva a una disminución en la expresión de la porina F en la membrana externa bacteriana (*Delihias N. & Forst S., 2001*).

Esto concuerda con lo que observamos al analizar el perfil de proteínas de la membrana externa de los mutantes seleccionados con diazepam y salicilato en geles de poliacrilamida suplementados con SDS y 4 M de Urea. En ellos observamos que las cepas mutantes presentaban una disminución en la expresión de OmpF, y dicha expresión disminuía a medida que incrementábamos el escalón selectivo.

La pérdida y/o disminución de la OmpF debió influir en la penetración de antibióticos como cefalotina o cefoxitina y otras cefalosporinas cuya difusión relativa a través de esta porina es notable (*Yoshimura F & Nikaido H., 1985*). Excepto para cefalotina cuyo incremento fue de 2-4 veces en la resistencia se mantuvo constante entre los diferentes escalones selectivos, las resistencias a cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefoperazona, imipenem y aztreonam se fueron incrementando a medida que incrementábamos el escalón selectivo y por ende disminuía la expresión de OmpF.

Diversos estudios muestran que la penetración de los  $\beta$ -lactámicos depende

de diversos factores como la distribución de la carga en la molécula. Se ha visto que compuestos zwitteriónicos como ampicilina y cefaloridina penetran más rápidamente que los monoaniónicos (cefotaxima y ceftaxima) y estos a su vez más que los di-aniónicos/mono-catiónicos (ceftazidima) y esta última más que los di-aniónicos (ceftriaxona) (*Danelon C. y cols., 2006*). Por lo que la disminución de OmpF afectara primeramente a cefalotina, luego cefotaxima y ceftaxima y posteriormente a ceftazidima. Ésto es lo que evidenciamos en nuestro estudio, donde observamos que la resistencia a ceftazidima fue mayor en los últimos escalones selectivos. Resultado que indica que OmpF contribuye a incrementar la resistencia a estos  $\beta$ -lactámicos. Cefpirome es una cefalosporina zwitteriónica de cuarta generación, sin embargo el mayor incremento fue observado en los últimos escalones selectivos. Esto puede deberse a que es de mayor tamaño que cefalotina y cefaloridina y que por eso su velocidad de difusión se ve más influida por la disminución de la porina F (*Simonet V. y cols., 2000*). Imipenem y aztreonam mostraron un incremento de 2-4 veces en su resistencia que coincide al observado en otros mutantes carentes de OmpF (*Cornaglia G., 1992, Poirel L. y cols., 2004; Sawai T., 1982; Hiraoka M., 1989*).

*Tavío MM., y cols., 1999* observaron que la deficiencia de la porina F también contribuye a incrementar de 2 veces la resistencia a tetraciclina y de 2-4 a fluoroquinolonas. En este estudio observamos un incremento en 2 veces en la resistencia a tetraciclina, pero este incremento fue independiente de la disminución de la expresión de OmpF asociada al aumento del escalón selectivo. Resultado que puede indicar que se estén expresando otros mecanismos como los de eflujo activo. (*Bambeke F.V. y cols., 2000*). Asimismo el incremento en la resistencia a quinolonas observado en los mutantes seleccionados tanto con diazepam como con salicilato osciló entre 2-16 veces. Un incremento que no puede ser justificado solamente por la menor expresión de OmpF.

De esta manera no pudiendo justificar todos los incrementos en las CMI's por la sola disminución en la expresión de OmpF, debíamos analizar la presencia conjunta de otros mecanismos de resistencia como los sistemas de eflujo activo.

## **Papel de la Expulsión o Eflujo Activo de Antimicrobianos en el Fenotipo de Multirresistencia**

MarA, SoxS, Rob y SdiA activan además la expresión del sistema de eflujo AcrAB-TolC. La sobre-expresión de este sistema produce un incremento de 2-8 veces para  $\beta$ -lactámicos como ampicilina, cefuroxima, cefotaxima (Nishino K., 2003), 2-8 veces para quinolonas, 4-6 veces para cloranfenicol y 4-16 veces para tetraciclina (Elkins CA. & Nikaido H., 2002). En la bibliografía suelen encontrarse resultados que difieren entre sí puesto que los mismos varían también según el grado en que se expresa esta bomba de eflujo en cepas de *E. coli* (Nicoloff Hervé, 2006).

Los transportadores transmembrana protón dependientes actúan con mecanismos complementarios en el desarrollo de resistencia a antimicrobianos. Estos sistemas, formados por tres componentes (traslocasa-proteína de fusión-proteína de membrana externa), suelen expulsar diferentes sustratos y en muchas ocasiones antimicrobianos de diferentes tipos, tal es el caso de AcrAB-TolC. La bomba AcrB pertenece a la familia RND, y está involucrada en el eflujo activo de diversos antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, rifampicina, eritromicina, ácido fusídico y aminoglicósidos (Bambeke F.V. y cols., 2000).

En este sentido para evidenciar la presencia de sistemas de eflujo activo en los mutantes seleccionados utilizamos CCCP (*carbonil cianuro clorofenilhidrazona*), un inhibidor de los sistemas de eflujo protón dependiente. En presencia de este compuesto se produjo un incremento en la susceptibilidad a todos los antimicrobianos ensayados, entre ellos cloranfenicol, tetraciclina y norfloxacin, que como es de esperar son sustratos de AcrB (traslocasa). Así trabajos previos han identificado a AcrAB-TolC como el principal mecanismo responsable de múltiple resistencia a drogas en *E. coli* (Nikaido H., 1996; Nicoloff Hervé, 2006; Balagué C., 2001; Elkins C., 2002).

En este trabajo de tesis hemos observado un marcado efecto del CCCP sobre la sensibilidad de todos los antimicrobianos ensayados. El efecto del CCCP fue más marcado a medida que incrementábamos el escalón selectivo resultado que se relaciona con el incremento en la resistencia. Podemos observar que en los mutantes seleccionados el CCCP tiene mayor efecto sobre las quinolonas y menor efecto sobre  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina y cloranfenicol. Estos resultados coinciden

con que la mayor resistencia a quinolonas observada en dichos mutantes. Como mencionamos anteriormente la pérdida de OmpF por si sola no podía justificar los incrementos observados en la resistencia a ellas, y mediante en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de CCCP (inhibidor de los sistemas protón dependientes) se puso de manifiesto la presencia de sistemas de eflujo protón dependientes como mecanismo complementario en el desarrollo de resistencia.

Sin embargo, el efecto del CCCP sobre la susceptibilidad antibiótica fue más marcado en los mutantes seleccionados con diazepam y salicilato (en los mutantes seleccionados con diazepam observamos una disminución de la CMI en un factor de 2-32 para quinolonas, 2-16 beta-lactámicos, 2-16 cloranfenicol, 2-4 tetraciclina y con salicilato de 2-16 quinolonas, 2-4 beta-lactámicos, 2-8 cloranfenicol, 2-4 tetraciclina) que en los mutantes seleccionados con antibióticos (observamos una disminución en las CMI en un factor de 2-4 para quinolonas, 2-4 para beta-lactámicos, excepto imipenem cuya CMI disminuyó 8 veces, 4-16 para tetraciclina y de 4 para cloranfenicol) asociado a la expresión de AcrAB-TolC, lo que indica un mayor papel del eflujo activo en el desarrollo de los fenotipos de múltiple resistencia derivados de la selección con drogas no antimicrobianas como diazepam o salicilato, coincidiendo con descripciones previas sobre mutaciones responsables de resistencia a quinolonas determinadas por la fluorquinolona que actúe como agente selectivo. Quizás los mutantes seleccionados en nuestro estudio con diazepam o salicilato estén expresando además de AcrAB otros sistemas de eflujo activo protón-dependientes o que en dichas mutantes el nivel de expresión sea mayor que en las seleccionadas con antibióticos. En este sentido, *Lee A. y cols., 2001* observaron que la expresión simultánea de sistemas de eflujo activo en cepas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* tiene efectos adictivos en la resistencia antimicrobiana, sobre todo cuando dichos sistemas de eflujo tienen diferente organización estructural, observando un efecto máximo cuando se sobre expresa un sistema multi-componente con un mono-componente.

Asimismo *Kobayashi K. y cols. 2001* citaron que AcrEF no es esencial para cepas de *E. coli*, sin embargo esta lo conserva sin expresión como parte de una estrategia que le permite activarlo en condiciones ambientales nocivas para ellas e incluso como sistema de eflujo que puede sustituir a AcrAB en caso de inactivación de este último.

Por lo que observamos que una misma bacteria puede expresar

simultáneamente diferentes sistemas de eflujo los cuales a su vez sustratos comunes dando así mayores niveles de protección (*Paulsen I.T., 1996*).

Lo que es evidente es que en todos los mutantes seleccionados ya sea con antimicrobianos como con diazepam y salicilato, los sistemas de eflujo activo contribuyen a la múltiple resistencia que manifiestan dichas cepas.

Sin embargo, no tenemos referencias de trabajos previos que caractericen los mecanismos de resistencia implicados en mutantes estables multirresistentes desarrollados in vitro con diazepam y con salicilato sódico.

## Papel de TolC en los Mutantes Seleccionados con Diazepam o Salicilato

### Sódico

TolC es el tercer componente de estos sistemas de eflujo activo y su presencia resulta indispensable para la actividad de la principal bomba de eflujo en *E. coli*, AcrAB, pero además esta proteína interacciona con otros sistemas de eflujo, en *E. coli* se han caracterizado 5 sistemas RND: AcrAB, AcrEF, AcrD, MdtEF, MdtABC que necesitan de TolC para sus funciones, como así también los dos sistemas MFS: EmrAB, EmrKY y un sistema de eflujo de la familia ABC (ATP dependiente): MacAB (*Michán C. y cols., 2003*). Sin embargo estos tres últimos sistemas a pesar de ser dependientes de TolC no están hasta el momento asociados a incrementos en la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (*Nishino K., 2003*).

Diferentes estudios relacionan la hiperexpresión de AcrAB-TolC con la resistencia a los solventes orgánicos (*Hayashi S. y cols., 2003; Aono R. y cols., 1998; Kobayashi K., 2001*), pero recientemente se ha establecido que los diferentes sistemas de eflujo dependientes de TolC están involucrados en la tolerancia a los mismos, donde TolC sigue siendo el elemento indispensable (*Aono R. y cols., 1998; Tsukagoshi N. & Aono R., 2000*). El nivel de expresión de *tolC* es regulado directamente por los activadores transcripcionales MarA, SoxS y Rob (*Aono R. y cols., 1998*) entre otros activadores transcripcionales. Es evidente entonces que la sobre-expresión de TolC es necesaria para que cepas de *E. coli* manifiesten tolerancia a los solventes orgánicos (*Kobayashi K. y cols., 2001*).

Todas las cepas mutantes seleccionadas con diazepam y salicilato presentaron un incremento en la tolerancia al ciclohexano y dicha tolerancia se incrementaba a medida que aumentábamos el escalón selectivo. En los mutantes seleccionados con Diazepam obtuvimos incrementos de tolerancia al ciclohexano de 1,8 a 3 veces superior que los observados en las cepas origen. Por su parte, los mutantes seleccionados con Salicilato de Sodio mostraron el mismo comportamiento, obteniéndose incrementos de 1,9-3,1 superiores a los de la cepa origen. Las cepas origen (PS7 y PS11) al igual que la cepa control AG100, no fueron tolerantes al ciclohexano.

El mayor incremento en la tolerancia al ciclohexano fue observado en el último escalón selectivo de los mutantes seleccionados con diazepam y salicilato. Resultado que se correlaciona con el mayor incremento de resistencia a

antimicrobianos observado en el último escalón selectivo a la vez que el mayor efecto del CCCP.

A su vez el incremento en la tolerancia al ciclohexano observado en estos mutantes fue algo superior que la manifestada por los mutantes seleccionados con antibióticos, cuyos incrementos oscilaron 1,7 a 2,1, es decir que posiblemente se estén expresando otros sistemas de eflujo dependientes de TolC además de AcrAB. Estos datos a su vez se correlacionan con los que mencionamos anteriormente al observar un mayor efecto del CCCP sobre la sensibilidad a los antimicrobianos ensayados en los mutantes seleccionados con diazepam/salicilato que en los seleccionados con antimicrobianos.

En estudios recientes se ha establecido que los diferentes sistemas de eflujo que interactúan con TolC son los que están involucrados en la tolerancia a los solventes orgánicos donde TolC sería el elemento indispensable (*Tsukagoshi N. & Aono R., 2000*).

La sospecha de sobre-expresión de TolC, derivada del incremento de tolerancia al ciclohexano, fue demostrada en los 19 mutantes seleccionados con diazepam y salicilato sódico en este estudio y se confirmó por la evidencia de la incrementada expresión de una banda de 53 kDa en el perfil electroforético de proteínas de membrana externa, que se correlaciona con la que *Aono R. y cols., 1998*, caracterizaron por la misma metodología como TolC.

Es necesario tener en cuenta que además de AcrAB pueden participar otros sistemas de eflujo en la tolerancia al ciclohexano. En estos últimos años, se encontró que la hipersensibilidad observada en cepas mutantes de *E. coli* con depleción de *acrAB* a los solventes orgánicos, era parcialmente suprimida por la sobre-expresión de *emrAB* o *yhiUV*, también pertenecientes a la familia RND (*Tsukagoshi N. & Aono R., 2000*).

Asimismo otro de los sistemas de eflujo posibles en *E. coli* es AcrEF, si bien sabemos que no se expresa o se expresa muy débilmente en cepas de *E. coli* y que la deleción de dicho operón no altera la sensibilidad de la *E. coli* a los solventes orgánicos, recientemente se asocia su sobre-expresión con incrementos en la tolerancia al ciclohexano siempre que este presente TolC (*Kobayashi K. y cols., 2001*). AcrF es una proteína de membrana interna con un peso molecular de 111,4 kDa., a esta proteína se la detectó en SDS-PAGE con tinción de plata en torno a los 100 kDa (*Kobayashi K. y cols., 2001*). Al analizar el perfil de proteínas de

membrana interna de las mutantes seleccionadas con diazepam y salicilato, observamos el incremento de una banda en torno a los 100 kDa, que podría corresponder a AcrF, que se expresa débilmente en las cepas origen PS7 y PS11.

El patrón de sensibilidad manifestado por cepas que sobre-expresan AcrEF es muy similar al que se manifiesta por la sobre-expresión de AcrAB (*Nishino K. y cols., 2003*) y a su vez, ambos sistemas de eflujo tienen la misma especificidad de sustrato (*Koronakis V. y cols., 2004*). Finalmente, cabe comentar que a pesar de que el operón *acrEF* no es esencial para la supervivencia de *E. coli*, su presencia representa otro mecanismo de defensa ante situaciones adversas como la inactivación del operón *acrAB* (*Kobayashi K. y cols. 2001*)

La expresión de AcrEF es activada por la sobre-expresión del regulador SdiA y no por otros activadores transcripcionales como MarA, SoxS o Rob. El regulón SdiA abarca un amplio número de genes del cromosoma de *E. coli*, incluyendo bombas de eflujo como *acrAB* y *acrD* y muchos de los genes implicados en la respuesta bacteriana a diferentes condiciones de estrés (*Wei Y. y cols., 2001*).

Además, regula la expresión del operón *ftsQAZ*, que tiene un papel principal en el control de la septación celular bacteriana *Wang X.D. y cols., 1991*, de manera que la amplificación de SdiA resulta en células más redondeadas y cortas *Wei Y. y cols., 2001*, tal como ocurrió en los mutantes seleccionados con diazepam o salicilato en esta tesis. Asimismo, se ha descrito la correlación entre sistemas de respuesta bacteriana sensibles a quórum (cuyo representante en *E. coli* sería SdiA) y la exportación de señales de comunicación intercelular a través de AcrAB, señales que en *Pseudomonas aeruginosa* son en algunos casos un tipo de quinolonas sintetizadas por la propia bacteria (*Rahmati S. y cols., 2002*).

En el caso de los mutantes estudiados LmfE7, CazE7 y CazE11 se apreció un mayor incremento de resistencia a quinolonas que a otros antimicrobianos, asociado al incremento de resistencia a mitomicina C y al acortamiento y balonamiento de las células, por lo que es posible pensar que la sobre-expresión de *sdiA* pudiera contribuir activando el fenotipo de múltiple resistencia en estos mutantes, aunque estudios más extensos en este campo deberán ser llevados a cabo para confirmar esta hipótesis.

## Otros mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos

### $\beta$ -lactámicos

Al igual que lo ocurrido con los mutantes seleccionados con antibióticos, la disminución en la expresión de OmpF y el incremento en el eflujo activo, si bien son mecanismos que producen resistencia a antimicrobianos, no explican por sí solos la resistencia a  $\beta$ -lactámicos que se observó en los mutantes. Teniendo en cuenta el papel principal de las  $\beta$ -lactamasas la resistencia a dichos antimicrobianos (*Babic M. y cols., 2006; Weber DJ. y cols., 1999; Keith SK. y cols., 2000*), procedimos a la valoración de la actividad hidrolítica  $\beta$ -lactamasa de dichas mutantes, valorando la actividad hidrolítica  $\beta$ -lactamasa sobre bencilpenicilina y cefaloridina en los extractos crudos de las cepas mutantes y de las cepas origen. Los mutantes no mostraron incrementos significativos de actividad enzimática en comparación con las cepas origen. Por lo que la actividad hidrolítica por  $\beta$ -lactamasa no explica la resistencia a  $\beta$ -lactámicos descrito en trabajos previos (*Jacoby G.A. & Sutton L., 1985*).

Si bien la resistencia ceftazidima, cefoperazona y aztreonam es mucho menor a la observada en la selección de mutantes con antibióticos, analizamos el perfil de proteínas de unión a penicilina en geles de poliacrilamida al 12,5% para observar si alguna variación en las dianas podría estar contribuyendo en la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos observada en los mutantes. En este sentido se observó que, al igual que en los mutantes seleccionados con lomefloxacin o ceftazidima, el incremento en la expresión de una banda en torno a los 60 kDa., que podría corresponderse con la PBP3. Asimismo utilizando la misma técnica descrita por *Genshi Zhao y cols. 1999* se detectó el incremento de una banda que por su movilidad electroforética podría corresponderse a la que ellos caracterizaron como PBP3. Esta banda no se expresaba en las cepas origen PS7 y PS11 ni en la cepa sensible AG100 usada como control.

Estudios anteriores muestran que antibióticos como aztreonam, ceftazidima y cefpirome se unen preferentemente a la PBP3 (*Xiao L., 1997; Georgopapadakou N. y cols 1982*), al encontrarse sobre expresada esta proteína es de esperar que la CMI se incremente de 2-8 veces para los antimicrobianos target de la PBP3 (*Xiao L., 1997*). En este estudio encontramos que en las cepas seleccionadas con diazepam, la CMI a ceftazidima, aztreonam y cefpirome se ve incrementada de 2-4 veces, mientras que con las cepas seleccionadas con salicilato de sodio obtuvimos

un incremento de 2-8 veces para ceftazidima y 2 veces para aztreonam y cefpirome. Estos incrementos varían asimismo con el escalón selectivo. La sobre-expresión de PBP3 en estas cepas, al igual que lo que encontramos con los mutantes seleccionados con antibióticos, puede ser un mecanismo complementario a los que tradicionalmente se publicaron en mutantes con fenotipo de múltiple resistencia, esto es, la disminución de la expresión de la porina F y la sobre-expresión de sistemas de eflujo activo, de manera que conjuntamente contribuirían al incremento de la resistencia observado a dichos antibióticos  $\beta$ -lactámicos (*Nikaido H., 1996; Hhans-jörg Linde, 2000; Tavío MM. y cols, 2001; Balagué C. y cols., 2001; Randal LP., 2002*), en especial en el incremento de la resistencia observado a ceftazidima, cefpirome y aztreonam, que son de los antibióticos ensayados aquéllos más afectados por una hiperexpresión de PBP3 (*Liao X. & Hancock R., 1997; Georgopapadakou N. y cols., 1982; Taschner P. y cols., 1988; Tormo A. y cols., 1986*).

Posiblemente la sobre-expresión de PBP3 en cepas mutantes de *E. coli* tenga que ver con que esta proteína está involucrada en la síntesis de la pared y en procesos fisiológicos como elongación, septación y mantenimiento de la forma celular (*Georgopapadakou NH., 1993*) por lo que la bacteria podría de alguna manera estar alterando la pared como respuesta celular al estrés (*Giuliodori A. y cols., 2007*).

Al igual que lo obtenido en las mutantes seleccionadas con antimicrobianos, las mutantes seleccionadas con diazepam y salicilato resultaron ser de 4 a 8 veces más resistentes a la mitomicina C (4  $\mu$ g) que las cepas origen PS7 y PS11, por lo que en estas cepas podrían sobre-expresarse alguno de estos 4 genes: *mdfA*, *gyrI*, *rob*, y *sdiA*.

SdiA activa la transcripción de diversos genes entre los que encontramos *acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, y *acrF* cuyos productos son responsables del eflujo activo de diferentes antimicrobianos (*Wei Y. y cols., 2001*). Esto se correlaciona con lo observado en el perfil de proteínas de membrana interna de las cepas mutantes seleccionadas con diazepam y salicilato, cuando observamos el incremento de una banda en torno a los 100 kDa, que podría corresponder a AcrF, que se expresa débilmente en las cepas origen PS7 y PS11. Asimismo, SdiA activa la transcripción de genes vinculados en la división celular *ftsQAZ* (*ddlB*, *ftsQ*, *ftsA*, y *ftsZ*) (*Wei Y., y cols., 2001*) por lo que posiblemente active la expresión de *ftsI* o *pbp3* y por ello

estas cepas sobre-expresan la PBP3. Explicación que podría valer también para el caso de los mutantes de este estudio seleccionados con antimicrobianos.

Observamos que los mutantes de *Escherichia coli*, seleccionados con fármacos no antibióticos, como diazepam y salicilato de sodio, ponen de manifiesto mecanismos similares a los encontrados en las mutantes seleccionadas con antibióticos, y que en definitiva tienen como objetivo incrementar la supervivencia bacteriana ante diferentes situaciones de estrés, pudiendo ser la multirresistencia a drogas consecuencia directa de esa respuesta de supervivencia

# CONCLUSIONES

1. Los fármacos usados como pre-anestésicos o medicación post-quirúrgica ensayados en este trabajo (clonazepan, ketorolaco, clorpromazina, dexametasona, haloperidol, metamizol, diclofenaco, fenobarbital, propacetamol) al igual que el salicilato inducen de forma concentración o dosis dependiente el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos en la cepa sensible de *Escherichia coli* AG100.

→ Esta afirmación se sustenta en los siguientes resultados experimentales: Sólo concentraciones sub-inhedorias de los nueve medicamentos ensayados equivalentes a 1/4 y 1/128 de las CMI de esos fármacos en la cepa AG100 disminuyeron *in vitro* la expresión de la porina F, incrementaron la tolerancia a solventes orgánicos como el ciclohexano, el eflujo o expulsión activa y la expresión de TolC, dando como resultado la disminución de susceptibilidad a múltiples antimicrobianos observada en la cepa AG100 bajo inducción con esos fármacos.

2. Dosis habituales usadas en adultos de siete de los fármacos ensayados (diclofenaco, dexametazona, haloperidol, fenobarbital, metamizol, clonazepam, propacetamol) podrían alcanzar las concentraciones plasmáticas que son capaces de inducir la expresión de fenotipos de multiresistencia en *E. coli*, quizás a través de la inducción de la expresión de activadores transcripcionales como MarA u otras proteínas homólogas en cepas de *E. coli*.
3. Siempre que el rango terapéutico de una droga sea mayor que la concentración mínima inhibitoria de ese fármaco sobre una cepa bacteriana no habrá inducción de múltiple resistencia a antimicrobianos como sucedería con la clorpromazina respecto de la cepa AG100.
4. Las concentraciones sub-inhedorias de otros compuestos como paraquat y cloruro de sodio comprendidas en un rango de 1/4 y 1/128 de sus CMI en la cepa AG100, también reprimieron *in vitro* la expresión de la porina F, incrementaron la tolerancia a solventes orgánicos como el ciclohexano,

incrementaron el eflujo o expulsión activa de antimicrobianos y la expresión de TolC, induciendo la expresión de fenotipos de múltiple resistencia en la cepa sensible AG100.

5. La inducción *in vitro* del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos en *E. coli* no dependió de la estructura química del compuesto utilizado como inductor, sino que fue dependiente de la dosis, sugiriendo que puede ser una respuesta bacteriana al estrés ambiental motivado por una concentración creciente de la droga ensayada como inductor en el medio de cultivo.
6. Es posible seleccionar *in vitro* mutantes estables de *E. coli* más resistentes a antimicrobianos con el fármaco no antimicrobiano diazepam al igual que con salicilato de sodio, un inductor del operón *marRAB*.

→ Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- La frecuencia de selección obtenida fue similar a la que obtuvimos en la selección *in vitro* de mutantes estables con antimicrobianos ceftazidima y lomefloxacina.
- Los nuevos fenotipos multirresistentes seleccionados tanto con diazepam como con salicilato fueron estables, no variando su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos con las sucesivas resiembras en medios de cultivo carentes del agente selectivo.

7. Los mutantes seleccionadas *in vitro* con diazepam y salicilato de sodio presentaron un perfil de resistencia similar al obtenido en la selección con antimicrobianos (ceftazidima y lomefloxacina), equiparable al patrón que presentan las cepas que expresan el fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos.

→ Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- Se apreció una alta correlación entre las CMIs de los antimicrobianos ensayados en los mutantes seleccionados con antimicrobianos y las

CMI de los mismos antimicrobianos en los mutantes seleccionados con diazepam o con salicilato sódico.

- En todos los mutantes, tanto los seleccionados con antimicrobianos como los seleccionados con diazepam o salicilato sódico, se observó una disminución en la expresión de la porina F.

- En todos los mutantes seleccionados se confirmó la presencia de sistemas de eflujo protón-dependientes evidenciados por el efecto del CCCP, la mayor tolerancia al ciclohexano y a una mayor expresión de TolC en el perfil de proteínas de membrana externa.

**8.** El desarrollo de fenotipos de múltiple resistencia estables generados por drogas que sean o no antimicrobianos no supuso siempre la pérdida de expresión de la porina F, ya que sólo ocurrió en uno (CazE7) de los 18 mutantes seleccionados. En el resto de los mutantes sólo se evidenció una disminución en la expresión de dicha porina.

**9.** No se observó asociación entre el sistema EnvZ/OmpR y el nivel de expresión de OmpF en las cepas mutantes seleccionadas con antimicrobianos, en los CazE11 y LmfE7 se asoció la disminución de la expresión de la porina F con un incremento en la expresión de *micF* por un mecanismo en el que podrían estar involucrados el operón *marRAB* y/o *soxRS*, mientras que en CazE7 el activador transcripcional *rob* podría estar implicado.

**10.** Las CMI de las quinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacin y lomefloxacin) fueron las que experimentaron un mayor incremento en los procesos de selección tanto con antimicrobianos como drogas no antimicrobianas. Especialmente en los mutantes seleccionados con lomefloxacin y en los seleccionados con diazepam o salicilato sódico.

- 11.** Entre los mecanismos responsables de la resistencia a quinolonas, la sobre-expresión de sistemas de eflujo activo protón dependientes jugaron un papel importante tanto en los mutantes seleccionados con antimicrobianos como en los mutantes seleccionados con diazepam o con salicilato sódico. Defectos en la permeabilidad sumados a la expulsión activa fueron factores determinantes en los incrementos de resistencia a quinolonas observados en estos mutantes.
- 12.** Es posible que la sobre-expresión simultánea de los sistemas de eflujo o expulsión activa AcrAB-TolC y AcrEF-TolC contribuyeran al incremento de la resistencia a quinolonas, beta-lactámicos, cloranfenicol y tetraciclina observado en los mutantes seleccionados tanto con antimicrobianos como con diazepam o salicilato sódico.
- 13.** El incremento de resistencia al aztreonam observado en los mutantes (4-8 veces en los mutantes seleccionados con antimicrobianos y 2-4 veces en los seleccionados con diazepam o salicilato sódico) podría estar asociado a la sobre-expresión de AcrD.
- 14.** El desarrollo de fenotipos de múltiple resistencia a antimicrobianos tanto en las cepas seleccionadas con antimicrobianos como en aquellas seleccionadas con diazepam o con salicilato sódico se asoció a una mayor expresión de PBP3, concordante con el mayor incremento de resistencia observado a aztreonam, ceftazidima y cefpirome en los mutantes seleccionados.
- 15.** El incremento de resistencia a Mitomicina C observada en los mutantes estudiados, sumado a los cambios morfológicos detectados consistentes en un acortamiento de los bacilos, y los indicios de hiperexpresión de AcrF sugieren que la amplificación *sdiA* podría estar involucrada en los fenotipos de multirresistencia seleccionados con antimicrobianos, con diazepam o con salicilato sódico.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Aarsman M.E.G., Piette A., Fraipont C., Vinkenleugel T.M.F., Nguyen-Distèche M., den Blaauwen T. (2005). Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Molecular Microbiology*. 55(6), 1631–1645
2. Abbott S.L., O'Connor J., Robin T., Zimmer B.L., Janda J.M. (2003). Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (10): 4852–4854.
3. Adam A. (1923). Biology of colon bacillus dyspepsia and its relation to pathogenesis and to intoxication. *Jahrb Kinderberth*. 101: 295. En Mandell G, Girdon R Bennett, J. infect diseases. pp 1671. 3ra Ed. New York, 1990.
4. Alcaraz A., Nestorovich E.M., Aguilera-Arzo M., Aguilera V.M., Bezrukov S.M. (2004). Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF. *Biophysical Journal* 87:943–957.
5. Alekshun M. & Levy SB. (1997). Regulation chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 2067-2075.
6. Alekshun M. & Levy SB. (2004). The *Escherichia coli* *mar* locus antibiotic resistance and more. The *mar* locus and related systems confer multiple antibiotic resistance and control expression of virulence factors and genes for metabolizing small molecules. *ASM News*. 70: 455-456.
7. Alekshun M., Levy S.B., Mealy T.R., Seaton B.A., Head J.F. (2001). The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Structural Biology*. 8: 710-714.
8. Alekshun M., Soo Kim Y., Levy S.B. (2000). Mutational analysis of MarR, the negative regulator of *marRAB* expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding. *Molecular Microbiology*. 35, 1394-1404.
9. Alonso Uermeneta B. (1995). Conservación y mantenimiento de Bacterias. En B. Alonso Uermeneta, V. Aragón, J.A. Bengoechea, Eds.: *Manual práctico de Microbiología*. Masson, Barcelona. 11-21.
10. Álvarez Benito M.V., Boquet Jiménez E., de Fez y Camino M.I. (1990). *Manual de técnicas de microbiología clínica*. 2ª edición. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas/ Editorial Garsi, S.A. Madrid.

11. Ambler RP. (1980). *The structure of  $\beta$ -lactamases. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 289:321-331.
12. Andersen C. (2003). *Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. Reviews of Physiological, Biochemical, and Pharmacology.* 147:122-65.
13. Andersen C., Forst SA., Zhao K., Inouye M., Delihias N. (1989). *The function of micF RNA, micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry.* 264(30):17961-70.
14. Andersen C., Huges C., Koronakis V. (2001). *Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. Current opinion in cell Biology.* 13:412:416.
15. Andersson DI. & Hughes D. (1996). *Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(2): 906-7.
16. *Antimicrobianos en Medicina-Sociedad Española de quimioterapia.* Editores: J. Sánchez, R. López, J. Prieto. Prous Science.
17. Aono R., Tsukagoshi N., Yamamoto M. (1998). *Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology.* 180: 938-944.
18. Appelbaum PC. & Hunter PA. (2000). *The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. International Journal of Antimicrobial Agents.* 16: 5-15.
19. Ariza R., Ziyi L., Ringstad N., Demple B. (1995). *Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by Escherichia coli Rob protein. Journal of Bacteriology.* 177(7): 1655-1661.
20. Asako H., Kobayashi K., Aono R. (1999). *Organic solvent tolerance is independent of OmpF levels in the membrane. Applied and environmental Microbiology.* 65: 284-296.
21. Asako H., Nakajima H., Kobayashi K, Aono R. (1997). *Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of marA in Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology.* 63: 1428-1433.

22. Augustus A., Celaya T., Husain F., Himbsrd M., Mirsa R. (2004). Antibiotic sensitive TolC mutants and their suppressors. *Journal of Bacteriology*.185:1851-1860.
23. Babic M., Hujer A., Bonomo R. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*. Doi: 10.1016/j.drug.2006.05.005.
24. Balagué C. & Vescovi E.G. (2001). Activation of multiple antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* strains by aryloalcanoic acid compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 1815-1822.
25. Balagué C., Khan AA., Fernandez L., Redolfi A., Aquili V., Voltattorni P., Hofer C., Ebner G., Dueñas S., Cerniglia CE. (2006). Occurrence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. *Food microbiology*. doi:10.1016/j.fm.2005.03.005.
26. Ball P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(topic T1):17-24.
27. Bambeke F.V., Balzi E., Tulkens P.M. (2000). Antibiotic efflux pumps commentary. *Biochemical Pharmacology*. 60: 457–470.
28. Baranova N. & Nikaido H. (2002). The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and doxycyclate. *Journal of Bacteriology*. 184: 4168-4176.
29. Barbosa T. & S. levy. (2000). Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* constitutive expression of MarA. *Journal of Bacteriology*. 182: 3467-3474.
30. Batchelor E., Silhavy T.J., Goulian M. (2004). Continuous control in bacterial regulatory circuits. *Journal of Bacteriology*. 186(22): 7618–7625.
31. Batchelor E., Walthers D., Kenney L.J., Goulian M. (2005). The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*. 187(16): 5723–5731.
32. Baucheron S., Mouline C., Praud K, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. (2005). TolC but not AcrB is essential for multidrug resistant *Salmonella*

33. Bazile S., Moreau N., Bouzard D., Essiz M. (1992). Relationships among antibacterial activity, inhibition of DNA gyrase, and intracellular accumulation of 11 fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; 36: 2622-2627.
34. Bennik Marjon H.J., Pomposiello P.J., Thorne D.F., Demple B. (2000). Defining a *rob* Regulon in *Escherichia coli* by Using Transposon Mutagenesis. *Journal of Bacteriology*. 182(13):3794–3801.
35. Bettelheim K.A. (1994). Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. p. 3-30. In: c. L. Gyles (Ed.). *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
36. Bina X., Perreten V., Levy SB. (2003). The periplasmic Protein *MppA* requires an additional mutated locus to repress *marA* expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 185, 1465-1469.
37. Blumberg PM. & Strominger JL. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriological Reviews*. 38: 291-335.
38. Bohnert Jürgen A., Schuster S., Fähnrich E., Trittler R., Kern W.V. (2006). Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the *Escherichia coli* RND-type MDR efflux pump *YhiV* (*MdtF*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dkl426.
39. Bond PJ. & Mark SP. Sansom. (2004). The simulation approach to bacterial outer membrane proteins (Review). *Molecular Membrane Biology*. 21: 151-161
40. Born P., Breukink E., Vollmer W. (2006). In vitro synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by *PBP1A* from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 37.
41. Bradshaw D. & Arceci RJ. (1998). Clinical relevance of transmembrane drug efflux as mechanism of multidrug resistance. *Journal of Clinical Oncology*. 16: 3674-3690.
42. Broome-Smith J.R., Hedge P.J., Spratt B.G. (1985). Production of thiol-penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* using a two primer method of site-directed mutagenesis. *The EMBO Journal*. 4(1): 231-235.

43. Brown MH. & Skurray RA. (2001) *Staphylococcal multidrug efflux protein QacA*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3(2): 163-170.
44. Bush K., Jacoby G., Medeiros A. (1996). *A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39:1211,1995.
45. Butaye P., Cloeckert A., Schwarz S. (2003). *Coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22:205-210.
46. Cantón Rafael. (2006). *Mutant preventive concentration: A new, clinically relevant parameter of antimicrobial activity?*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 24(10):599-602.
47. Carmel-Harel & Storz G. (2000). *Roles of the glutathione and thioredoxin-dependent reduction systems in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress*. *Annual Review of Microbiology*. 34: 439-461.
48. Casadaban M.J. (1976). *Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in Escherichia coli using bacteriophage lambda and mu*. *Journal of Molecular Biology*. 104:541–555.
49. Celesk RA. & Robillard N.J. (1989). *Factors influencing the accumulation of ciprofloxacin in Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(11): 1921-1926.
50. Chapman JS. & Georgopapadakou N.H. (1988). *Routes of quinolone permeation in Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32(4):38-442.
51. Chenia HY., B. Pillay, D. Pillay. (2006). *Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 1274–1278.
52. Chollet R., Chevalier J., Bryskier A., Pagès JM. (2004). *The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in Enterobacter aerogenes and Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(9): 3621–3624.

53. Chopra I. & Roberts M. (2001). *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 65:232-260.
54. Chu Daniel T.W. & Fernandes Phabhavathi B. (1989). *Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 33(2): 131-135.
55. Chuanchuen R., Narasaki CT, Schweizer HP. (2002). *The MexJK efflux pump of Pseudomonas aeruginosa requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. Journal of Bacteriology.* 184(18): 5036-5044.
56. Cohen SP. & Levy SB. (1988). *marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of Escherichia coli. Journal of Bacteriology.* 170(12): 5416-5422.
57. Cohen SP. & Levy SB. (1993). *Genetic and functional analysis of multiple antibiotic resistance (mar) locus in Escherichia coli. Journal of Bacteriology.* 175- 1484-1492.
58. Cohen SP., McMurry LM., Hooper DC., Wolfson JS., Levy SB. (1989). *Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic resistant (Mar) Escherichia coli selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition of OmpF reduction: Antimicrobial Agents and chemotherapy* 33: 1318-1325.
59. Corkill J.E. & Anson J.J. (2005). *High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant Enterobacteriaceae Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 56: 1115–1117.
60. Cornaglia G., Liming G., Fontana R., Satta G. (1992). *Diffusion of meropenem and imipenem through the outer membrane of Escherichia coli K-12 and correlation with their antibacterial activities. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 36 (9): 1902-1908.
61. Coudron P.E., Moland E.S., Thomson K.S. (2000). *Occurrence and detection of AmpC Beta-Lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center. Journal of Clinical Microbiology.* 38(5): 1791–1796.
62. Csonka L.N. (1993). *Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiological Reviews.* 53(1):121-147.

63. Curtis NAC., Orr D., Ross G.W., Boulton M.G. (1979). Competition of antibiotic beta-lactams for penicillin-binding-proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 16: 325-328.
64. Damaso Diego. (1990). *Antibacterianos*. Marketing Pharm, S.A & Roussel, Madrid.
65. Danelon C., Nestorovich E.M., Winterhalter M., Ceccarelli M., Bezrukovy S.M. (2006). Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation. *Biophysical Journal*. 90:1617–1627.
66. Davies C., White S.W., Nicholasi R.A. (2001). Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:616–623
67. De Pedro Miguel A., Donachie W.D., Höltje JV., Schwarz H. (2001). Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins *roda* and penicillin-binding protein. *Journal of Bacteriology*. 183: 4115–4126.
68. Dean A Rowe-Magnus & Didier Mazel. (2001). Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Current Opinion in Microbiology*. 4:565–569.
69. Delihias N. & Forst S. (2001). *MicF*: an antisense rna gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *Journal of Molecular Biology*. 313: 1-12.
70. Denome Sylvia A., Elf P.K., Henderson T.A., Nelson D.E., Young K.D. (1999). *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics and implications for peptidoglycan synthesis. *Journal of Bacteriology*. 181(13): 3981–3993.
71. Denyer S.P. & Maillard JY. (2002). Cellular Impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Complement*. 92: 3S-45S.

72. Dmitry V. Rozanov, D'Ari R., Sineoky S. (1998). *RecA-Independent Pathways of Lambdoid Prophage Induction in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180(23): 6306–6315.
73. Domagala JM. (1994). *Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 33: 685-706.
74. Drake JW., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow JF. (1998). *Rates of spontaneous mutation*. *Genetics* 148(4): 1667-86.
75. Dupont M., Dé E., Chollet R., Chevalier J., Pàges JM. (2004). *Enterobacter aerogenes OmpX, a cation selective channel mar- and osmo-regulated*. *FEBS letters*. 569:27-30.
76. Ege Seyhan. *Libro: Química Orgánica- Estructura y Reactividad- Edición 1998*. Editorial Reverte.
77. Elkins C.A. & Hiroshi N. (2002). *Substrate specificity of the RND-Type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of Escherichia coli is determined predominately by two large periplasmic loops*. *Journal of Bacteriology*. 184 (23):6490–6498.
78. Elkins C.A. & Mullis L.B. (2007). *Substrate Competition Studies Using Whole-Cell Accumulation Assays with the Major Tripartite Multidrug Efflux Pumps of Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(3): 923–929.
79. Ellington Matthew J. & Neil Woodford. (2006). *Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure?*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57:1026–1029.
80. Eswaran J., Koronakis E., Higgins M.K, Hughes C., Koronakis V. (2004). *Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps* *Current Opinion in Structural Biology*. 14:741–747.
81. Euzéby JP. (2006). *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. <http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#Enterobacteriaceae>.
82. Everett JM., Fang Jin Y., Ricci V., Piddock LJ. (1996). *Contributions of individual mechanism of Fluoroquinolone resistance in 36 Escherichia coli strains isolates from humans and animals*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 40 (10): 2280-2386.

83. Fajardo DA., Cheung J., Ito C., Suguwara E., Nikaido H., Mirsa R. (1998). Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K12 porin protein, OmpG, which produce unusually large channels. *Journal of Bacteriology*. 180(17): 4452-4459.
84. Ferrario M., Ernsting B.R., Borst D.W., D.E. Wiese Ii, Blumenthal R.M., Rowena G. (1995). The Leucine-Responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF* *Journal of Bacteriology*. 177(1): 103–113.
85. Filip C., Fletcher G., Wulff J.L., Earhart CF. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology*. 115: 717-722.
86. Fraipont C., Adam M., Nguyen-Disteche M., Keck W., Van Beeumen .J, Avala JA., Granier B., Hara H., Ghuysen JM. (1994). Engineering and overexpression of periplasmic forms of the penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*. 298: 189-195.
87. Fralick J. (1996). Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 178: 5803-5805.
88. Fuminobu Y. & Hiroshi N. (1985). Diffusion of  $\beta$ -Lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27: 84-92.
89. Gabrielle S. & Reeves P. (2003). Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research* 338: 2503-2519.
90. Gallegos M., Schleif R., Bairoch A., Hofmann K., Ramos JL. (1997). AraC/XylS of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61, 393-410.
91. Gambino, L., Gracheck S.J., Miller P.F. (1993). Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:2888–2894.
92. Gannon D., Griffith S., Chamberland O., Lomovskaya S. J., Hecker V., Lee J., Ohta T., Nakayama K. (1999). Inhibitors of efflux pumps in

- Pseudomonas aeruginosa* potentiates the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *Journal of Medical Chemistry*. 42:4928–4931.
93. García Aguado JM. & Bermejo Lumbrreras C. (1998). Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 7(78): 3622-3628.
  94. García Rodríguez JA. (1991). Estructura Bacteriana (I). Elementos obligados: pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma. En A. Pumarola, A. Rodríguez Torres, José Ángel García Rodríguez y cols. Eds: *microbiología y parasitología médica*. 25-34.
  95. García Rodríguez JA. & Bellido Muñoz JL. (1996). Estructura bacteriana en: José Ángel García Rodríguez, Juan J picazo. Eds.: *microbiología médica: 1. microbiología Médica general*. Madrid, 2 Vols., Vol. 1º ( cap 3): 41-52.
  96. Garcia-Lara J., Shang LH., Rothfield LI. (1996). An extracellular factor regulates expression of *SdiA*, a transcriptional activator of cell division genes in *Escherichia coli* .*Journal of Bacteriology* 178(10): 2742–2748.
  97. Gee Kyle R., Kang H.C., Meier T.I., Zhao G., Blaszcak L.C. (2001). Fluorescent Bocillins: Synthesis and application in the detection of penicillin-binding proteins. *Electrophoresis*.22: 960–965.
  98. Genshi Z., Meier T.I., Kahl S.D., Gee K.R., Blaszcak L.C. (1999). Bocillin Fl, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(5): 1124–1128.
  99. George AM., Hall RM., Stokes HW. (1995). Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 141(Pt8):1909-1920.
  100. Georgopapadakou NH. (1993). Minireview. Penicillin-Binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37(10): 2045-2053.
  101. Georgopapadakou NH., Smith S.A., Sykes RB. (1982). Mode of action of azthreonam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 21(6): 950-956.
  102. Gerken Henri & Rajeev Misra. (2004). Genetic evidence for functional interactions between TolC and AcrA proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 54(3): 620–631-doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04301.

103. Gherna R.L. (1981). Preservation. En: Philipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow et al, eds.: *Manual of methods for Microbiology*, Washington D.C. 12: 208-217.
104. Giraud E., Cloeckaert A., Kerboeuf D., Chaslus-Dancla E. (2000). Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella*
105. Giske CG., Borén C., Wretling B., Kronvall G. (2005). Meropenem susceptibility breakpoint for *Pseudomonas aeruginosa* strain hyperproducing *mexB* mRNA. *Clin Microbiol Infect.* 11: 662–669.
106. Godfrey AJ., Bryan LE., Rabin HR. (1981). beta-Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 19(5):705-11.
107. Goh Ee-Been, Siino DF., Igo MM. (2004). The *Escherichia coli* *tpb* (*ydgr*) gene represents a new class of *ompR*-regulated genes. *Journal of Bacteriology.* 186(12): 4019–4024.
108. Goldfrey AJ., Bryan LE., Rabin HR. (1981). Beta lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 19: 705-711.
109. Goldman J., White D., Levy SB. (1996). Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 40, 1266-1269.
110. Gonzáles MA., Moranchei AH., Duran S., Pichardo A., Magana JL., Forrest A., Drusano GL. (1985). Multiple dose pharmacokinetics of ciprofloxacin administered intravenously to normal volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 28(2): 235-239.
111. Greg German J. & Rajeev Misra. (2001). The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized *tls* bacteriophage. *Journal of Molecular Biology.* 308:579-585.
112. Griffith K., Baker M., Rouch D.A., Page M.G., Skurray R.A., Paulsen I.T., Chater K.F., Baldwin S.A, Henderson P.J. (1992). Membrane transport

- proteins: implications of sequence comparisons. Current Opinion Cell Biol.* 4:684-95
113. Griffith K., Becker M., Wolf R., Jr. (2005). Characterization of TetD as a transcriptional activator of a subset of genes of the *Escherichia coli* SoxS/MarA/Rob regulón. *Molecular Microbiology.* 56(4): 1103–1117.
  114. Griffith K., Shah I.M., Wolf R. (2004). Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistances. *Molecular microbiology.* 51:1801-1816.
  115. Grkovic S., Brown M.H., Skurray R. (2001). Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol.* 12: 225-237.
  116. Grkovic S., Brown M., Skurray R. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiological and Molecular Reviews.* 66: 671-701.
  117. Hall M.N. & Silhavy T.J. (1979). Transcriptional regulation of *Escherichia coli* K12 major outer membrane protein Ib. *Journal of Bacteriology.* 140:342–350.
  118. Hall M.N. & Silhavy T.J. (1981). The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 146:23–43.
  119. Hancock R.E.W. (1987). Role of porin in outer membrane permeability. *Journal of Bacteriology.* 169: 929-934.
  120. Hancock R.E.W. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiology.* 5(1): 37:42.
  121. Harushi Nakajima, Kobayashi K., Kobayashi M., Hiroyuki A., Aono R. (1995). Overexpression of the *roxA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* 61(6): 2302–2307.
  122. Hawkey PM. (2000). Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S9-13.
  123. Hawkey PM. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 51, Suppl. S1, 29–35.
  124. Hayashi S., Aono R., Hanai T., Mori H., Kobayashi T., Honde H. (2003). Analysis of organic solvent tolerance in *Escherichia coli* using gene

- expression profiles from DNA microarrays. Journal of bioscience and Bioengineering.* 95: 379-383.
125. Hayashi S., Hiroshi Hara, Hideho Suzuki, Yukinori Hirota. (1988). Lipid modification of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *Journal of Bacteriology.* 170(11):5392-5395.
  126. Heisig P. & Tschorny R. (1994). Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 38(6): 1284-1291.
  127. Helfand MS. & Bonomo RA. (2005). Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and metallo- $\beta$ -lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Current Opinion in Pharmacology.* 5:452–458.
  128. Henderson B., Poole S., Wilson M. (1996) Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue by inducing cytokine *síntesis*. *Microv. Rev.* 60 (2): 316-341.
  129. Hensler T., Hecker H., Heeg K. , Heideche CD., Bartels H., Barthlen W., Wagner H., Siewert JR., Holzmann B. (1997). Distinct mechanisms of immunosuppression as consequence of major surgery. *Infect Immun.* 65: 2283-2291.
  130. Hervé Nicoloff, V. Perreten, L.M. McMurry, S.B. Levy (2006). Role for tandem duplication and lon protease in AcrAB-TolC dependent multiple antibiotic resistance (*mar*) in an *Escherichia coli* mutant without mutations in *marRAB* or *acrAB*. *Journal of Bacteriology,* 188(12):4413–4423.
  131. Hervé Nicoloff, Vincent Perreten, Stuart B. Levy. (2007). Increased Genome Instability in *Escherichia coli* lon Mutants: Relation to Emergence of Multiple-Antibiotic-Resistant (Mar) Mutants Caused by Insertion Sequence Elements and Large Tandem Genomic Amplifications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 52(4): 1293–1303.
  132. Hidalgo E., Bollinger J.M., Bradley T.M., Walsh C.T., Demple B. (1995). Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *Journal of Biological Chemistry* 270: 20908-14.

133. Hidetada Hirakawa, Kunihiko Nishino, Junko Yamada, Takahiro Hirata, Akihito Yamaguchi (2003).  $\beta$ -Lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* .52: 576–582.
134. Higgins CF. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*. 8:67-113.
135. Higgs PI., T.E. Letain, K.K. Merriam, N.S. Burke, H. Park, C.Kang, K. Postle. (2002). TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 184(6): 1640–1648.
136. Hirai K, Aoyama H, Irikura T, Ivobe S, Mitsuhashi S. (1986). Difference in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29(3): 535-538.
137. Hirai K., Aoyama H, Suzzue S, Irikura T, Ivobe S, Mitsuhashi S. (1986). Isolation and characterization of norfloxacin resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .30(2): 248-253.
138. Hiraoka Masaki, Ryoichi Okamoto, Matsuhisa Inoue, Susumu Mitsuhashi. (1989). Effects of  $\beta$ -lactamases and omp mutation on susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(3): 382-386.
139. Hirofumi Aiba, Shin-Ichi Matsuyama, Takeshi Mizuno, Shoji Mizushima. (1987). Function Of micf as an Antisense RNA in osmoregulatory expression of the ompF gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 169(7):3007-3012.
140. Hiroshi N. (2005). Restoring permeability barrier function to outer membrane. *Chemistry & Biology*. 12:507-514.
141. Hiroyuki A., Harushi N., Kobayashi K., Kobayashi M., Aono R. (1997). Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of marA in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (4): 1428–1433.
142. Hiroyuki K., Satoru Unzai, D.I. Roper, A. Lloyd, S.Y. Park, J.R.H. Tame. (2006). Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacb) from

- Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. *Biochemistry*. 45: 783-792.
143. Holger Pils, David S Majs, Volkmar Braun. (1999). Characterization of Colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Journal of Bacteriology*. 181(11):3578–3581.
  144. Holme David & Hazel Peck. (1987). *Bioquímica Analítica*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 382-401.
  145. Hong Heedeok, Dimki R. Patel, Lukas K. Tamm, Bert van den Berg. (2006). The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded  $\beta$ -barrel with a hydrophobic channel. *Biological Chemistry*. 281(11): 7568-7577.
  146. Hooper D.C & Wolfson J.S. (1989). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical of microbiology reviews*. 2: 378-424.
  147. Hooper DC, Wolfson JS, Ng EY, Swartz MN. (1987). Mechanism of action of and resistance to ciprofloxacin. *The American Journal of Medicine*. 82(4A): 12-20.
  148. Hooper DC, Wolfson JS; Souza KS, Tung C, McHugh GL, Swartz MN. (1986). Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistant in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 29(4): 639-644.
  149. Hopkins Katie L., Davies Robert H., Threlfall E. John (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments *International Journal of Antimicrobial Agents Review*.25: 358–373.
  150. Husain Fasahath, Matthew Humbard, Rajeev Misra. (2004). Interaction between the TolC and AcrA Proteins of a Multidrug Efflux System of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 186(24): 8533–8536.
  151. Jacoby G.H. & Young K.D. (1988). Unequal distribution of penicillin-binding proteins among inner membrane vesicles of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 170: 3660-3667.
  152. Jacoby GA. & Sutton L. (1985).  $\beta$ -lactamase and  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 28: 703-705.
  153. Jacoby GA. (2006).  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(4): 1123–1129.

154. *Jacoby GA., Chow N, Waites KB. (2003). Prevalence of plasmid mediates quinolone resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(2): 559-562.*
155. *Jaffe Aline, Chabbert Yves A., Semonin Olivier. (1982). Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of  $\beta$ -lactams. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 22(6): 942-948.*
156. *Jaffe Aline, Yves A. Chabbert, Eliane Derlot. (1983). Selection and Characterization of  $\beta$ -Lactam-Resistant Escherichia coli K-12 Mutants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 23(4):622-625.*
157. *Jaffe Aline, Yves A. Chabbert, Olivier Semonin. (1982). Role of Porin Proteins Ompf and Ompc in the Permeation of B-Lactams Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 22(6): 942-948.*
158. *Jair K., Martin RG, Rosner JL, Fujita N, Ishihama A, Wolf RE jr. (1995). Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of Escherichia coli multiple antibiotic resistance and superoxide resistance promoters. Journal of Bacteriology. 177, 7100-7104.*
159. *Jair K., Yu X, Sharstad K, Thöny B, Fujita N, Ishihama A, Wolf RE jr. (1996). Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the Escherichia coli Origin of chromosomal replication. Journal of bacteriology. 178(9): 2507-2513.*
160. *Jellen-Ritter A. S & W. V. Kern. (2001), Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in Escherichia coli mutants selected with a fluoroquinolone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 :1467–1472.*
161. *Jun Lin, Shouxiong Huang, Qijing Zhang. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. Microbes and Infection. 4: 325–331.*
162. *Jun-Ichi Mitsuyama, Yuko Itoh, Masahiro Takahata, Seiki Okamoto, Takashi Yasuda. (1992). In vitro antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Salmonella typhimunum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 36(9): 2030-2036.*

163. Kahlmeter, G. (2003). An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO. SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 51(1): 69-76.
164. Kallman O., Fendukly F., Karlsson I., Kronvall G. (2003). Contribution of efflux to cefuroxime resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis.* 35: 464–470.
165. Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Higara S, Suzuki H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*: 63: 393-404.
166. Keith SK; Henry, SF; Abrutyn, E. (2000). Pathogens resistant to antimicrobial agents. epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious Disease Clinics of North America.* 14(2):293-319.
167. Kern W. V., Oethinger M, A. S. Jellen-Ritter, S. B. Levy. (2000). Non-Target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.*44: 814–820.
168. Ketan S Gajiwala & Stephen K Burley. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology.* 10:110–116.
169. Kevan L & Wang JC. (1980). Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and  $\alpha 2\beta 2$  protein core. *Biochemistry.* 19: 5229-5234.
170. Kinoshita Nobuhiro, Tsutomu Unemoto, Hiroshi Kobayashi. (1984). Proton motive force is not obligatory for growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 160(3): 1074-1077.
171. Kiralj R., Ferreira M.M.C. (2006). Molecular graphics approach to bacterial AcrB protein- $\beta$ -lactam antibiotic molecular recognition in drug efflux mechanism. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 25:126–145.
172. Kobayashi Kei, Norihiko Tsukagoshi, Rikizo Aono. (2001). Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* AcrB mutant to organic solvents by integrational activation of the AcrEF Operon with the IS1 or IS2 Element. *Journal of Bacteriology.* 183(8): 2646–2653.
173. Kobayshi N., Nishino K., Yamauchi A. (2001). Novel macrolide specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology.* 183: 5639-5644.

174. Koebnik R., Locher K., Van Gelder P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*. 37(2): 239-253.
175. Köhler T., Van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MN, Pechere JC. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell to cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 183: 5213-5222.
176. Koper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2(2): 123-40.
177. Koronakis V., Eswaran J., Hughe C. (2004). Structure and Function of TolC: The Bacterial Exit Duct for Proteins and Drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 73:467–89.
178. Koronakis Vassilis. (2003). Minireview “TolC - the bacterial exit duct for proteins and drugs”. *FEBS Letters*. 555:66-71.
179. Kress HG & Eberlein T. (1992). Effect of anesthesia and operation on essential immune functions. *Anesthesiol Intensivmed Noftallmed Schmerzther*. 27: 393-402.
180. Kumar Ayush & Herbert P. Schweizer. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1486– 1513
181. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
182. Laurent Mamelli, Valérie Prouzet-Mauléon, Jean-Marie Pagès, Francis Mégraud, Jean-Michel Bolla. (2005). Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56, 491–497.
183. Lavigne Jean-Philippe. (2006). *qnrA* in CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12):4224–4228.
184. Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, Ishida H, Lomovskava O. (2000). Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *Journal of Bacteriology*. 182: 3142-3150.

185. Lee Eun-Hee, Ekkehard Collatz, Isabelle Podglajen, Laurent Gutmann. (1996). *rob-Like Gene of Enterobacter cloacae Affecting Porin Synthesis and Susceptibility to Multiple Antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40(9): 2029–2033.*
186. León Serrano Javier & Gracia Lobo Juan María. (1990). *Manual de Genética molecular. Editorial Síntesis, S.A., Madrid.*
187. Levy, S.B. (2002). *Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. 92, 65S-71S.*
188. Li Xian-Zhi. (2005). *Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. International Journal of Antimicrobial Agents 25: 453–463.*
189. Li XZ., Zhang L., Poole K. (1998). *Role of multidrug efflux systems of pseudomonas aeruginosa in organic solvent tolerance, Journal of Bacteriology. 180: 2987-2991.*
190. Li Ziyi & Bruce Demple. (1994). *SoxS, an activator of superoxide stress genes in Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry. 269(28): 18371-18377.*
191. Liao Xiaowen & Hancock Robert E. W. (1995). *Cloning and Characterization of the Pseudomonas aeruginosa pbpB Gene Encoding Penicillin-Binding Protein 3. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39 (8):1871–1874.*
192. Liao Xiaowen & Hancock Robert E. W. (1996). *Identification of a penicillin-binding protein 3 homolog, pbp3x, in Pseudomonas aeruginosa: gene cloning and growth phase-dependent expression. Journal of Bacteriology. 179 (5): 1490–1496.*
193. Liao Xiaowen & Hancock Robert E. W. (1997). *Susceptibility to beta-lactam antibiotics of Pseudomonas aeruginosa overproducing penicillin-binding protein 3. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 41(5):1158-61.*
194. Livermore David M. & Neil Woodfo. (2006). *the  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. TRENDS in Microbiology 14(9): 413-420. doi:10.1016/j.tim.2006.07.008.*
195. Livermore David M. (1995)  *$\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews. 8(): 4557–584.*

196. Livermore DM & Woodford, N. (2000). Carbapenemases: a problem in Waiting? *Current Opinion in Microbiology*. 3: 489-495.
197. Lomovskaya O. & Lewis K. (1992). *Emr*, an *Escherichia coli* locus multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89; 8938-8942.
198. Lomovskaya O., Warren Ms, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Renal T, Leger R, Hecker S, Waykins W, Hocino K, Ishida H, Lee VJ. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(1): 105–116.
199. Lugtenberg Benm, Meijers J, Peters R, Van der Hoek P, Van Alphen L. (1975). Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12 into four Bands, *FEBS lett*. 58(1): 254-258.
200. Ma D, Cook DN, Alberti N, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol microbiol*. 16: 45: 55.
201. Ma D., Alberti M., Lynch, Nikaido H., Hearst JE. (1996). The local repressor *AcrR* plays a modulating role in the regulation of *acrAR* genes of *Escherichia coli* by global stress signals, *Mol. Microbiol*. 19: 101-112.
202. Ma D., Cook D.N., Alberti M., Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. (1993). Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 175(19): 6299-6313.
203. Ma D., Cook D.N., Hears, J.E., Nikaido H. (1994). Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*. 2: 489-493.
204. Macheboeuf Pauline, Carlos Contreras-Martel, Viviana Job, Otto Dideberg & Andrea Dessen (2006). Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*. 30: 673–691.
205. Maejima T., M. Inoue, S. Mitsuhashi. (1991). In vitro antibacterial activity of KP-736, a new cephem antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother*. 35: 104-110.
206. Mahamoud A., Jacqueline Chevalier<sup>1</sup>, Sandrine Alibert-Franco<sup>1</sup>, Winfried V. Kern Jean-Marie Pagès. (2007). Antibiotic efflux pumps in

- Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. doi:10.1093/jac/dkl493.*
207. Malouin F. & Bryan LE. (1986). *Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of  $\beta$ -Lactam Resistance .Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 30: 1-5.*
  208. Mammeri Hedi, Laurent Poirel, Nicolas Fortineau, Patrice Nordmann (2006). *Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50(7): 2573–2576.*
  209. Mammeri Hedi, Marc Van De Loo, Laurent Poirel, Luis Martinez-Martinez, Patrice Nordmann. (2005). *Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Escherichia coli in Europe. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(1):71-76.*
  210. Maneewannakul Kesmanee & Stuart B. Levy (1996). *Identification of mar mutants among quinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40: 1695–1698.*
  211. Marger MD. & M.H. Saier Jr. (1993). *A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. Trends Biochem Sci. 18:13-20.*
  212. Mark C. Wissel & David S. Weiss. (2004) *Genetic Analysis of the Cell Division Protein FtsI (PBP3): Amino Acid Substitutions That Impair Septal Localization of FtsI and Recruitment of FtsN. 186: 490–502.*
  213. Marrec-Fairley M., A. Piette, X. Gallet, R. Brasseur, H. Hara, C.e Fraipont, J.M. Ghuysen, M. Nguyen-Distèch. (2000). *Differential functionalities of amphiphilic peptide segments of the cell-septation penicillin-binding protein3 of Escherichia coli. Molecular Microbiology 37(5): 1019-1031.*
  214. Martin R. & Rosner JL (2001). *The AraC transcriptional activators. Current Opinion in Microbiology .4:132–137.*
  215. Martin R. & Rosner JL. (1997). *Fis, an accessorial factor for transcriptional activation of the mar (multiple antibiotic resistance) promoter of Escherichia coli in the presence of the activator MarA, SoxS or Rob. Journal of bacteriology. 179: 7410-7419.*

- 216.** Martin R. & Rosner JL. (2002). Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Molecular Microbiology*. 44(6), 1611–1624.
- 217.** Martin R., Gillette WK, Martin NI, Rosner JL. (2002). Complex formation between activator and RNA polymerase as the basis for transcriptional activation by *MarA* and *SoxS* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 43(2), 355–370.
- 218.** Martin R., Gillette WK, Rhee S, Rosner JL. (1999). Structural requirements for *marbox* function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Molecular microbiology*.(34):431-441.
- 219.** Martin R., Gillette W. K., Rosner JL. (2000). Promoter discrimination by the related transcriptional activators *MarA* and *SoxS*: differential regulation by differential binding. *Molecular Microbiology*. 35(3), 623-634.
- 220.** Martinez-Rodriguez JM, Pascual A, Garcia I, Martinez Martinez L. (2003). Detection of a plasmid mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing *AmpC*-type of beta lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 703-706.
- 221.** Masi Muriel, Jean-Marie Pagès, Elizabeth Pradel. (2003). Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* *AcrA–AcrB–TolC* multidrug efflux pump. *Journal of Chromatography B*. 786 197–205.
- 222.** Massova Irina & Shahriar Mbashery (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(1): 1-17.
- 223.** Masuda N. & Church G.M. (2002). *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator *EvgA*. *J. of Bacteriology* 184: 6225-6234.
- 224.** Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Nishino T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* mutant to beta-lactams due to reduced expression of the *ampC* beta-lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45(4):1284-6.

225. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*.280(5363):605-8.
226. Mazzariol A., Giuseppe Cornaglia, Hiroshi Nikaido. (2000). Contributions of the Ampc  $\beta$ -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* k-12 to  $\beta$ -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(5): 1387–1390.
227. Mazzariol A., Yutaka Tokue, Tiffany M. Kanegawa, Giuseppe Cornaglia, Hiroshi Nikaido. (2002). High-Level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(12):3441–3443.
228. Mccaffrey C, Bertasso A., Pace J., Georgopapadakou NH. (1992). Quinolone accumulation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36(8): 1601-1605.
229. McMahon MA., Xu J, Moore JE, Blair IS, McDowell DA. (2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*.73 (1): 211–217.
230. Meberg B.M., Paulson A.L., Priyadarshini R., Young K.D. (2004). Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 186: 8326–8336.
231. Mella M. Sergio, Acuña G, Muñoz M, Perez C, Labarca J, Gonzalez G, Hella Bello T, Dominguez M, Zemelman R. (2000). Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev. Chil Infect*. 17(1): 53-66.
232. Membrillo-Hernández Jorge, Sung Oog Kim, Gregory M. Cook, Robert K. Poole. (1997). Paraquat Regulation of hmp (Flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* k-12 is soxRS independent but modulated by  $\sigma$ S. *Journal of Bacteriology*. 179(10):3164–3170.
233. Mendez García J. (1996). Metabolismo y genética Bacteriana. En José García Rodríguez y Juan J. Picazo, eds: *Microbiología Médica: 1- Microbiología médica general*. Madrid. 2 vols, vol 1º (cap 4): 53-71.

234. Michael H. Godsey, Ekaterina E. Zheleznova Heldwein, Richard G. Brennan. (2002). Structural Biology of bacterial multidrug resistance gene regulators. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 40169–40172.
235. Michán C., Manchado M., Pueyo C. (2002). SoxRS down-regulation of Rob transcription. *Journal of Bacteriology*. 184(17): 4733-4738.
236. Miguel A. De Pedro, William D. Donachie, Joachim-Volker Höltje, and Heinz Schwarz. (2001). Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein. *Journal of Bacteriology*. 183: 4115–4126.
237. Miguel Blanco, Jorge Blanco, Jesús Eulogio Blanco, M. Pilar Alonso, Inmaculada Abalia, Elena Rodríguez, José Ramón Bilbao y Adelaida Umaran. (1995). Factores de virulencia y serogrupos 0 de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 13: 236-241.
238. Mikolosko J., K. Bobyk, H.I. Zgurskaya, P. Ghosh. (2006). Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure*. 14: 577–587. DOI 10.1016/j.str.2005.11.015
239. Miller JH. (1972). *Experiments in molecular genetics*, p. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
240. Mirjam E., Aarsman G., Piette A., Fraipont C., Vinkenvleugel T.M.F., Nguyen-Distèche M., den Blaauwen T. (2005). Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Molecular Microbiology*. 55(6), 1631–1645.
241. Mirsa R. & Benson SA. (1989). A novel mutation, cog, which results in production of a new porin protein (OmpG) of *Escherichia coli* K12. *Journal of bacteriology* 171(8): 4105-4111.
242. Mizuno & Mizushima (1990) Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* 4(7):1077-82
243. Mizuno T., Chou MY., Inouye M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translation inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1966–1970.

244. Morrison Robert Thornton, Boyd Robert Neilson. *Química Orgánica edición N° 4. (1998). Editorial: Pearson Prentice Hall.*
245. Mortimer P. & Piddock L. (1993). *The accumulation of five antibacterial agents in porin deficient mutants of Escherichia coli. J. Antimicrobial Chemotherapy. 32(2). 195-213.*
246. Murray Patrick, George S. Kobayasi, Michael A. Pfaller (1997). *Microbiología Médica. 2da ed. Harcourt Brace de España S.A. Madrid, España.*
247. Naber K. G. (2000). *Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults. J Antimicrob Chemother 46 Suppl 1: 23-7.*
248. Nagakubo S., Nishino, K., Hirata T., Yamaguchi A. (2002). *The putative response regulator BaeR stimulates milt drug resistance of Escherichia coli via a novel multidrug exporter system, MdtABC. Journal of Bacteriology. 184: 4161-7.*
249. Nakamura S. (1997) *Mechanism of quinolone resistance. J. of infect. Chemotherapy. 3: 531-540.*
250. NCCLS, (2003a). *Methods for dilution susceptibility for bacteria that grow aerobically; approved standard 6th edn. M07-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.*
251. NCCLS, (2003b). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard 8th edn. M02-A8. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.*
252. Nelson D.E. & Young K.D. (2000). *Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of Escherichia coli. Journal of Bacteriology. 182: 1714–1721.*
253. Nelson D.E. & Young K.D. (2001). *Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in Escherichia coli. Journal of Bacteriology. 183(10): 3055–3064*
254. Nestorovich E.M., C. Danelon, M. Winterhalter, S.M. Bezrukov. (2002). *Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. PNAS. 99(15):9789–9794.*
255. Nguyen Van JC. & Gutmann L. (1994). *Résistance aux antibiotiques par diminution de la perméabilité chez les bactéries à gram négatif. Presse Med. 23(11): 522-531.*

256. Nikaido H. & Thanassi DG. (1993). Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemoter.* 37: 1393-1399.
257. Nikaido H. & Vaara Marti. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews.* 49(1): 1-32.
258. Nikaido H. & Zgurskaya HI. (2001). AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 215-218.
259. Nikaido H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 33(11):1831-1836.
260. Nikaido H. (1991). Pore-forming Activity of OmpA Protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry.* 267(4): 2507-2511.
261. Nikaido H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* 6(4):435-442.
262. Nikaido H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 264: 382-388.
263. Nikaido H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 178: 5853-5859
264. Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67(4): 593-656.
265. Nikaido H., Basina M., Nguyen V., Rosenberg E.Y. (1998). Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those  $\beta$ -lactam antibiotics containing lipophilic side chain. *Journal of Bacteriology.* 180(17):4686-4692.
266. Nilsen T., A.S. Ghosh, M.B. Goldberg, K.D. Young. (2004). Branching sites and morphological abnormalities behave as ectopic poles in shape-defective *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 52(4): 1045-1054.
267. Nishino Kunihiro, Junko Yamada, Hidetada Hiramawa, Takahiro Hirata, Akihito Yamaguchi. (2003). Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47(9): 3030-3033.

268. Nitzan Y., Deutsch EB., Pechatnikov I. (2002). Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Current Microbiology* 45(6):446-55.
269. Nordmann P. & Poirel L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 463–469.
270. Normark BH. & Normark S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*. 252(2): 91-106.
271. Nurminen M., Hirvas L., Vaara M. (1997). The outer membrane of lipid A-deficient *Escherichia coli* mutant LH530 has reduced levels of OmpF and leaks periplasmic enzymes. *Microbiology*. 143: 1533–1537.
272. Oethinger M., Kern WV., Goldman J. (1998). Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41: 111-114.
273. Oethinger M., Kern WV., Jellen-Ritter AS. (2000). Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*: 44:191 10-13.
274. Oethinger M., Podglajen I., Kern W.V., Levy S.B. (1998). Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42:2089–2094.
275. Oh H., Nord CE., Barkholt L., Hedberg M., Dlund C. (2000). Ecological disturbances in intestinal microflora caused by clinafloxacin, an extended-spectrum quinolone. *Infection* 28(5): 272-7.
276. Okusu H., Ma D., Nikaido H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *E. coli* multiple-antibiotic-resistance (*Mar*) mutants. *Journal of Bacteriology*. 178: 306-308.
277. Olliver A., Valle M., Chaslus-Dancla E., Cloeckaer A. (2004) Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected Fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium. *FEMS Microbiology Letters*. 238: 267–272.
278. Olofsson S.K., L.L. Marcusson, P. Komp Lindgren, D. Hughes, O. Cars. (2006). Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an

- in vitro* kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57: 1116–1121.
279. Osborn MJ. & Wu HCP. (1980). Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria. *Annual reviews microbiol.* 34: 396-422.
280. Owe Källman, Faiz Fendukly, Inga Karlsson, Göran Kronvall. (2003). Contribution of efflux to cefuroxime resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis* 35: 464-470.
281. Pai Hyunjoo, Cheol-In Kang, Jeong-Hum Byeon, Ki-Deok Lee, Wan Beom Park, Hong-Bin Kim, Eui-Chong Kim, Myoung-don Oh, Kang-Won Choe. (2004). Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by ampc-type- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(10): 3720–3728.
282. Palejwala VA., Wang GE., Murphy HS., Humayun MZ. (1995) Functional *recA*, *lexA*, *umuD*, *umuC*, *polA*, and *polB* genes are not required for the *Escherichia coli* UVM response. *Journal of Bacteriology*. 177: 6041–6048.
283. Panja Subrata, Swati Saha, Bimal Jana, Tarakdas Basu. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology*. 127: 14–20
284. Pasterán F., M. Galas, A. Corso. (2003). *Manual de Procedimientos. Parte II. Pruebas de Sensibilidad a los antimicrobianos*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbran” Buenos Aires. Argentina.
285. Pastoret S., C. Fraipont, T. den Blaauwen, B. Wolf, M.E.G. Aarsman, A. Piette, A. Thomas, R. Brasseur, M. Nguyen-Distèche. Functional analysis of the cell division protein *FtsW* of *Escherichia coli*. (2004). *Journal of Bacteriology*. 186 (24): 8370–8379.
286. Paterson DL. & Bonomo RA. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. 657–686.
287. Paulsen I.T., Brown MH., Skurray RA. (1996). Proton dependent multidrug efflux pumps systems. *Microbiol. Rev.* 60(4): 575-608.
288. Pechère JC. (1988). Emergence of resistance in gram-negative bacilli during beta-lactam therapy: a challenge for the future. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 25(2):S17-23.

- 289.** Pesci E.C., Milbank JB., Pearson JP., McKnight, Kende AS., Greenberg EP., Iglewski BH. (1999). Quinolone signalling in the cell to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. 44: 2233-2241.
- 290.** Peterson A.A., S.W. Fesik, E.J. McGroarty. (1987). Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31(2):230-237.
- 291.** Petrosino J.F., A.R. Pendleton, J.H. Weiner, S.M. Rosenberg. (2002). chromosomal system for studying AmpC-mediated  $\beta$ -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(5): 1535–1539.
- 292.** Philipon A., Labia R., Jacoby GA. (1990). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33:1131–1136
- 293.** Piddock L. & Wise R. (1987). Induction of SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiology Letters*. 41: 289-294.
- 294.** Piette André, C. Fraipont, T. den Blaauwen, M.E.G. Aarsman, S. Pastoret, M. Nguyen-Distèche (2004). Structural determinants required to target penicillin-binding protein 3 to the septum of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 168: 6110–6117.
- 295.** Poirel L., C. Héritier, C. Spicq, P. Nordmann. (2004). In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(8): 3831–3833.
- 296.** Poirel L., J.D.D. Pitout. (2006). In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 50(4): 1525–1527.
- 297.** Poirel L., J.M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard, P. Nordmann. (2005). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(8): 3523-3525.
- 298.** Pomposiello P.J., M.H.J. Bennik, B. Demple. (2001). Genome-Wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *Journal of Bacteriology*. 183(13): 3890–3902.

299. Poole K. (2000). Efflux mediated resistance to fluoroquinolones in gram negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 2233-2241.
300. Poole K. (2004). REVIEW Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 10: 12–26.
301. Poole K. (2004). Review resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. 61: 2200–2223.
302. Popham D.L & Young K.D. (2003). Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 6:594–599.
303. Popham D.L. & Young K.D. (2003). Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 6:594–599.
304. Prescott LM., John P. Harley, Donald Klein. (2002) (5ta edición). *Microbiology. Part I: Introduction to Microbiology. Cap. 3: Prokaryotic Cell Structure and Function*.
305. Provence D. & Curtis R., III (1994). Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*. 62: 1369-1380.
306. Pucci M.J., J. Boice-Sowek, R.E. Kessler, T.J. Dougherty. (1991). Comparison of cefepime, cefpirome, and cefaclidine binding affinities for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* Sc8329. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(11): 2312-2317.
307. Putman M., Van Veen H., Konings W. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and molecular Biology Reviews*. 64:672-693.
308. Rahmati S., S. Yang, A.L. Davidson, E.L. Zechiedrich. (2002). Control of the AcrAB multidrug efflux quorum-sensing regulator SdiA *Molecular Microbiology* 43(3): 677–685.
309. Ramos J., Duque E., Gallegos MT., Godoy P., Ramos Gonzalez MI., Rojas A., Teran W., Segura A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram negative bacteria. *Annu .Rev. Microbiol*. 56:743-768.
310. Randall LP. & Woodward M.J. (2002). The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Research in Veterinary Science*, 72: 87-93.

- 311.** Rasmussen BA. & Bush K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41: 223-232.
- 312.** Rechenberg Moritz von, Joachim-Volker Höltje. (2000). Two-step procedure for purification and separation of the essential penicillin-binding proteins PBP 1A and 1Bs of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 189: 201-204.
- 313.** Recio-Fernández J., Walas F., Federici L., Venkatesh P., Barvo V., Kenji M., Ben L. (2004). A model of transmembrane drug efflux pumps from gram negative bacteria. *FEBS letters*. 58: 5-9. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.097.
- 314.** Reece J. & Maxwell A. (1991). The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase a subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Research*. 19: 1399-1405.
- 315.** Remington Genaro Alfonso. *Farmacia*. Edición N° 20. (2003). Editorial Panamericana.
- 316.** Rhee S., R.G. Martin, J.L. Rosner, D.R. Davies (1998). A novel DNA-binding motif in *MarA*: The first structure for an *AraC* family transcriptional activator *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:10413–10418.
- 317.** Ribera A., Jurado A., Ruiz J., Marco .F, Del Valle O., Mensa J. (2002). *In vitro* activity of clinafloxacin in comparison with other quinolones against *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates in the presence and absence of reserpine. *Diag Microbiol Infect Dis* 42:123-8.
- 318.** Ried G., I. Hindennach, U. Henning. (1990). Role of Lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins *OmpA*, *OmpC*, and *OmpF*. *Journal of Bacteriology*. 172(10): 6048-6053.
- 319.** Rocque Warren J., S.W. Fesik, A. Haug, E.J. Mcgroartyl. (1988). Polycation binding to isolated lipopolysaccharide from antibiotic-hypersusceptible mutant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32(3): 308-313.
- 320.** Rodríguez Guadalupe. (2002). Artículo de revisión “principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*”. *Salud pública de México / Vol. 44, no.5*.
- 321.** Romero-Ruiz M.M, Herrero-Climent M., Torres-Lagares D., Gutiérrez-Pérez JL. (2006). *Protocolo de control del dolor y la inflamación*

*postquirúrgica. Una aproximación racional. RCOE. [Online]. 2006, vol. 11, no. 2 pp. 205-215.*

322. Rosenberg E., Bertenthal D., Nilles ML., Bertrand KP., Nikaido H. (2003). *Bile salts and fatty acids induce the expression of Escherichia coli AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein.* 48(6): 1609-1619.
323. Rosenberg E., Ma D., Nikaido, H. (2000). *AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump.* J. Bacteriology. 182; 1754-1756.
324. Rosner JL. (1985). *Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellents in Escherichia coli K-12.* Proc. Nati. Acad. Sci. USA. Vol. 82: 8771-877.
325. Rosner JL., Bindi Dangi, Angela M. Gronenborn, Robert G. (2002). *Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyrindyl in Escherichia coli.* Journal of Bacteriology. 184 (5): 1407-1416.
326. Rosner JL., Tuu-Jyi Chai, John Foulds. (1991). *Regulation of OmpF porin expression by salicylate in Escherichia coli.* Journal of Bacteriology. 173(18): 5631-5638.
327. Rouch DA., Cram DS., Diberardino D., Littlejohn TG., Skurray RA. (1990). *Efflux-mediated antiseptic resistance gene qacA from Staphylococcus aureus: common ancestry with tetracycline and sugar transport proteins.* Mol. Microb. 4: 2051-2062.
328. Russo & Silhavy. (1991). *EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes.* J Mol Biol. 222: 567-80.
329. Sabiha Y. Essack (2001). *The Development of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of  $\beta$ -Lactamases. Review Article. Pharmaceutical Research.*18: 1391-1399.
330. Saier MH. Jr., Paulsen IT., Sliwinski MK., Pao SS., Skurray RA., Nikaido H. (1998). *Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria.* FASEB J. 12:265-74.
331. Salyers A.A. & Whitt D.D. (1994). *Bacterial pathogenesis a molecular approach.* ASM press. Washington USA.
332. Sanchez P., Alonso A., Martinez JL. (2002). *Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the Stenotrophomonas maltophilia*

- multidrug efflux pump SmeDEF. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 46: 3386-3393.
- 333.** Sanders C. (2001). *Mechanisms responsible for cross resistance and dichotomous resistance among the quinolones. Clinical Infectious diseases.* 32: 1-8
- 334.** Sanders C., Sanders WE. (Jr) Goering RV, Werner V. (1984). *Selection of multiple antibiotic resistances by quinolones, betalactams, and aminoglycosides with special references to cross resistance between unrelated drug classes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 26(6): 797-801.
- 335.** Sawai Tetsuo, Ryoichi Hiruma, Nobuko Kawana, Midori Kaneko, Fumiko Taniyasu , Akiko Inami (1982). *Outer membrane permeation of  $\beta$ -lactam antibiotics in Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Enterobacter cloacae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 22(4): 585-592.
- 336.** Schaechter M. (2001). *Escherichia coli and Salmonella 2000: the view from here. Microbiol Mol Biol Rev* 65(1): 119-30.
- 337.** Schmidt. (1998). *Diffusely adhering Escherichia coli strain induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of esp proteins. Infec. And Inmun.* 66: 528-539.
- 338.** Schneiders T & Levy SB. (2006). *MarA-mediated transcriptional repression of the rob promoter. Journal of Biological Chemistry.* 281(15):10049-55.
- 339.** Schneiders T., Amyes S. G. B., Levy S. B. (2003). *Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical Klebsiella pneumoniae isolates from Singapore. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47(9): 2831–2837.
- 340.** Sharff A., Fanutti C., Shi J., Calladine C., Luisi B. (2001). *The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux from stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. Eur. J. Biochem. FEBS* 268: 5011-5026.
- 341.** Siligardi G., F. Harris, David A (1997). *Phoenix Helical conformation in the C-terminal anchoring domains of E. coli penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 Biochimica et Biophysica Acta* 1329. 278–284.

342. Siligardi G., Harris F., David A. (1997). Phoenix Helical conformation in the C-terminal anchoring domains of *E. coli* penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 *Biochimica Biophysica Acta* 1329. 278–284.
343. Simonet V., Mallea M, Pages JM. (2000) .Substitutions in the Eyelet Region Disrupt Cefepime Diffusion through the *Escherichia coli* OmpF Channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (2):311-315.
344. Sitnikov Dmitry M., Jeffrey B. Schineller, Thomas O. Baldwin. (1996). Control of cell division in *Escherichia coli*: Regulation of transcription offtsQA involves both rpoS and SdiA-mediated autoinduction *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.93: 336-341.
345. Soumya Pastoret, Claudine Fraipont, Tanneke den Blaauwen, Benoît Wolf, Mirjam E. G. Aarsman, André Piette, Annick Thomas, Robert Brasseur, Martine Nguyen-DistècheI. (2004). Functional Analysis of the Cell Division Protein FtsW of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*.186 (24): 8370–8379.
346. Souza V, Rocha M., Valera A., Eguiarte LE. (1999). Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *bApp. and Environm. Microbiol*. 65: 3373-3385.
347. Speer Brenda S, Nadja B. Shoemaker, Abigail A. Salyers. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms transfer, and clinical significance *clinical Microbiology Reviews*. 5(4): 387-399.
348. Spratt Brian G. (1977). Properties of the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem*. 72: 341-352.
349. Spratt Brian G. (1977). Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *Journal of Bacteriology*.131: 293-305.
350. Srividhya KV & S. Krishnaswamy. (2004). A simulation model of *Escherichia coli* osmoregulatory switch using E-CELL system. *BMC Microbiology* 2004, 4:44. doi: 10.1186/1471-2180-4-44.
351. Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML. (1991). *Microbiología* 2ª edición. Editorial Reverté.
352. Stenutz R., A. Weintraub, G. Widmalm. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 30: 382–403.

- 353.** Steven P. Wilkinson & Anne Grove (2004) *HucRa* novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 51442–51450.
- 354.** Sulavik M., Dazer M., Miller P. (1997). The *Salmonella typhimurium* *mar* locus: Molecular and Genetic Analyses and assessment of its role in virulence. *Journal of Bacteriology*. 179, 1857-1866.
- 355.** Sulavik M., Houseweart C, Cramer C, Jiwani N, Murgolo N, Green J, Didomenico B, Shaw K, Miller GH, Hare R, Shimer G. (2001). Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 1126-1136.
- 356.** Sullivan A., Edlund C., Nord C. E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis* 1(2): 101-14.
- 357.** Takayuki Komatsu, Michio Ohta, Nobuo Kido, Yoshichika Arakawa, Hideo Ito, Nobuo Kato. (1991). Increased resistance to multiple drugs by introduction of the enterobacter cloacae *roma* gene into *OmpF* porin-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(10): 2155-2158.
- 358.** Taschner P., P. Huls, E. Pas, C.L. Woldringh (1988). Division behaviour and shape changes in isogenic *ftsZ*, *ftsQ*, *ftsA*, *pbpB*, and *ftsE* cell division mutants of *Escherichia coli* during temperature shift experiments. *Journal of Bacteriology* .170(4):1533-1540.
- 359.** Taschner P.E.M., Peter G. Huls, Evelien Pas, Conrad L. Woldringh (1988). Division behaviour and shape changes in isogenic *ftsZ*, *ftsQ*, *ftsA*, *pbpB*, and *ftsE* cell division mutants of *Escherichia coli* during temperature shift experiments. *Journal of Bacteriology* .170(4):1533-1540.
- 360.** Tavío M.M., Vila J., Ruiz J., Ruiz J., Martín-Sánchez AM., Jiménez de Anta MT. (1999). Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44: 735-742.
- 361.** Tavío MM., Amicosante G., Franceschini N., Vila J., Ruiz J., Oratore A., Martín Sánchez A.M., Jiménez de Anta M.T. (1999). Decreased production of AmpC type  $\beta$ -lactamases associated with the development of resistance

- to quinolones in *Citrobacter freundii* strains. *Microbial Drug Resistance*. 5: 235-240.
- 362.** Tavío MM., Jordi Vila, Mariagrazia Perilli, Lucía T. Casañas, Laura Maciá Gianfranco Amicosante, MT. Jiménez de Anta. (2004). Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. *Journal of Medical Microbiology*. 53: 1119–1122.
- 363.** Tavío MM., Perilli M., Vila J., Becerro P., Ruiz J., Amicosante G., Jiménez de Anta M.T. (2005). Ciprofloxacin, salicylate and 2, 4-dinitrophenol decrease production of AmpC type  $\beta$ -lactamase in two *Citrobacter freundii* clinical isolates. *Microbial Drug Resistance*. 11: 225-231.
- 364.** Tavío MM., Perilli M., Vila J., Becerro P., Casañas L., Amicosante G., Jiménez de Anta M.T. (2004). Salicylate decreases production of AmpC type  $\beta$ -lactamases and increases susceptibility to  $\beta$ -lactams in a *Morganella morganii* clinical isolate. *FEMS Microbiology Letters*. 238: 139-144.
- 365.** Tavío MM., Vila J., Ruiz J., Amicosante G., Franceschini N., Martín-Sánchez A.M., Jiménez de Anta M.T. (2000). In vitro selected fluoroquinolone resistant mutants of *Citrobacter freundii*: analysis of the quinolone resistance acquisition. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:521-524.
- 366.** Tavío MM., Vila J., Ruiz J., Martín-Sánchez A.M., Jiménez de Anta M.T. (2000). Decreased permeability and enhanced proton-dependent active efflux in the development of resistance to quinolones in *Morganella morganii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14:157-160.
- 367.** Tee Bordelon, Steven P. Wilkinson, Anne Grove and Marcia E. Newcomer. (2006). The crystal structure of the transcriptional regulator HucR from *Deinococcus radiodurans* reveals a repressor preconfigured for DNA binding. *J. Mol. Biol.* 360: 168–177.
- 368.** Tenover Fred C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119 (6A), S3–S10.
- 369.** Thanasii D.G., Cheng L.W., Nikaido. H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. of Bacteriology*. 179: 2512-2518.

- 370.** Thanassi D.G., Greg S. B. Suh, Hiroshi. (1995). Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology*. 177(4): 998–1007.
- 371.** Tikhonova Elena B. & Zgurskaya Helen I. (2004). *AcrA, AcrB, and TolC of Escherichia coli Form A Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(31): 32116–32124.
- 372.** Tobes Raquel & Ramos Juan. (2002). *AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators en bacteria*. *Nucleic Acids Research*. 30: 318-321.
- 373.** Tormo A., Ayala JA., De Miguel A. P., Marti A., Vicente M. (1986). *Interaction of FtsA and PBP3 proteins in the Escherichia coli septum*. *Journal of Bacteriology*. 166: 985-992.
- 374.** Touzé T, Eswaran J, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V.. (2004). *Interactions underlying of the Escherichia coli AcrAB-TolC multidrug efflux system*. *Molecular Microbiology*. 53: 697-706.
- 375.** Tran J. & Jacoby George. (2002). *Mechanism of plasmid mediates quinolone resitance*. *PNAS*. 99(8): 5638-5642.
- 376.** *Tratado de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (S.E.I.M.C).* (2005). *Directores: Ruiz Auxina V. y Guillén Moreno S. Editorial Panamericana. España.*
- 377.** Tseng, T.T., Gratwick K.S., Kollman J., Park D., Nies D.H, Goffeau A, Saier M.H Jr. (1999). *The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1:107-25.
- 378.** Tsukagoshi N. & Aono R. (2000). *Entry into release of solvents by Escherichia coli in an organic-aqueous two liquid phase system and substrate specificity of the AcrAB- TolC solvent extruding pump*. *Journal of Bacteriology*. 182(17): 4803-4810.
- 379.** Ueda Ohmi, Hannah M. Wexler, Kaname Hirai, Yukinaga Shibata, Fuminobu Yoshimura, Setsuo Fujimura. (2005). *Sixteen homologs of the Mex-type multidrug resistance efflux pump in Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7): 2807–2815.

- 380.** Ute Bertsche, Thomas Kast, Benoît Wolf, C. Fraipont, M.E.G. A. Kai Kannenberg, M, von Rechenberg, M. Nguyen-Distèche, T. den Blaauwen, J.V. Höltje, W. Vollmer. (2006). Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 61(3), 675–690.
- 381.** Ute Meisel, J.V Höltje. W. Vollmer. (2003) Overproduction of inactive variants of the murein synthase *pbp1b* causes lysis in *Escherichia coli* *Journal of Bacteriology*. 185: 5342–5348.
- 382.** Van Veen HW., Callaghan R., Soceneantu L., Sardini A., Konings WN., Higgins CF. (1998). A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance *P*-glycoprotein gene. *Natura*. 391: 291-295.
- 383.** Vaseem A. Palejwala, Ge Wang, Holly S. Murphy, M. Zafri Humayun (1995). Functional *recA*, *lexA*, *umuD*, *umuC*, *polA*, and *polB* genes are not required for the *Escherichia coli* UVM response. *Journal of Bacteriology* 177: 6041–6048.
- 384.** Vidal S., Brendin J., Pagès JM, Barbe J. (2005).  $\beta$ -lactam screening by specific residues of the *OmpF* eyelet. *J. Med. Chem.* 48: 1395-1400.
- 385.** Vila J., Sánchez-Céspedes J., Sierra J.M., Piqueras M., Nicolás E., Freixas J., Giralt E. (2006). Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 28:19–24.
- 386.** Vinella D., R. D'Ari, P. Bouloc. (1992). Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when *ppGpp* synthesis is induced. *The EMBO Journal* .11(4): 1493 - 1501.
- 387.** Viveiros M., Dupont M., Rodrigues L., Couto I., Davin-Regli A., Martins M, Pàges JM., Amaral L. (2007) Antibiotic stress, genetic Response and altered permeability of *E.coli*. *PLoS ONE* 2(4): e365. doi:10.1371/journal.pone.0000365.
- 388.** Vogt J. & Schulz G. (1999). The structure of the outer membrane protein *OmpX* from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure London*. 7 (10): 1301-1309.

- 389.** Walsh TR., Toleman MA., Poirel L., Nordman P. (2005). *Metallo Lactamases: the Quiet before the Storm?* *Clinical microbiology reviews.* 18(2):306–325.
- 390.** Wang H., J.L. Dzink-Fox, M. Chen, S.B. Levy. (2001). *Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical Escherichia coli strains from china: role of acrR mutations.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(5):1515–1521.
- 391.** Wang JC. (1996). *DNA topoisomerasas.* *Annual Reviews Biochem.* 65: 365-393.
- 392.** Wang X.D., P.A. de Boer, L.I. Rothfield. (1991). *A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of Escherichia coli.* *EMOBO J.* 10: 3363-3372.
- 393.** Webber M. & Piddock L. (2001). *Absence of Mutations in marRAB or soxRS in acrB-Overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of Escherichia coli.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(5): 1550–1552.
- 394.** Webber M. & Piddock L. (2001). *Quinolone resistance in Escherichia coli.* *Review article. Vet. Res.* 32: 275–284.
- 395.** Weber DJ., Raasch R., Rutala W. (1999). *Emerging resistance and therapeutic options. Nosocomial infections in the ICU. the growing importance of antibiotic-resistant pathogens.* *Chest.* 115(3): 34- 41.
- 396.** Wei Y., A.C. Vollmer, R.A. Larossa. (2001A). *In vivo titration of mitomycin C action by four Escherichia coli genomic regions on multicopy plasmids.* *Journal of Bacteriology.* 183(7): 259–2264.
- 397.** Wei Y., Lee J.M., D.R.. Smulski, R.A. Larossa (2001B). *Global impact of SdiA amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of Escherichia coli.* *Journal of Bacteriology.* 183(7): 2265–2272.
- 398.** White D., Goldman J., Demple B., Levy S. (1997). *Role of the acrAB locus in organic solvent tolerance mediated by expression of marA, soxS or robA in Escherichia coli.* *Journal of bacteriology.* 179: 6122-6126.
- 399.** Williams K., Bigley III E., Raybourne R. (2000). *Identification of murine B-cell and T-cell epitopes of Escherichia coli outer membrane protein F with syntetic polipeptides.* *Infect. Immun.* 68 (5): 2535-2545.

400. Wissel M.C. & Weiss D.S. (2004) Genetic analysis of the cell division protein *FtsI* (PBP3): amino acid substitutions that impair septal localization of *FtsI* and recruitment of *FtsN*. *186*: 490–502.
401. Woebking B., G. Reuter, R.A. Shilling, S. Velamakanni, S. Shahi, H. Venter, L. Balakrishnan, Hendrik W. van Veen. (2005). Drug-lipid an interactions on the *Escherichia coli* ABC transporter *MsbA*. *Journal of Bacteriology*. *187*(18): 6363–6369.
402. Wojciechowski M., F. Peterson, Kenneth R., Love Paul E. (1991). Regulation of the SOS response in *Bacillus subtilis*: evidence for a *LexA* repressor homolog. *Journal of Bacteriology*. *173*: 6489-6498.
403. Wolfson J.S. & Hooper D.C. (1989). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical of microbiology reviews*. *2*: 378-424.
404. Wonpil I. & Benoît R. (2002). Ions and counterions in a biological channel: a molecular dynamics simulation of *OmpF* Porin from *Escherichia coli* in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. Doi: 10.1016/S0022-2836(02)00380-7 available online at <http://www.idealibrary.com> .*Bw J. Mol. Biol.* *319*: 1177–1197.
405. Wood Timothy I., Griffith K.L, Fawcett W.P., Jair Kam-Wing, Schenider T.D, Wolf R.E. (1999). Interdependence of the position and orientation of *SoxS* binding sites in the transcriptional activation of the class I subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible promoters. *Molecular Microbiology*. *34*(3): 414-430.
406. Woods Gail L. & Washington J.A. (1995). Antibacterial susceptibility test: dilution and disk diffusion methods. En Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Phaller y cols, eds: *Manual of Clinical Microbiology*. 6<sup>a</sup> edition. Washington D.C. 1327-1341.
407. Wu J. & B. Weiss. (1992). Two-Stage induction of the *soxRS* (Superoxide Response) regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. *174*(12): 3915-3920.

408. Wu J., W.R. Dunham, B. Weiss. (1995). Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 270: 10323-7.
409. Yamamoto K., Katsumori Yata, Nobuyuki Fujita1, Akira Ishihama. (2001). Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. *Molecular Microbiology*. 41(5): 1187–1198.
410. Yamanaka H., Izawa H., Okamoto K. (2001). Carboxy-terminal region Involved in activity of *Escherichia coli* TolC. *Journal of Bacteriology*. 183:6961-6964.
411. Yang Shirley, S. Rahmati Clayton, E.L. Zechiedrich. (2003). Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 545–556.
412. Yerushalmi H. & Schuldiner S. (2000). An essential glutamyl residue in EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 275:5264-9.
413. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Nakamura S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 34: 1271-1272.
414. Yoshimura F. & Hiroshi N. (1985). Diffusion of  $\beta$ -lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27(1):84-92.
415. Young K.D. (2001). Approaching the physiological functions of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie*. 83: 99–102.
416. Young K.D. (2003). MicroReview. Bacterial shape. *Molecular Microbiology*. . 49(3), 571–580.
417. Zgurskaya H.I. & Nikaido H. (1999). Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 7190–7195

- 418.** Zheng Ming, Bernard Doan, Thomas D. Schneider, Gisela Storz. (1999). *OxyR and SoxRS Regulation of fur*. *Journal of Bacteriology*. 181(15): 4639–4643.