



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

“Análisis de la regulación por Quorum sensing del sistema de resistencia a ciprofloxacina codificado por el gen *crpP* del plásmido pUM505”

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**p.Q.F.B BRENDA VALERIO ARELLANO**

**ASESOR:**

**D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ**

**COASESOR:**

**D.C. VICTOR MEZA CARMEN**

**MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO DEL 2022**

---

---

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DE LA D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ Y EL D.C. VICTOR MEZA CARMEN.

---

---

---

---

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

Por su cariño inigualable, su apoyo incondicional, comprensión en mis decisiones, además, darme todos los instrumentos necesarios para forjarme en la persona que soy hoy en día; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Los amo.

### **A MI HERMANA**

Con mucho cariño para Mariana, que siempre ha estado junto a mi. Te amo mucho hermanita.

---

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

### **A mis asesores:**

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz y D.C. Victor Meza Carmen, por confiar en mí para la realización de este trabajo y permitirme formar parte de su equipo de laboratorio.

### **A mis sinodales:**

D.C. Rafael Ortiz Alvarado, D.C. Consuelo de Jesús Cortés Penagos, D.C. Lucia Matilde Nava Barrios, Q.F.B. Herminia Hernández Ibarra y D.C. Marco Iván Valle Maldonado, por su participación, disposición e interés en la revisión de este trabajo.

### **A mis abuelitos:**

Marisela, Genaro, Meche y Reynaldo; muchas gracias por todos sus consejos, su cariño incondicional, y siempre impulsarme a ser una mejor persona.

### **A mis tías y tíos:**

Karla, Francisco, Javier, Sergio y David; gracias por siempre estar presentes y motivarme a cumplir mis sueños.

### **A mis compañeras de laboratorio:**

Karen y Bianca, muchas gracias por todos sus consejos, enseñanzas y por su apoyo incondicional. Sin ustedes no hubiera sido lo mismo; siempre seremos “equipo dinamita”.

Diana, Tere y Andrea; por ser unas increíbles compañeras de laboratorio.

### **A mis amigos:**

Jorge, por no dejarme rendir, motivarme y apoyarme en todo momento; gracias por todas tus enseñanzas, paciencia y sobre todo tu cariño.

Linda , Grecia, Lulú, Anahí y Krito, muchas gracias por siempre estar ahí, escuchando mis locuras y sobre todo su incondicional cariño.

Norma, Angeles, Xiadani, Selene, Ame, Mario y Colin, gracias a ustedes mi estancia por la facultad fue única, por su apoyo incondicional, pero sobre todo por su inigualable amistad, que sin importar la distancia y el tiempo siempre estara presente.

---

---

---

---

## RESUMEN

La proteína CrpP confiere resistencia a Ciprofloxacina (Cip), un antibiótico del grupo de las quinolonas. CrpP es codificada por el gen *crpP* (antes nombrado como *orf131*) que fue localizado en el plásmido conjugativo pUM505, aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*. El plásmido pUM505 confiere resistencia a Cip y Norfloxacina (otro antibiótico del grupo de las quinolonas) a *P. aeruginosa* PAO1 (cepa de referencia); sin embargo, la transferencia del gen *crpP* no confirió resistencia a Cip en este fondo genético. *P. aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo suelo y agua, así como en asociación con varios organismos vivos y es fuente de infecciones oportunistas en humanos. En *P. aeruginosa* múltiples factores de virulencia implicados en la infección aguda y daño de la célula huésped son regulados por los sistemas de Quorum sensing (QS) Las y Rhl. El QS un mecanismo de comunicación bacteriano que depende de la densidad celular y que modula la producción y liberación de moléculas (autoinductores) que alteran la expresión de genes de virulencia. Aunado a esto se ha descrito que la resistencia a los antibióticos puede ser modulado por el sistema de QS. Por lo anterior fue de interés determinar si la resistencia a Cip conferido por el gen *crpP* es modulado por el sistema QS. La transferencia del gen *crpP* a la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (mutante en los genes *lasI* y *rhlI*) incremento la resistencia a Cip en comparación a la cepa mutante sin el gen, lo que sugiere que el mecanismo de resistencia conferido por CrpP es modulado negativamente por el sistema de Quorum sensing.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, plásmido pUM505, gen *crpP*, ciprofloxacina, Quorum sensing.

---

---

---

---

## ABSTRACT

The CrpP protein confers resistance to Ciprofloxacin (Cip), a quinolone antibiotic. CrpP is encoded by the *crpP* gene (formerly named *orf131*) which was located in the conjugative plasmid pUM505, isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. The pUM505 plasmid confers resistance to Cip and Norfloxacin (another quinolone antibiotic) to *P. aeruginosa* PAO1 (reference strain); however, transfer of the *crpP* gene did not confer resistance to Cip in this genetic background. *P. aeruginosa* is a Gram-negative bacterium widely distributed in the environment, including soil and water, as well as in association with various living organisms and is a source of opportunistic infections in humans. In *P. aeruginosa* multiple virulence factors involved in acute infection and host cell damage are regulated by the Quorum sensing (QS) Las and Rhl systems. The QS is a bacterial communication mechanism that depends on cell density and modulates the production and release of molecules (autoinducers) that alter the expression of virulence genes. In addition, it has been described that antibiotic resistance can be modulated by the QS system. Therefore, it was of interest to determine whether resistance to Cip conferred by the *crpP* gene is modulated by the QS system. Transfer of the *crpP* gene to the *P. aeruginosa* *lasI/rhlII* strain (mutant in the *lasI* and *rhlII* genes) increased resistance to Cip compared to the mutant strain without the gene, suggesting that the resistance mechanism conferred by CrpP is negatively modulated by the Quorum sensing system.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, plasmid pUM505, gen *crpP*, ciprofloxacin, Quorum sensing.

---

---

---

---

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Historia de las quinolonas.....	1
2. Clasificación de las quinolonas.....	3
2.1 Primera generación.....	3
2.2 Segunda generación.....	3
2.3 Tercera generación.....	5
2.4 Cuarta generación .....	5
3. Relación estructura-acción de las quinolonas .....	7
4. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	9
5. Resistencia bacteriana a quinolonas .....	11
5.1 Sistemas de resistencia a quinolonas .....	13
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>19</b>
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
2. Plásmido pUM505 .....	20
3. Proteína CrpP.....	22
4. Quorum sensing de <i>P. aeruginosa</i> .....	22
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>V. OBJETIVO .....</b>	<b>28</b>
<b>VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....</b>	<b>28</b>
<b>VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>29</b>
<b>VIII. Materiales y Métodos.....</b>	<b>29</b>
1. Medios de cultivo.....	30
2. Cepas empleadas .....	30
3. Preparación de células competentes.....	30
4. Transformación por el método de electroporación .....	31
5. Aislamiento de DNA por lisis alcalina .....	31
6. Amplificación por PCR .....	32
7. Electroforesis en gel de agarosa.....	32
8. Pruebas de susceptibilidad .....	32
9. Cinéticas de crecimiento.....	34
10. Ensayos de virulencia .....	34

---

---

---

---

<b>IX. Resultados .....</b>	<b>35</b>
1. Amplificación por PCR del gen <i>crpP</i> en la mutante de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) .....	35
2. Pruebas de susceptibilidad a CIP de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) .....	35
3. Efecto de la adición de AHL en la susceptibilidad a Cip de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> (pUCP_ <i>crpP</i> )...	39
4. Cinéticas de crecimiento de la transformante de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) en presencia y ausencia de Cip .....	39
5. Pruebas de susceptibilidad a norfloxacin (Nor) de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) .....	42
6. Pruebas de susceptibilidad a estreptomycin (Sm) de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) .....	44
7. CrpP modifica la virulencia de la mutante <i>P.aeruginosa lasI/rhlI</i> .....	44
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>XI. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>53</b>

---

---

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la primera quinolona.....	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Primera y segunda generación de quinolonas.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Tercera y cuarta generación de quinolonas.....	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente.....	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b> Acción de las topoisomerasas tipo IIA en el DNA.....	<b>10</b>
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la acción de las quinolonas.....	<b>12</b>
<b>Figura 7.</b> Resistencia bacteriana a quinolonas.....	<b>14</b>
<b>Figura 8.</b> Mapa genético del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura general de las acil homoserín lactonas (AHLs).....	<b>24</b>
<b>Figura 10.</b> Estructura de las acil homoserín lactonas del QS en <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 11.</b> Mecanismo general del sistema de Quorum Sensing en <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 12.</b> Resistencia a ciprofloxacina conferida por el producto del gen <i>crpP</i> del plásmido pUM505.....	<b>27</b>
<b>Figura 13.</b> Amplificación del gen <i>crpP</i> de la transformante de <i>P. aeruginosa lasI/rhII</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ).....	<b>36</b>
<b>Figura 14.</b> Curva de susceptibilidad a Cip de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en presencia y ausencia del gen <i>crpP</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 15.</b> Curva de susceptibilidad a Cip de <i>P. aeruginosa lasI/rhII</i> en presencia o ausencia del gen <i>crpP</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 16.</b> Curva de susceptibilidad a CIP adicionando AHL en la cepa de <i>P. aeruginosa lasI/rhII</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ).....	<b>40</b>
<b>Figura 17.</b> Cinéticas de crecimiento en una concentración subinhibitoria de Cip de la cepa de <i>P. aeruginosa lasI/rhII</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ).....	<b>41</b>
<b>Figura 18.</b> Cinéticas de crecimiento en una concentración inhibitoria de Cip de la cepa de <i>P. aeruginosa lasI/rhII</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ).....	<b>43</b>

---

---

---

---

<b>Figura 19.</b> Curva de susceptibilidad a Nor de la cepa de <i>P. aeruginosa lasl/rhl</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) .....	<b>45</b>
<b>Figura 20.</b> Curva de susceptibilidad a Sm en la cepa de <i>P. aeruginosa lasl/rhl</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ).....	<b>46</b>
<b>Figura 21.</b> Virulencia de la cepa de <i>P. aeruginosa lasl/rhl</i> (pUC_ <i>crpP</i> ).....	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos empleados en PCR.....	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b> Condiciones empleadas para la amplificación por PCR del gen <i>crpP</i> en la mutante de <i>P. aeruginosa lasl/rhl</i> (pUCP_ <i>crpP</i> ) .....	<b>33</b>

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Historia de las quinolonas

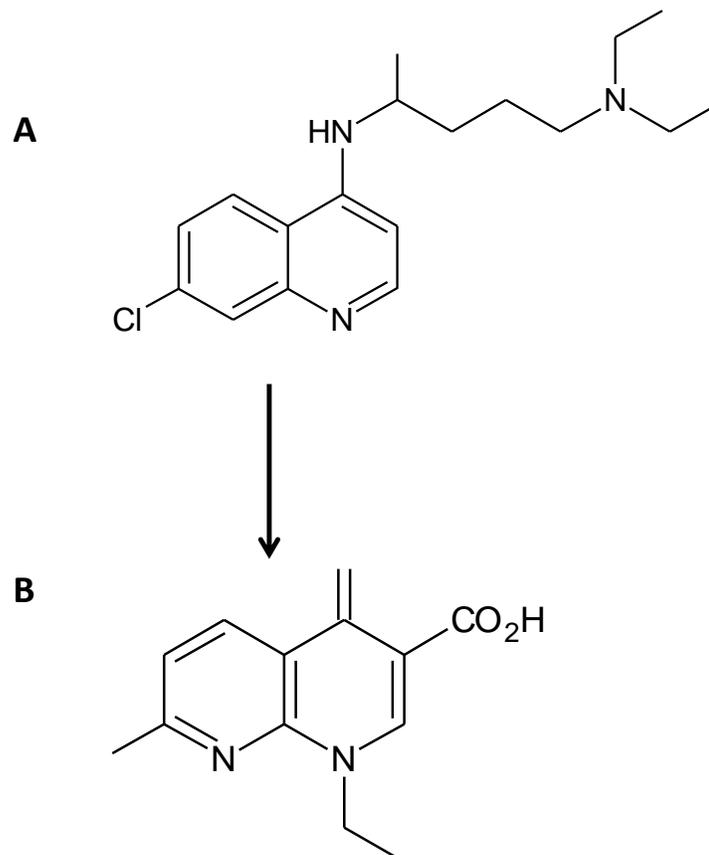
El término “quinolona” es usado para referirse a una clase de agentes antimicrobianos de amplio espectro, que engloba a naftiridinas, quinolonas, quinazolininas y isotiazolquinolonas (Drlica y col., 2009).

La primera quinolona en ser sintetizada fue el ácido nalidíxico en 1962, por George Leshner y colaboradores, es una molécula derivada de la cloroquina (**Figura 1**) (Leshner y col., 1962). En 1967 se llevó a cabo su introducción de uso clínico para el tratamiento de infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias (Emmerson & Jones, 2003).

Desde el descubrimiento del ácido nalidíxico se han desarrollado nuevas quinolonas, además se ha permitido el entendimiento del mecanismo de acción de las mismas, así como la modificación del núcleo naftiridina que es la estructura base del ácido nalidíxico mejorando la potencia que tiene como antibacteriano, asimismo, logrando modificar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (Andriole, 2005).

Tomaron décadas en producir compuestos con mejor biodisponibilidad y un mayor espectro de acción que el ácido nalidíxico, entre 1978 y 1982 se llegaron a patentar un gran número de quinolonas, entre estos ciprofloxacina (Cip) y norfloxacina (Nor), en la década de 1990 se desarrolló levofloxacina (Lev) y gatifloxacina (Gat) y a principios de la década de 2000, moxifloxacina (Mox), gemifloxacina (Gem) y garenoxacina (Gar).

La flumequina, desarrollada en 1976, fue el primer compuesto en el cual se le añadió un flúor en la posición 6 de la molécula base (Ezalarab y col., 2018). La modificación mejoró su efectividad frente a bacterias Gram-negativas y enterobacterias resistentes al ácido nalidíxico, también se amplió la actividad hacia las bacterias Gram-positivas (Bisacchi y col., 2014).



**Figura 1. Estructura química de la primera quinolona.** Se muestra la molécula de cloroquina (**A**) y su derivado el ácido nalidíxico (**B**).

Hasta el día de hoy, la Cip, la cual fue patentada en 1981, continúa siendo una de las fluoroquinolona más empleadas en el tratamiento contra bacterias Gram-negativas, siendo activa contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (Ball, 2000); sin embargo, a pesar de tener excelentes resultados en muchas infecciones respiratorias, se reportaron fallas en el tratamiento de infecciones neumocócicas, limitando su uso en esta área (Redgrave y col., 2014).

## **2. Clasificación de las quinolonas**

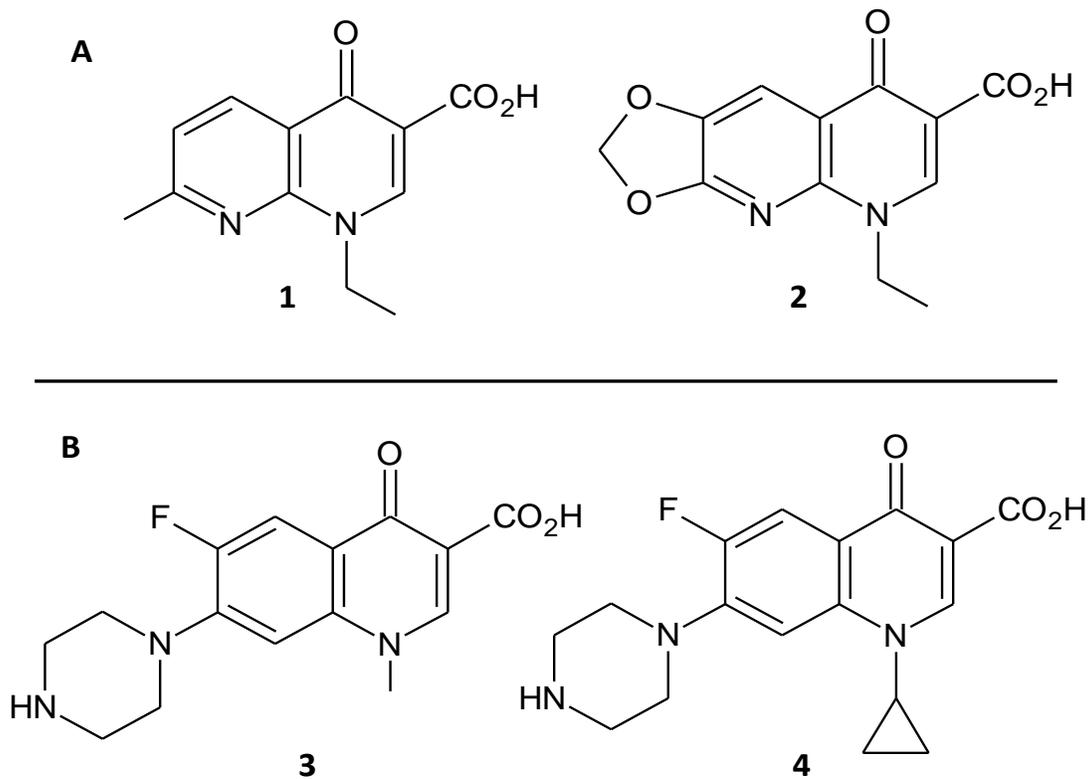
La estructura molecular de las quinolonas se ha ido modificando y adaptando con el tiempo en asociación de las necesidades clínicas (Ball, 2000). Se modificó el ácido nalidíxico obteniendo un amplio espectro de actividad antimicrobiana, dando origen a las primeras fluoroquinolonas (Álvarez y col., 2015).

### **2.1 Primera generación**

Las primeras quinolonas en ser sintetizadas fueron el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (**Figura 2A**), usadas en el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas provocadas por microorganismos Gram-negativos (Aldred y col., 2014). No son muy activas contra microorganismos Gram-positivos o bacterias anaerobias (Andriole, 2005).

### **2.2 Segunda generación**

Esta generación de quinolonas fue introducida en 1980, cuando se sintetizó norfloxacin al adicionar un átomo de flúor en la posición C-6 y un anillo de piperazina en C-7, llamándose ahora fluoroquinolonas (Andriole, 2005). Se mejoró la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Álvarez, 2015). Entre ellas se encuentran norfloxacin y ciprofloxacina (**Figura 2B**); norfloxacin es utilizada



**Figura 2. Primera y segunda generación de quinolonas. (A)** Se muestran moléculas de la primera generación: (1) ácido nalidíxico y (2) ácido oxolínico; y **(B)** de la segunda generación: (3) norfloxacin y (4) ciprofloxacin.

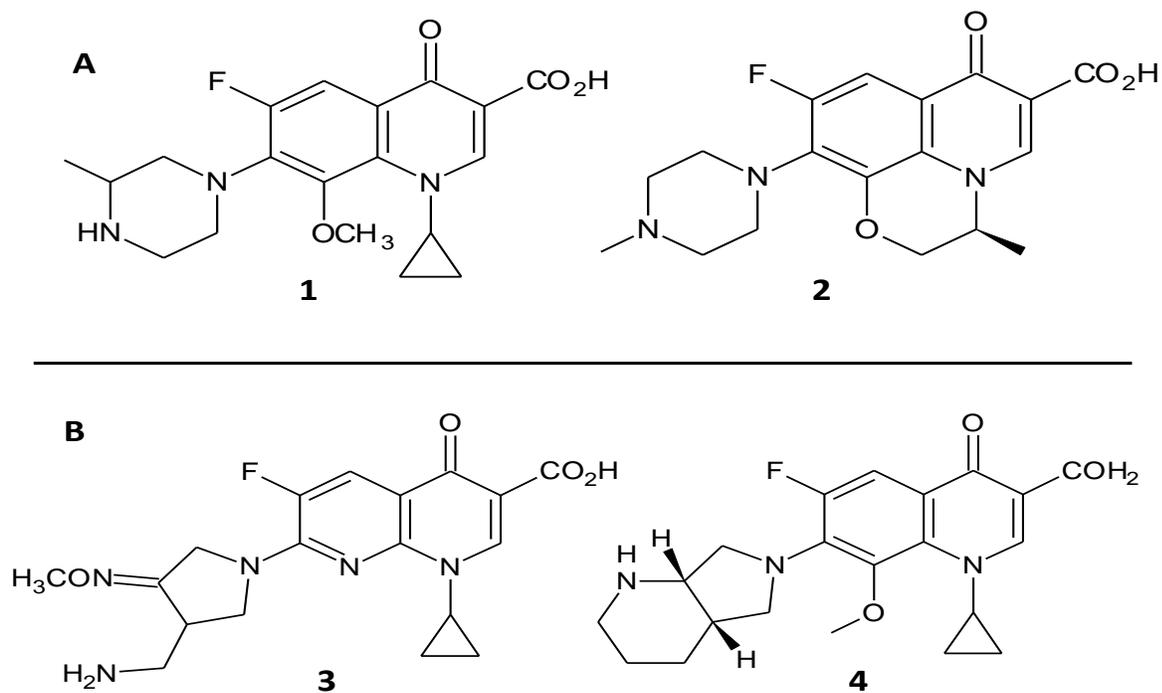
principalmente en el tratamiento de infecciones urinarias y ciprofloxacina es empleada en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, osteomielitis causada por enterobacterias, infecciones de oído, infecciones gonocócicas y prostatitis crónica bacteriana, por lo cual es una de las quinolonas más utilizadas (Redgrave y col., 2014).

### **2.3 Tercera generación**

Las quinolonas de este grupo presentaron sustituciones de piperazina en la posición C-7 y de un grupo metoxi en la posición C-8(Álvarez y col., 2015) .Las quinolonas pertenecientes a la tercera generación incluyen gatifloxacina y levofloxacina (**Figura 3A**). La gatifloxacina, es utilizada en el tratamiento de gonorrea, infecciones pulmonares, infecciones de piel e incluso del tracto urinario; por otro lado, la levofloxacina, esta indicada en el tratamiento de neumonía, bronquitis crónica, infecciones renales y de próstata(Ezelarab y col., 2018). Las quinolonas de esta generación se caracterizan por tener un mayor grado de potencia contra bacterias Gram-positivas y una mayor actividad contra bacterias anaerobias (Andriole, 2005).

### **2.4 Cuarta generación**

El último grupo presenta múltiples cambios como: la adición de ciclopropil en la posición C-1 y un grupo metoxi en C-8, también se sustituyó el átomo de flúor en C-6 y piperazina en C-7, nombrándose a este grupo des-fluoroquinolonas (Álvarez y col., 2015) .En esta generación se encuentran moxifloxacina y gemifloxacina (**Figura 3B**), ambas son utilizadas en el tratamiento de neumonía, bronquitis e infecciones de los senos paranasales (Brighty y Gootz, 2000). Lo que caracteriza a esta generación es poseer un alto grado de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas, particularmente pneumococci; así como, bacterias anaerobias (Andriole, 2005).



**Figura 3. Tercera y cuarta generación de quinolonas. (A)** Se muestran moléculas de la tercera generación: (1) gatifloxacin y (2) levofloxacin; y **(B)** de la cuarta generación: (3) gemifloxacin y (4) moxifloxacin.

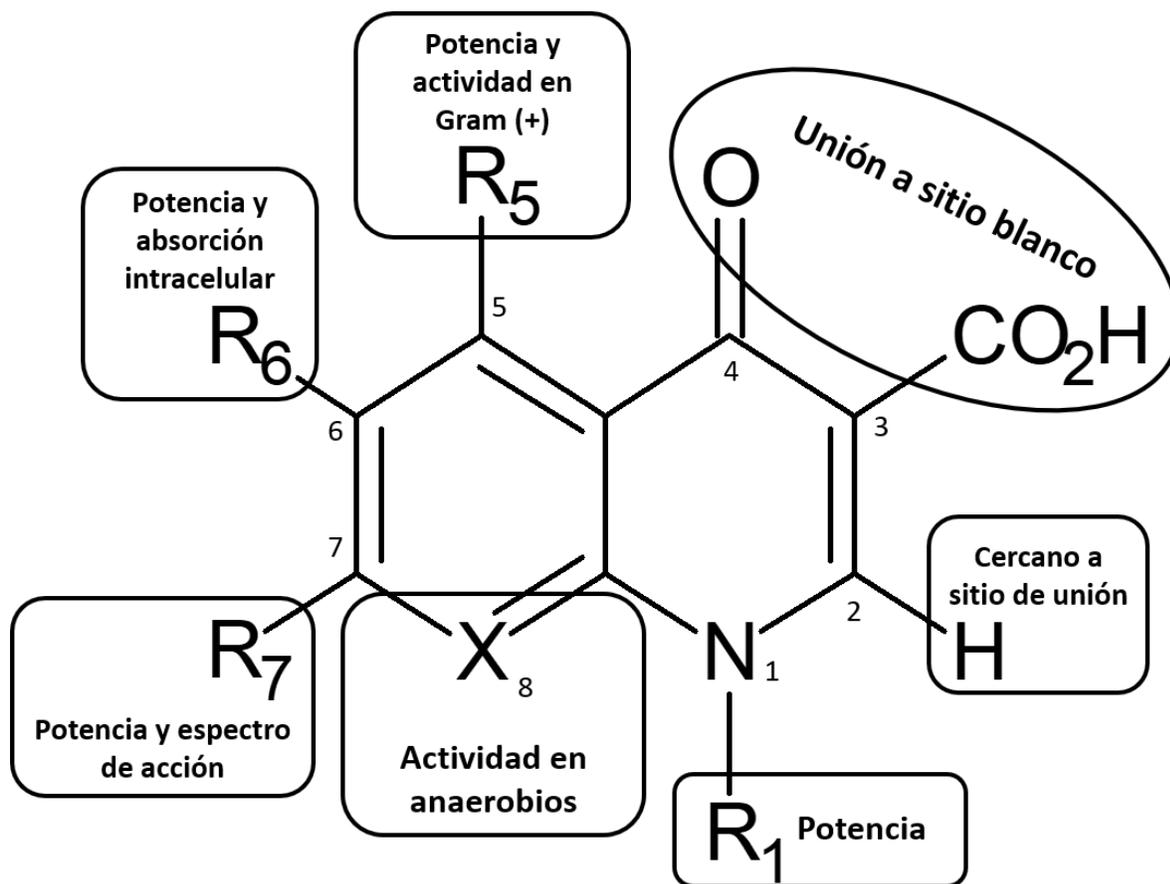
### 3. Relación estructura-acción de las quinolonas

Las quinolonas son de gran interés científico y clínico, debido a que potencialmente ofrecen muchos atributos de un antibiótico ideal: alta potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, formulaciones orales e intravenosas, altos niveles en suero, amplio volumen de distribución y baja incidencia de efectos adversos (Bolon 2011), no obstante, para lograr estas características se han realizado una gran cantidad de modificaciones tomando como base el núcleo de las quinolonas (**Figura 4**).

Las quinolonas químicamente son estructuras bicíclicas heteroaromáticas, su estructura base incluye a un núcleo piridona- $\beta$ -ácido carboxílico y a un anillo aromático. La relación entre la estructura química y la actividad biológica (relación estructura-actividad) de estas moléculas, ha motivado a la síntesis de compuestos que posean diferentes radicales en la estructura química básica (Mella y col., 2000).

La posición 1 forma parte de la unión al sitio blanco y la sustitución de un grupo ciclopropil parece ser la más adecuada, no obstante, la adición de un grupo 2,4-difluorfenil también incrementa la potencia, especialmente contra anaerobios. La posición 2 se encuentra cerca la unión a sitio blanco y la adición de sustituyentes ha resultado en la disminución de la actividad antibacteriana. Las posiciones 3 y 4 son consideradas críticas para la unión a sitios blancos, sin embargo, hasta la fecha no se han reportado sustituciones que pueden incrementar la actividad (Andersson y MacGowan, 2003). Las sustituciones en la posición 5 pueden ser capaces de cambiar la configuración planar de la estructura base, se han introducido sustituyentes pequeños, como grupos amino, hidroxilo o metilo los cuales incrementan la actividad in vitro contra bacterias Gram-positivas (Yoshida y col., 1996) síntesis de compuestos que presentaban los sustituyentes 6-fluoro, 7-piperazinil (norfloxacin, ciprofloxacina), los cuales dieron origen a un grupo denominado "fluoroquinas".

Las primeras modificaciones que se realizaron fue la adición del flúor en la posición 6, lo cual incrementó más de 10 veces su potencia y se cree que estabiliza la unión con su sitio blanco al influenciar la distribución de cargas (Laponogov y col., 2009)



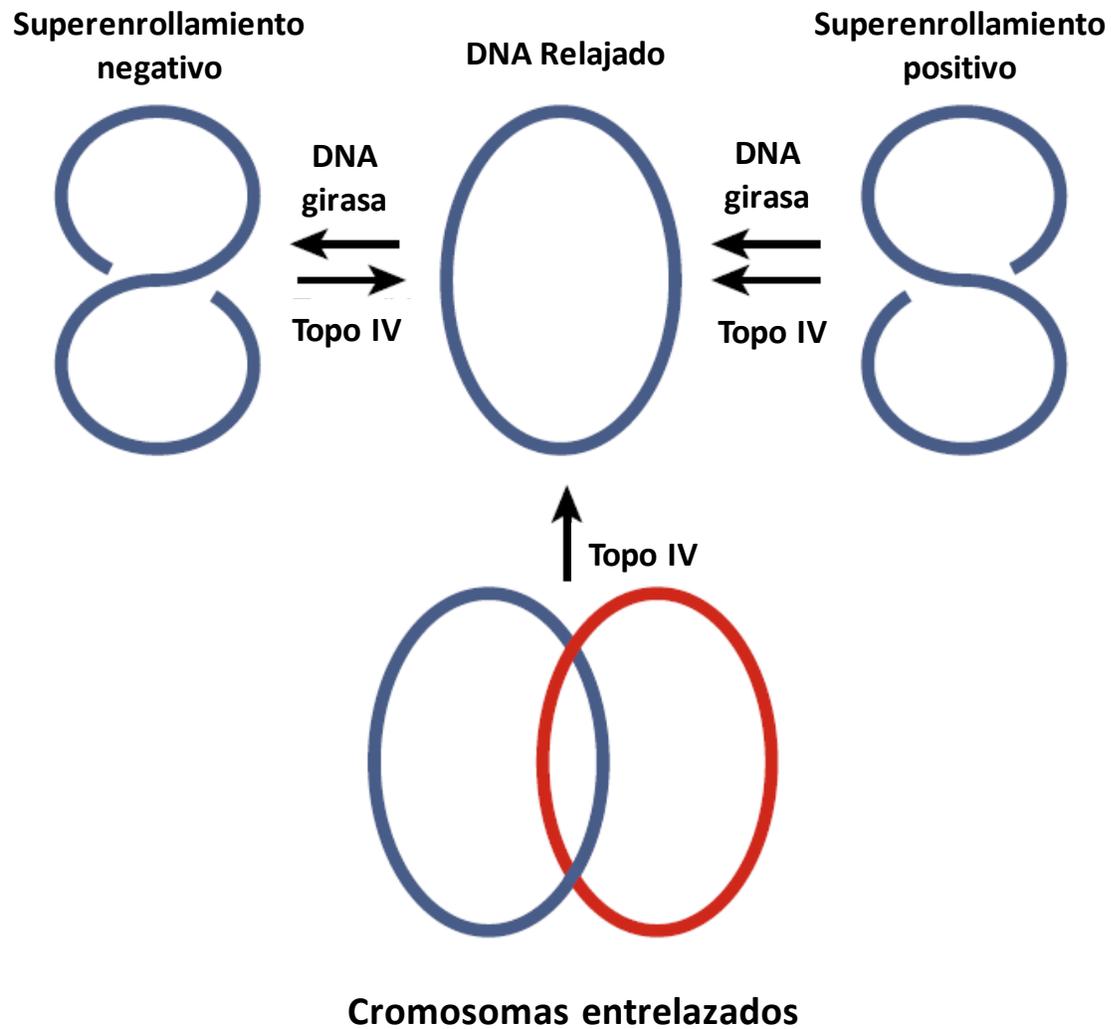
**Figura 4. Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente.** Se marcan con grupos R las posiciones más comúnmente sustituidas. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones en cada posición (Modificado de Andersson y MacGowan, 2003).

Los sustituyentes óptimos para la posición 7 son grupos heterociclos de nitrógeno de 5 o 6 carbonos, los más comunes de estos heterociclos son piperazina y pirrolidina. La posición 8 se considera que afecta la configuración estérica de molécula base, al igual que la posición 5, el grupo hálgeno incrementa la actividad contra anaerobios y la adición de nitrógeno, grupo metilo o metoxilo incrementan la actividad (Peterson, 2001)

#### **4. Mecanismo de acción de las quinolonas**

Los blancos de las quinolonas son dos enzimas esenciales para los procesos celulares de replicación, transcripción y reparación del DNA de la célula bacteriana; la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Estas enzimas están encargadas del superenrollamiento del DNA lo que permite que esta molécula mantenga la forma compacta dentro de la célula (Forterre y col., 2007). Estas enzimas pertenecen a la familia de las topoisomerasas tipo IIA y están compuestas de dos subunidades; GyrA de 97 kilodaltones (kDa) y GyrB de 90 kDa, correspondientes a la DNA girasa, y ParC de 75 kDa y ParE de 70 kDa que conforman a la topoisomerasa IV (Champoux, 2001). Las dos enzimas contribuyen al desdoblamiento del DNA, sin embargo, funcionan de diferente manera, la DNA girasa remueve superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación, además de ser responsable de la segregación de los cromosomas (**Figura 5**) (Redgrave y col., 2014).

Las quinolonas son transportadas al interior de la célula bacteriana mediante difusión simple (Jacoby, 2005). Cuando están adentro de la célula, generan un par de cortes en la cadena sencilla de DNA y se unen covalentemente al extremo 5' recién generado formando un complejo de escisión DNA-topoisomerasa, lo cual relaja el superenrollamiento del DNA (Drlica y col., 2009). Las quinolonas se unen rápidamente al complejo, probablemente antes de que la ruptura del DNA ocurra, mediante la región GyrA de la DNA girasa y la región ParC de la topoisomerasa IV, generando el complejo terciario DNA-Topoisomerasa-Quinolona (**Figura 6**) (Leo y col., 2005)



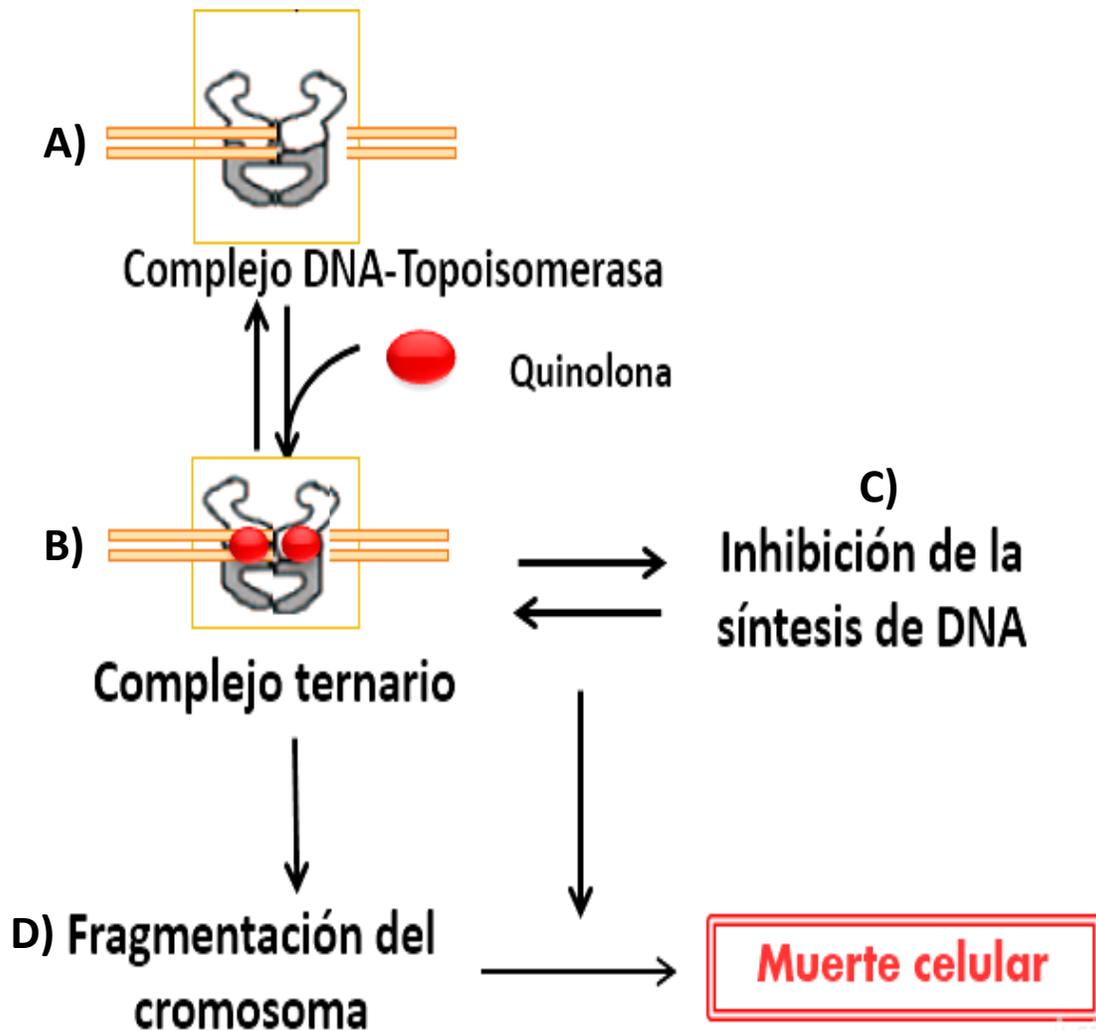
**Figura 5. Acción de las topoisomerasas tipo IIA en el DNA.** Se muestra de manera esquemática la acción de las topoisomerasas tipo IIA en el superenrollamiento del DNA en las bacterias (Modificado de Redgrave y col., 2014).

La formación del complejo ternario DNA-topoisomerasa-quinolona bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo el crecimiento bacteriano, este proceso es reversible si se remueve la quinolona, por acción de un agente quelante como el EDTA o por tratamiento térmico; sin embargo, al no revertirse, se induce la respuesta del sistema SOS, mejorando la capacidad de reparación del DNA, lo que lleva a la formación de células filamentosas debido a la inhibición de la división celular lo que ocasiona la muerte celular lenta (Drlica y col., 2009). En los sistemas *in vitro*, cuando la DNA girasa es el blanco, la inhibición ocurre en minutos mientras que si el blanco es la topoisomerasa IV la inhibición ocurre más lentamente (Khodursky y Cozzarelli, 1998).

Existen dos vías de acción de las quinolonas que ocasionan una muerte celular rápida: i) la vía dependiente de la síntesis de proteínas o la vía sensible al cloranfenicol en condiciones de anaerobiosis, que es característica de la primera generación de quinolonas y ii) la vía independiente de la síntesis de proteínas y en condiciones aeróbicas. Estas vías dan lugar a la fragmentación del DNA cromosómico, que surge debido a la remoción del complejo ternario, lo cual puede ocurrir por la digestión de las topoisomerasas mediada por proteasas o nucleasas. Una vez que comienza la fragmentación del cromosoma se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que son las responsables de la muerte celular (Drlica y col., 2009).

## **5. Resistencia bacteriana a quinolonas**

El descubrimiento de los antibióticos marco el inicio de una nueva era en la historia humana, estos, han evolucionado la medicina en distintos aspectos; sin embargo, el uso exitoso de cualquier antibiótico se ve comprometido desde que es empleado por primera vez, ya sea por el potencial desarrollo de tolerancia o por la resistencia por parte del microorganismo contra el que es empleado (Davies, 1996).



**Figura 6. Representación esquemática de la acción de las quinolonas. (A)** Unión de la topoisomerasa con el DNA y formación del complejo DNA-Topoisomerasa; **(B)** unión de la quinolona y formación del complejo ternario DNA-Topoisomerasa-Quinolona; **(C)** inhibición de la replicación que conduce a la inducción del sistema SOS y a la filamentación celular; **(D)** fragmentación letal del cromosoma (modificado de Drlica y col. 2009).

Las quinolonas son antibióticos sintéticos, debido a esto, se propuso que los únicos sistemas de resistencia que las bacterias podían adquirir de manera inmediata serían las mutaciones en los genes que codifican las proteínas blanco, las topoisomerasas tipo IIA, y la expulsión de quinolonas mediada por los transportadores de membrana (Martínez y col., 2009) .El origen de los genes de resistencia a antibióticos de origen biológico, son producidos por los propios organismos; por lo cual, se sugirió que no se pudiera adquirir resistencia mediante la transferencia horizontal de genes, para el caso de las quinolonas (Hernández y col., 2011)

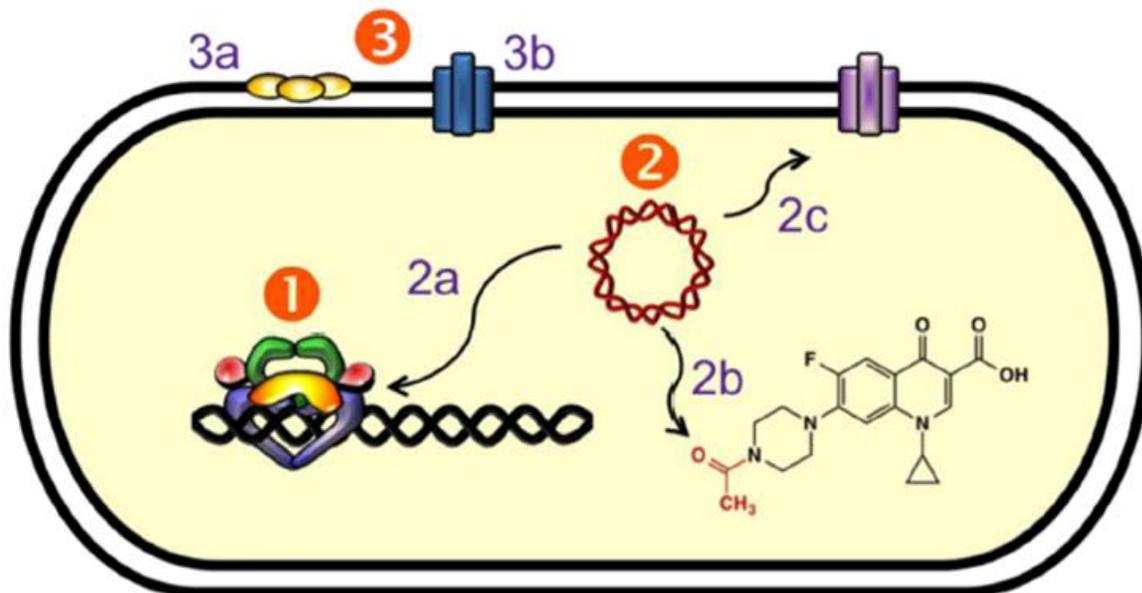
## **5.1 Sistemas de resistencia a quinolonas**

En la actualidad podemos clasificar a los sistemas de resistencia en dos grupos: 1) Sistemas que son codificados por genes cromosómicos; como lo son las modificaciones de los sitios blanco y los sistemas de expulsión, y 2) Sistemas que son codificados por genes plasmídicos, tales como proteínas Qnr, sistemas de expulsión y la enzima aminoglucósido transferasa modificada (aac(6´)-Ib-cr) (**Figura 7**) (Aldred y col., 2014).

### **5.1.1 Sistemas codificados por genes cromosómicos**

#### **i) Modificación de los sitios blanco**

Desde la introducción del ácido nalidíxico, la primera quinolona, se observó que la resistencia bacteriana que es producida por mutaciones en uno o más de los genes que codifican a los objetivos primarios y secundarios de estos fármacos, las topoisomerasas tipo II. La “región determinante de la resistencia a las quinolonas” (QRDR, por sus siglas en inglés), es una región donde surgen este tipo de mutaciones, que dan lugar a sustituciones de aminoácidos y que alteran la estructura de la proteína diana así como su afinidad de unión; esta región se encuentra muy cercana al sitio activo donde la enzima se une al DNA (Redgrave y col., 2014).



**Figura 7. Resistencia bacteriana a quinolonas.** Se representa una célula bacteriana mostrando los sistemas de resistencia a las quinolonas. Los detalles de cada sistema se describen en el texto. (1) Resistencia mediada por mutaciones en los genes que codifican a las proteínas blanco (DNA girasa y topoisomerasa IV), (2) Resistencia mediada por genes plasmídicos, (2a) Proteínas Qur (en amarillo) que disminuyen la unión del complejo DNA-topoisomerasa, (2b) Aac (6')-Ib-cr es una enzima que acetila algunas quinolonas, disminuyendo su efectividad. (2c) Sistemas de expulsión que disminuyen la concentración intracelular de las quinolonas. (3) Resistencia mediada por genes cromosómicos, (3a) Disminución de la expresión de porinas, (3b) Sistema de expulsión (tomada de Aldred y col. 2014).

En las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*, la DNA girasa es considerado el objetivo principal de las quinolonas, estas mutaciones primarias implican una sustitución en la serina 83 o en el ácido aspártico 87 (en *E. coli*) dentro de la estructura primaria de GyrA; sin embargo, una vez mutado el gen *gyrA*(subunidad de la DNA girasa) las topoisomerasa IV también se convierte en un objetivo (Yoshida y col., 1996).

En el caso de las bacterias Gram-positivas, los genes que codifican a la topoisomerasa IV son el objetivo principal, las mutaciones son encontradas principalmente en el gen *parC*, en las bacterias que son altamente resistentes poseen mutaciones adicionales en los genes *gyrA* y *parE* (Ferrero y col., 1994).

## ii) Regulación de la expresión de porinas

Las quinolonas atraviesan la membrana citoplasmática por difusión simple, mediante porinas que están localizadas en la membrana externa que sirven como canales de difusión y permiten el paso de moléculas hidrófilas pequeñas (Hooper, 2005) .En las bacterias Gram-positivas, las quinolonas deben cruzar la pared celular y la membrana plasmática para poder alcanzar a su blanco; en cambio, las bacterias Gram-negativas deben de atravesar una barrera externa adicional, que se conoce como peptidoglicano. Las bacterias Gram-negativas pueden regular la expresión de porinas, como el caso de las proteínas OmpF y OmpC de *E. coli*, limitando así el ingreso de las quinolonas (Jacoby, 2005). La resistencia a quinolonas se puede ver poco afectada al reducir la expresión de los genes que codifican las porinas únicamente; sin embargo, la resistencia se vuelve significativa cuando se combina con mecanismos de resistencia adicionales (Hooper 2005).

## iii) Sistemas de expulsión

Los sistemas de expulsión poseen la característica de ser inespecíficos, lo cual los hace capaces de eliminar activamente diversos tipos de compuestos, como lo son: antibióticos, antisépticos, detergentes e incluso salicilatos de sodio (Alekhshun y Levy, 1999) .Lo cual sugiere que al ser capaces de reducir la concentración intracelular de las quinolonas, estas confieren resistencia (Redgrave y col., 2014) .Estos sistemas, son

clasificados en cinco familias: sistemas que unen ATP (ABC), superfamilia de facilitadores principales (MFS), sistemas de resistencia, nodulación y división celular (RND), proteínas pequeñas de resistencia a multidrogas (SMR) y sistemas de expulsión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos (MATE) (Martínez y col., 2009) .Estos sistemas son considerados como los responsables de la resistencia intrínseca de algunas bacterias como *P. aeruginosa* a las fluoroquinolonas y a otros tipos de drogas (Piddock 2006).

En *Staphylococcus aureus*, la resistencia a quinolonas esta asociada con el gen *norA*, el cual codifica un transportador de amplio espectro. Además, en *E. coli* la bomba de expulsión AcrAB-TolC tiene un papel principal en la resistencia a quinolonas (Wang y col., 2001).

### 5.1.2 Sistemas codificados por genes plasmídicos

#### i) Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr se identificaron por primera vez en 1998, en un plásmido multiresistente conocido como pMG252, el cual fue aislado de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a ciprofloxacina (Martínez y col., 1998) .El gen responsable que las codifica se denominó *qnr* porque confiere resistencia a quinolonas, este gen ha sido renombrado como *qnrA*, ya que se han descrito alelos *qnr* adicionales. Se han descrito cerca de 100 genes que se agrupan en 5 familias distintas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrD* y *qnrS* (Salah y col., 2019)

Las proteínas Qnr son pertenecientes a la familia de pentapéptidos (PRP, por sus siglas en inglés), llamadas así porque sus miembros contienen un motivo recurrente de cinco aminoácidos en tándem [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly] (Vetting y col., 2006) .Estas proteínas protegen al DNA de la acción de las quinolonas, cuando se unen al complejo DNA-Topoisomerasa, teniendo así participación en la resistencia a ciprofloxacina, ya que impide la unión de las quinolonas (**Figura 7**) (Tran, Jacoby, and Hooper 2005) .También proveen una baja resistencia a ciprofloxacina

en cepas de *E. coli*; sin embargo, adquieren importancia clínica cuando se asocian con otros mecanismos de resistencia a antibiótico (Tran y Jacoby, 2002)

#### ii) Modificación enzimática por la aminoglucósido acetiltransferasa

En el plásmido pSH10-2, aislado de una cepa clínica de *E. coli* resistente a ciprofloxacina, se identificó al gen *aac(6')-Ib*, el cual codifica una enzima aminoglucósido acetiltransferasa, esta confiere resistencia a algunos antibióticos del grupo de los aminoglucósidos: kanamicina, amikacina y tobramicina (Robicsek y col., 2006).

El análisis de la secuencia del gen *aac(6')-Ib* reveló que hay modificaciones en los codones 102 (Trp → Arg) y 179 (Asp → Tyr), se llevo a cabo una mutagénesis dirigida a estos codones, demostrando que en ausencia de dichas mutaciones el gen no se asociaría con la resistencia a quinolonas. El mecanismo de acción consiste en introducir un grupo acetilo en el nitrógeno no sustituido del anillo de piperazina que poseen ciprofloxacina y norfloxacina en la posición 6 (Robicsek y col., 2006).

#### iii) Sistemas de expulsión por genes plasmídicos

Los sistemas de expulsión confieren resistencia a quinolonas al disminuir la concentración intracelular del fármaco, hasta la fecha han sido identificados dos sistemas de expulsión, los cuales son codificados en plásmidos provenientes de cepas de *E. coli* (Poirel y col., 2012)

En el año 2002, se identificó el gen *qepA*, presente en el plásmido pHPA de una cepa clínica conocida como *E. coli* C316, aislada de la orina de un paciente hospitalizado. El gen *qepA*, codifica para la proteína de membrana interna QepA, el cual posee 14 segmentos transmembranales y pertenece a la familia MFS. Esta proteína confiere resistencia a quinolonas como el ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina (Yamane y col., 2007).

El plásmido pOLA52, fue identificado en una cepa de *E. coli*, el cual fue aislado de estiércol porcino en Dinamarca, en el año 2004. El plásmido contiene a los genes *oqxA* y *oqxB*, los cuales codifican a OqxA, una proteína de membrana interna perteneciente

a la familia RND, y a OqxB, que es una proteína de periplasma; esto representó un nuevo sistema de expulsión a múltiples fármacos (Hansen y col., 2004) .Las proteínas OqxAB confieren resistencia a las quinolonas; ciprofloxacina y ácido nalidíxico, a detergentes, y desinfectantes; así como, cloruro de benzalconio y SDS (Li y col., 2019).

## II. ANTECEDENTES

### 1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la rama de proteobacterias, a la cual pertenecen las enterobacterias (Pace, 1977). Ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo suelos, plantas, lagos y ríos (Green y col., 1974). Es capaz de crecer hasta 43°C, utiliza múltiples compuestos orgánicos como sustrato para poder crecer; lo cual le permite colonizar múltiples nichos en los que son escasos los nutrientes. *P. aeruginosa* se ha aislado de ambientes muy inhóspitos como lo son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina e incluso en el jabón (Hardalo y Edberg, 1997). Esta bacteria es un patógeno oportunista de pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos, que causa neumonía, infecciones en quemaduras, heridas, tracto urinario e intestino, otitis media y queratitis (Sousa y Pereira, 2014). Se ha descrito que *P. aeruginosa* emplea los mismos determinantes de virulencia para así poder infectar a diferentes hospederos, como lo son plantas y humanos (Fajardo y col., 2008). En los seres humanos es una de las causas más frecuentes de infecciones oportunistas, además de estar asociado con la mortalidad de pacientes con fibrosis quística (Battle y col., 2008). *P. aeruginosa* pertenece al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) que es un grupo de bacterias resistentes a los antibióticos y que son causas comunes de infecciones nosocomiales potencialmente mortales (Pendleton y col., 2013).

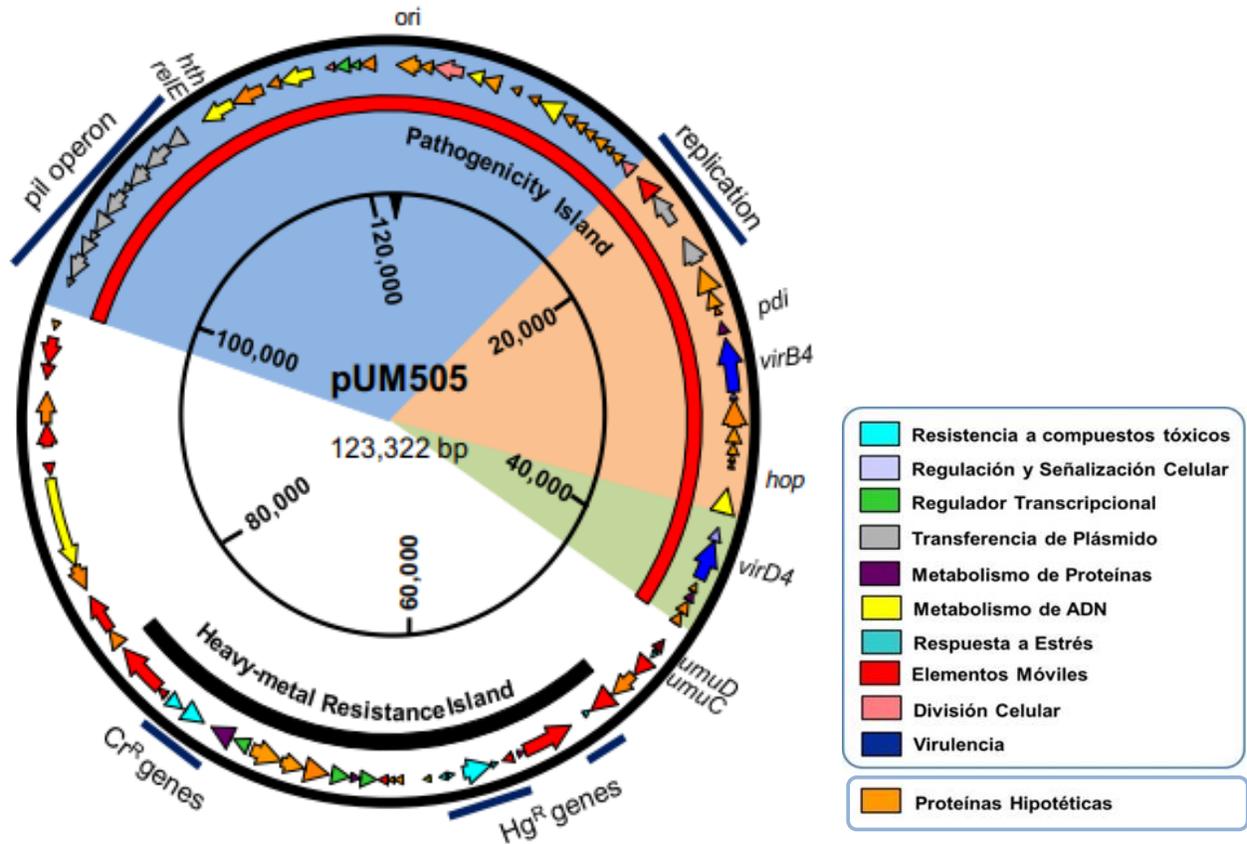
*P. aeruginosa* PAO1 fue aislada de un paciente con otitis media, siendo la primer cepa de *P. aeruginosa* secuenciada, es ampliamente usada en estudios de investigación básica y es una cepa estándar en el laboratorio. Presenta un único cromosoma circular de un tamaño aproximado de 6.3 millones de pares de bases y un total de 5570 marcos de lectura abiertos (*orf* por sus siglas en inglés) (Holloway, 1955). En el año 2000 se concluyó el genoma de PAO1 de *P. aeruginosa*, posee un gran número de genes involucrados en la regulación, transporte, catabolismo y expulsión de factores de virulencia, también puede codificar proteínas de membrana asociadas a la adhesión,

motilidad y eflujo de antibióticos (Stover y col., 2000) .Además, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar biopelículas (forma organizada de comunidades bacterianas) que incrementa la virulencia de la bacteria y contribuye al aumento de la resistencia a antibióticos, el incremento en la incidencia de resistencia a antibióticos por la formación de biopelículas ocasiona severas complicaciones terapéuticas y se ha asociado con falla en los tratamientos y la muerte (Wang y col., 2013).

## 2. Plásmido pUM505

pUM505 es un plásmido conjugativo, el cual fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado, se determinó que es capaz de conferir resistencia a cromato y mercurio (Cervantes y Ohtake, 1988) .En el año 2011, nuestro grupo de trabajo realizó la secuenciación y el análisis de la secuencia del plásmido; se encontró que es un replicón de 123,332 pares de bases (pb) y se identificaron 138 regiones codificantes (Ramírez-Díaz y col., 2011)(**Figura 8**).

Se encontro que pUM505 presenta dos regiones bien definidas las cuales corresponden a islas genômicas, la primer región, de ~67 kb, corresponde a una isla de patogenicidad (PAI) y la segunda región, de ~31 kb, corresponde a una isla genómica que contiene genes de resistencia a metales. La PAIs son típicamente grandes regiones genómicas (10-200 kb) las cuales estan presentes en los genomas de las cepas patógenas. Pueden codificar factores de virulencia, como adhesinas, toxinas y los sistemas de secreción de proteínas (Hacker and Kaper 2000) .La PAI de pUM505 consiste en 78 marcos de lectura abiertos (*orfs* 1-51 y 112-138), posee genes implicados en la replicación del plásmido, la transferencia por conjugación y genes relacionados con virulencia, así como genes que codifican proteínas putativas con funciones desconocidas, son equivalentes a ~56% de los genes de la isla genómica (Ramírez-Díaz y col., 2011)



**Figura 8.** Mapa genético del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las regiones codificantes se muestran con flechas o puntas de flecha, indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones asignadas de las proteínas codificantes se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas. La isla de patogenicidad (PAI) se muestra con una barra roja y la isla de resistencia a metales pesados con una barra negra. Se indica el origen de replicación (ori) y con barras azules las regiones relacionadas con la transferencia, replicación, resistencia a mercurio (Hg<sup>R</sup>) y resistencia a cromato (Cr<sup>R</sup>). Los bloques de estructura de mosaico se representan como regiones de colores azul, naranja y verde. (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011)

### 3. Proteína CrpP

Recientemente, nuestro grupo de trabajo identificó la presencia del *orf131* en el plásmido pUM505, posteriormente este gen fue renombrado como *crpP*. El gen *crpP* codifica para una proteína de 65 aminoácidos y comparte una similitud en su secuencia con otras proteínas que están involucradas en la resistencia a antibióticos (Chávez-Jacobo y col., 2018).

El gen *crpP* se transfirió a una cepa de *E. coli* conocida como J53-3, mostrando que confiere resistencia a ciprofloxacina (**Figura 12**); sin embargo, la transferencia de *crpP* a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 no fue capaz de conferir resistencia al antibiótico, sugiriendo que el mecanismo de resistencia conferido por la proteína CrpP no es funcional o bien que es regulado negativamente en esta bacteria. CrpP es una proteína capaz de conferir resistencia en *E. coli* de manera específica, mediante un mecanismo dependiente de ATP, que fosforila al antibiótico e induciendo a su posterior degradación (Chávez-Jacobo y col., 2019). El gen *crpP* se encuentra ampliamente distribuido en aislados de origen clínico, y las proteínas homologas CrpP posee los aminoácidos conservados como la Gly7, Asp9, Lys33 y Cys40. Al realizarse ensayos de mutación mediante fusión por PCR, se logró identificar que estos aminoácidos conservados en proteínas CrpP, desempeñan un papel esencial para el mecanismo enzimático. Además, se determinó que mutaciones en los codones que codifican a estos aminoácidos, no ejercen actividad catalítica, por lo que no son capaces de modificar la molécula de ciprofloxacina (Chávez-Jacobo y col., 2020).

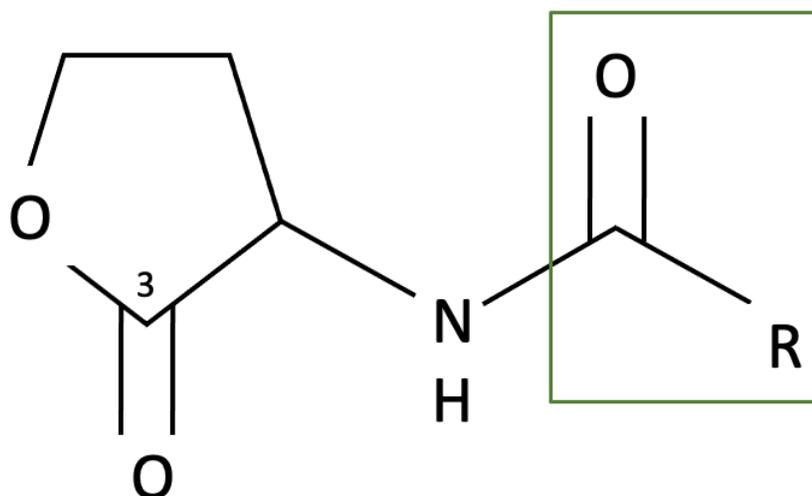
### 4. Quorum sensing de *P. aeruginosa*

El término de “quorum sensing” (QS) es usado para describir mecanismos de comunicación intercelular que son dependientes de la población bacteriana (Diggle col., y 2007). Previos estudios indican que el QS regula distintos factores de virulencia como: proteasas, exotoxina A, ramnolipidos y sideroforos, además de controlar la producción de biopelículas. El QS produce y libera moléculas conocidas como autoinductores, su concentración incrementa en función de la densidad bacteriana (Waters y Bassler, 2005) .En bacterias Gram-negativas estos autoinductores se conocen como acil

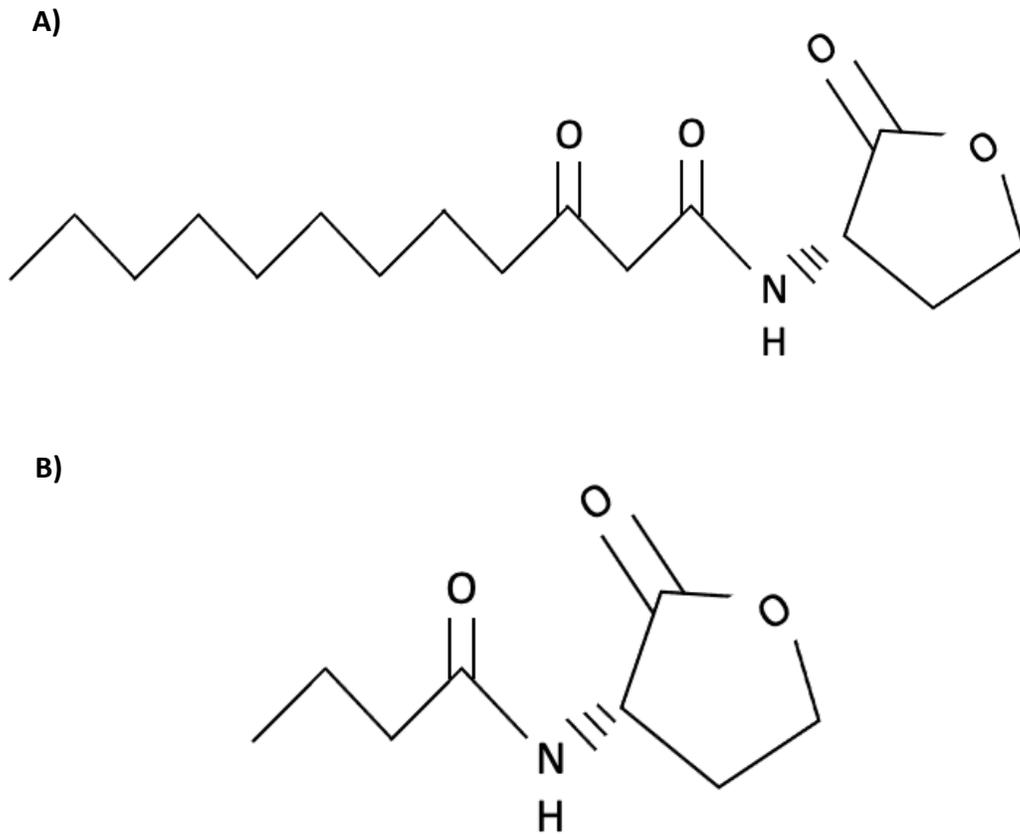
homoserín lactonas (AHLs) y en las bacterias Gram-positivas este mecanismo es mediado mediante péptidos pequeños (AIP) (Rojas, 2011) Las AHL (**Figura 9**) son moléculas que consisten de un anillo lactona hidrofílico y una cadena acilo hidrofóbica que puede consistir de diferentes longitudes. En *P. aeruginosa* han sido identificados dos circuitos de QS los cuales sintetizan las acilhomoserín lactonas N-3-oxo-dodecanoyl-homoserín lactona (3OC12-HSL) y N-butanoyl-L-homoserín lactona (C4-HLS) (Shah y col., 2019) (**Figura 10**).

Las moléculas autoinducidas del QS poseen propiedades químicas diversas y están relacionadas con el control de la expresión de genes que participan en la transferencia de plásmidos, bioluminiscencia y movilidad, en la expresión de factores de virulencia como proteasas, elastasas y pirocianina, en el movimiento bacteriano tipo swarming y la formación de biofilm (Diggle y col., 2007; Shah y col., 2019). En *P. aeruginosa* el QS es un importante sistema de regulación en el control de la patogenesis (Toyofuku y col., 2007). Aunado a la regulación de la virulencia por el sistema de QS se ha descrito que la adición exógena del autoinductor C4- HSL mejora la expresión de los genes del sistema MexAB-OprM de resistencia a quinolonas, lo que sugirió que el QS controla la expresión de genes de resistencia a antibióticos (Maseda y col., 2004)

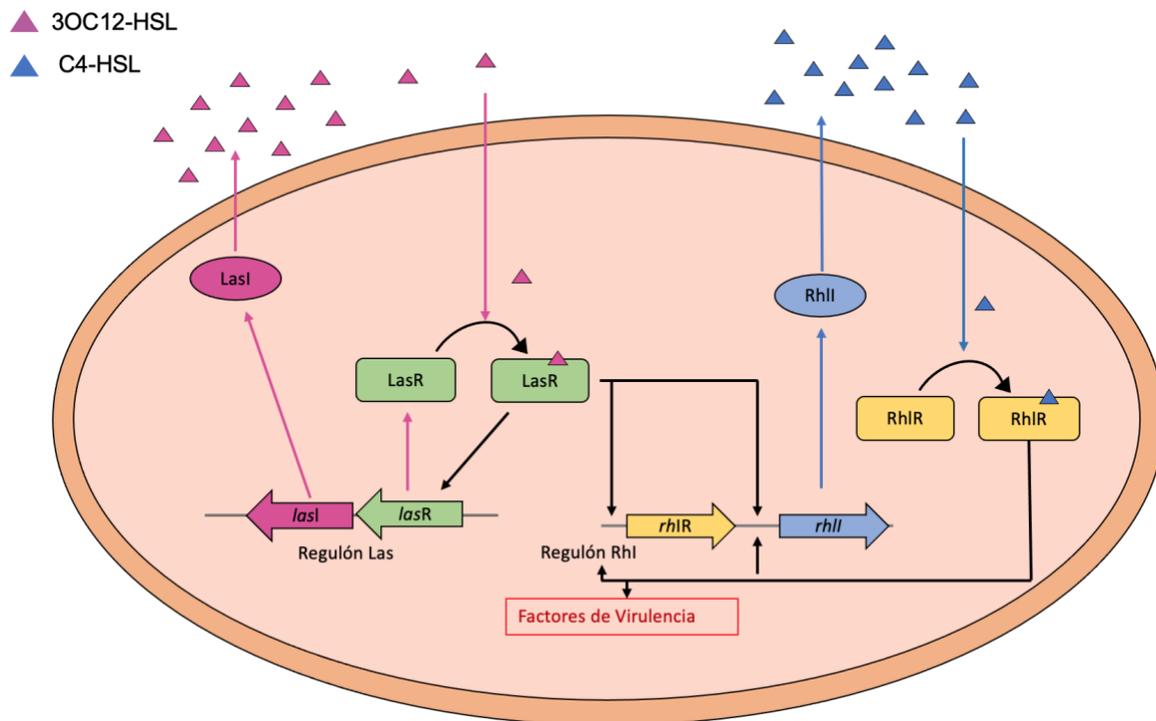
LasI produce el primer autoinductor (3OC12-HSL), el cual se une a LasR. El complejo autoinductor LasR puede activar una gran variedad de genes diana, entre los cuales se encuentra el gen *lasI*; tiene como característica de tener una retroalimentación positiva y con esto reactivar el primer circuito. LasR también activa la expresión de los genes *rhIR* y *rhII*, los cuales pertenecen al segundo circuito de QS. RhII sintetiza el segundo autoinductor (C4-HLS), el cual se acumula y se une a RhIR; reactivando la expresión de los genes *rhIR* y *rhII* y produciendo factores de virulencia (Waters y Bassler, 2005)(**Figura 11**).



**Figura 9. Estructura general de las acil homoserín lactonas (AHLs).** La cadena R-acilo (recuadro verde) puede variar de 4 a 18 átomos de carbono. Puede haber un grupo carbonilo o un grupo hidroxilo en el átomo C-3 y/o uno o más dobles enlaces en la cadena de acilo (Modificado de Foresto y Bogino, 2020).

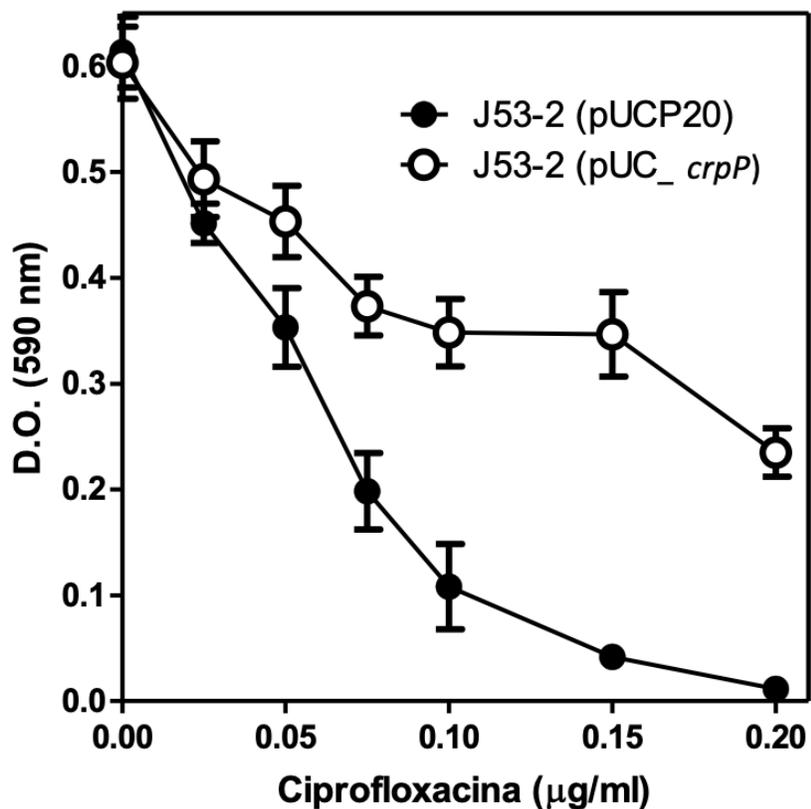


**Figura 10. Estructura de las acil homoserin lactonas del QS en *P. aeruginosa*.** Se muestran las estructuras de las AHL producidas por QS en *P. aeruginosa*. **(A)** El primer autoinductor producido es N-3-oxo-dodecanoyl-homoserin lactona (3-oxo-C12-HSL). **(B)** Se muestra el segundo autoinductor producido N-butanoyl-L-homoserin lactona (C4-HLS). (Modificado de Mayank y col., 2019).



**Figura 11. Mecanismo general del sistema de Quorum Sensing en *P. aeruginosa*.**

Se muestran los dos circuitos de QS en *P. aeruginosa*. El gen *lasR* y las proteínas receptoras que forman el complejo autoinductor LasR se muestra de color verde. El gen *lasI* y la proteína LasI que produce la primera AHL se muestran de color rosa. Las AHL 3-oxo-C12-HSL se muestran con triángulos de color rosa. El gen *lasR* y la proteína LasR se muestran de color verde. El gen *rhIR* junto con el complejo autoinductor RhIR se muestran de color amarillo. El gen *rhII* y la proteína RhII que produce la segunda AHL se muestran de color azul. Las AHL C4-HLS se muestran con triángulos de color azules. (Modificado de Waters y col., 2005)



**Figura 12. Resistencia a ciprofloxacin conferida por el producto del gen *crpP* del plásmido pUM505.** Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C y agitación constante. En círculo abierto se observa la resistencia conferida por el gen *crpP* en la cepa de *E. coli* J53-2 y en círculo cerrado se muestra la susceptibilidad de la cepa sin el gen (Tomado de Chávez- Jacobo, 2015).

### III. JUSTIFICACIÓN

La proteína CrpP confiere resistencia a ciprofloxacina, un antibiótico del grupo de las quinolonas. CrpP es codificada por el gen *crpP* que fue localizado en el plásmido conjugativo pUM505, aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* resistente a Ciprofloxacina y otras quinolonas. *P. aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente y es fuente de infecciones oportunistas en humanos. En *P. aeruginosa* múltiples factores de virulencia implicados en la infección aguda y daño de la célula huésped son regulados por los sistemas de Quorum sensing (QS) Las y Rhl. El QS un mecanismo de comunicación bacteriano que depende de la densidad celular y que modula la producción y liberación de moléculas (autoinductores) que alteran la expresión de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos. Por lo cual es de nuestro interés determinar si la resistencia a ciprofloxacina conferido por el gen *crpP* es modulado por el sistema QS.

### IV. HIPÓTESIS

La resistencia a ciprofloxacina conferida por el gen *crpP* es modulado por el sistema Quorum Sensing.

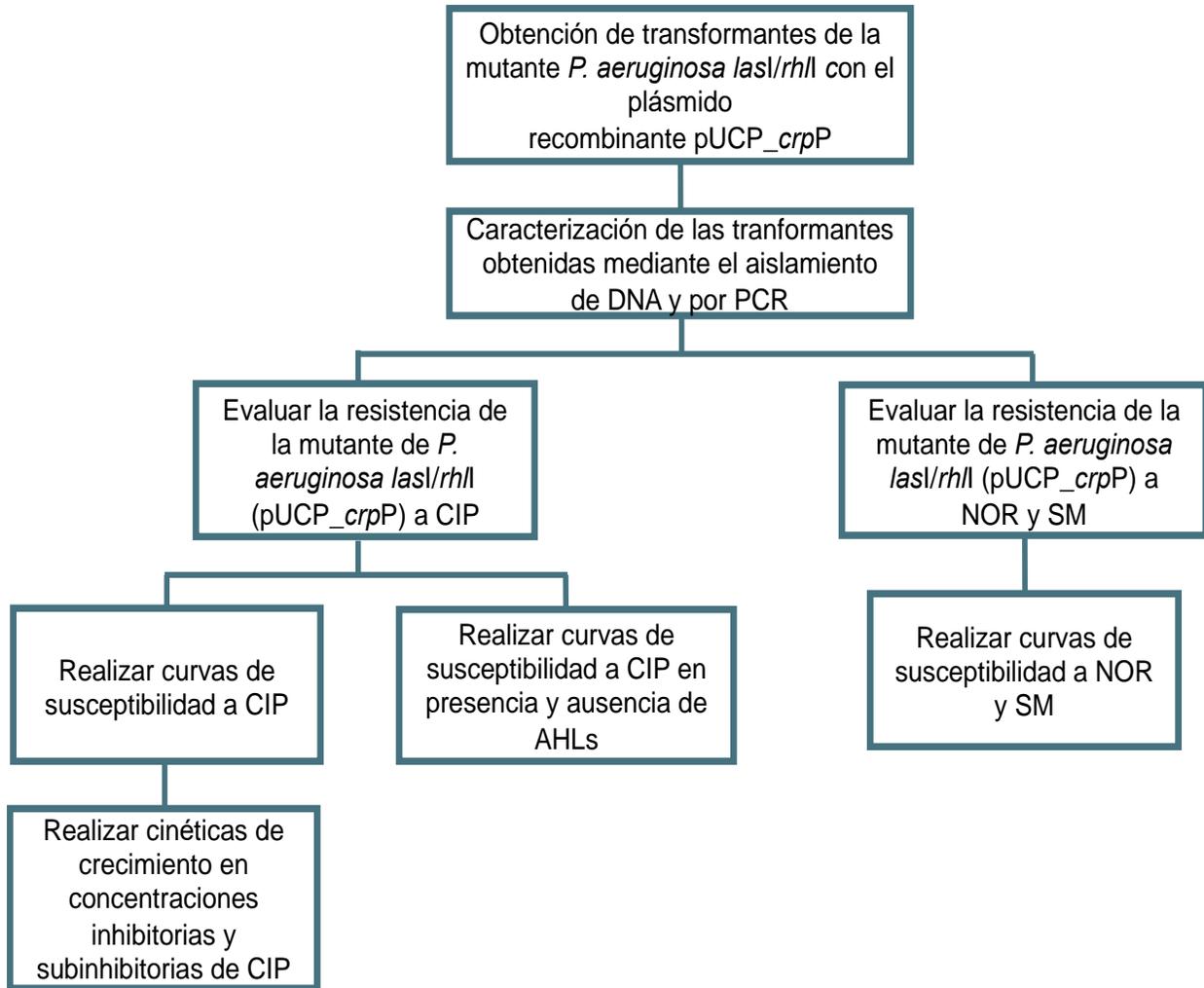
### V. OBJETIVO

Determinar si el mecanismo de resistencia a ciprofloxacina conferido por la proteína CrpP es dependiente del sistema de Quorum Sensing.

### VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la resistencia a ciprofloxacina en la mutante de *lasI/rhlI* transformada con el plásmido pUC\_*crpP*.
2. Determinar el efecto de la complementación química por adición exógena de AHL en la resistencia a ciprofloxacina de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUC\_*crpP*).
3. Determinar la expresión del gen *crpP* en la cepa de *P. aeruginosa* mutante en el sistema de QS.
4. Analizar la virulencia de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUC\_*crpP*).

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VIII. Materiales y Métodos

## 1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo o sus componentes fueron adquiridos de los laboratorios Bioxon de México S. A., Merck-México S. A. o Sigma Chemical Corporation.

- i. Caldo Luria Bertani (CL): NaCl (J. T. Baker) 1% peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5 %
- ii. Agar Luria Bertani (AL): al CL se le agregó 1.5 % de agar bacteriológico (Bioxon)
- iii. Caldo Nutritivo (CN): peptona de gelatina 0.5% y extracto de carne de res 0.3% (Bioxon)
- iv. Agar nutritivo (AN): al CN se le agregó 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon)

## 2. Cepas empleadas

- 1) *P. aeruginosa* PAO1 (Li y col., 2007): Cepa utilizada como control negativo en los ensayos de susceptibilidad a Cip.
- 2) *P. aeruginosa* PAO1 (pUC\_crpP): Cepa empleada como control.
- 3) Doble mutante *P. aeruginosa* PAO1 *lasI/rhII*: cepa empleada como control altamente sensible a Cip y como receptora del plásmido con el gen *crpP*.

## 3. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *P. aeruginosa lasI/rhII* se empleo el método adaptado de Enderle y Farwell, (1998), descrito a continuación:

Se crecieron los cultivos en placas de AL durante 18-24 h a 37°C. Posteriormente se transfirió una asada de células con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en un tubo eppendorf con 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Se resuspendieron las células en vórtex hasta formar una mezcla homogénea. Se centrifugó a 12000 rpm por 2 min, se desechó el sobrenadante. Al formarse una pastilla, se lavó dos veces con 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 500 µl de agua fría con glicerol al 10%.

#### **4. Transformación por el método de electroporación**

La transformación con DNA del plásmido recombinante pUCP\_crpP se realizó mediante el método de electroporación, que a continuación se describe:

A 100 µl de células competentes previamente preparadas se les adicionó 2 µl del plásmido pUCP\_crpP a una concentración aproximada de 40 ng/µl; la mezcla se colocó en una celda para electroporación 215 (Eppendorf) y se sometió a un pulso eléctrico de 1.8 kilovoltios. Se transfirió inmediatamente a un tubo con 2 ml de CL, se incubó por 1 h a 37°C con una agitación constante. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl del cultivo en placas de AL con 100 µg/ml, seleccionando así transformantes resistentes a carbenicilina.

#### **5. Aislamiento de DNA por lisis alcalina**

Se inoculó un tubo con 4 ml de CL con la cepa de interés, se incubó por 18 a 22 h a 37°C con una agitación constante. Después se centrifugó el cultivo durante 2 min a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante, se centrifugó el paquete celular en 100 µl de STE (Sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM a pH 8), en seguida se agregaron 20 µl de lisozima 20 mg/ml, se mezcló suavemente y se incubó durante 5 min a 37°C. Se adicionaron 250 µl de solución lítica (50 µl de NaOH 2 N, 100 µl de SDS 10 % y 850 µl de agua) y se colocó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se le adicionó 300 µl de una solución de acetato de potasio 3 M a un pH de 4.8, mezclándose e incubándose en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min; se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf, se agregaron 500 µl de una mezcla fenol-cloroformo (1:1), se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. La fase superior se transfirió a otro tubo eppendorf y se adicionó 1 ml de etanol absoluto, se mezcló y se incubó 20 min a – 80 °C, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. A la pastilla formada se realizaron 2 lavados con 1 ml de etanol al 70 % centrifugando a 12000 rpm durante 10 min por cada lavado. Se secó la pastilla al vacío y se resuspendió en 50 µl de HPLC, adicionando 5 µl de RNAsa incubando a 65°C durante 15 min. Se realizó un corrimiento electroforético a la muestra en un gel de agarosa al 1%.

## 6. Amplificación por PCR

Para la amplificación del gen *crpP* por PCR, se utilizó el DNA plásmidico de *P. aeruginosa* lasI/rhII (pUCP\_*crpP*) (~100 ng), que fue aislado mediante una lisis alcalina. Se realizó una mezcla del DNA (~100 ng), se utilizaron los oligonucleótidos directo y reverso del gen *crpP* (**Tabla 1**) a una concentración de 10 picomoles, 5 µl de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y un amortiguador de reacción a concentraciones optimizadas. La mezcla de reacción se llevó un volumen final de 10 µl. Se empleo el termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 2**.

## 7. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados por PCR se sometieron a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris acetato 40 mM y EDTA 1 mM). El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal, conteniendo el amortiguador. La muestra de la amplificación se mezcló con 2.5 µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5 %, sacarosa 40 %) y se colocaron en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder ( ) sometiéndose a una corriente constante de 120 voltios durante 30-45 min. Posteriormente, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01 % durante 5 min. Las bandas obtenidas se observaron en un tansiluminador de luz ultravioleta de onda corta (UV-Products Inc.) El marcador de tamaño molecular conocida que se utilizado fue de 1 Kb plus (Invitrogen).

## 8. Pruebas de susceptibilidad

Se promovió el desarrollo de las cepas adicionando 40 µl de un cultivo crecido a 37°C durante 18 a 22 h en tubos con 4 ml de CN con concentraciones crecientes de Cip, norfloxacin (NOR) y estreptomycin (SM). Los tubos se incubaron durante 18 a 20 h a

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en PCR**

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Orientación
OD-orf131	CAACATGATGAATTCTACCGGAAAC	Directo
OR-orf131	GAGAAATGAAGCTTGCGTTGTT	Reverso

**Tabla 2. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR del gen *crpP* en la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*)**

		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
Condiciones de Amplificación (30 ciclos)	Desnaturalización	95°C	30 seg
	Alineamiento	55°C	30 seg
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	5 min

37°C con agitación constante (220 rpm), la susceptibilidad se determinó en función de la absorbancia a 600 nm de los cultivos en un espectrofotómetro VELAB, VE-5100UV.

### **9. Cinéticas de crecimiento**

Se crecieron cultivos bacterianos de las cepas de interés en CN durante 18 a 20 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se determinó la  $DO_{600}$  del cultivo, se realizó una dilución para obtener 25 ml del cultivo con CN estéril hasta una  $DO_{600}$  de 0.3, los cultivos se incubaron a 37°C con una agitación constante, se midió la absorbancia por cada hora, durante 8 h. La medición de la absorbancia se realizó en el equipo de VELAB, VE-5100UV. Para la complementación química de la mutante de *P. aeruginosa* rhl/las transformada o no con el plásmido pUCP\_ crpP, los cultivos bacterianos fueron suplementados con 0.6  $\mu$ M de N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserina lactone (3-oxo-C12-AHL) (Sigma), posteriormente se midió la absorbancia por cada hora durante 8 h.

### **10. Ensayos de virulencia**

Los ensayos de virulencia se realizaron empleando el modelo de nemátodo *Caenorhabditis elegans* para lo cual se crecieron preinóculos de las cepas de interés, en medio M9 a 37°C toda la noche. Adicionalmente, se crecieron durante 5-6 días nematodos *C. elegans*, hasta alcanzar la edad adulta, en una placa con medio NGM (medio de crecimiento de nemátodos) a 18°C. En un placa de 96 pozos, se colocó 1.5  $\mu$ l de las cepas de interés y se llevó a un volumen final de 200  $\mu$ l con medio M9, en esterilidad se adiciono 18-20 nematodos por pocillo, se cuantificó a los nematodos vivos dando un ligero toque con un asa estéril y se incubó a 18°C durante 3 días, monitoreando la sobrevivencia de los nematodos cada 6 h, tomando como nematodos muertos aquellos que al tocarlos no tienen movimiento. Al final se graficó el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo en que fueron observados los nemátodos.

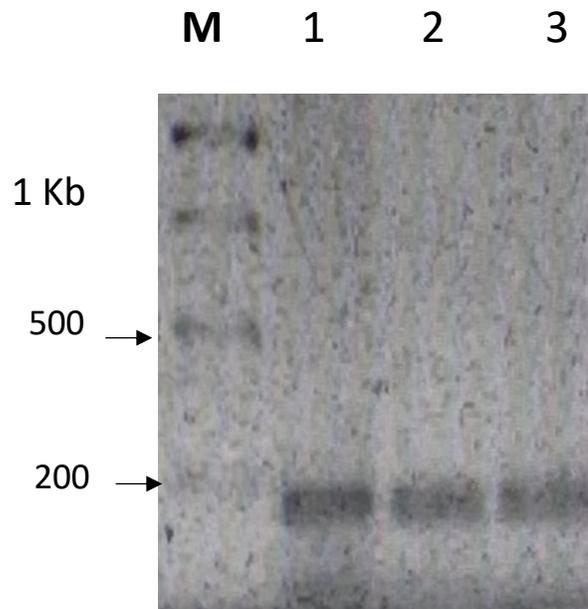
## IX. Resultados

### 1. Amplificación por PCR del gen *crpP* en la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*)

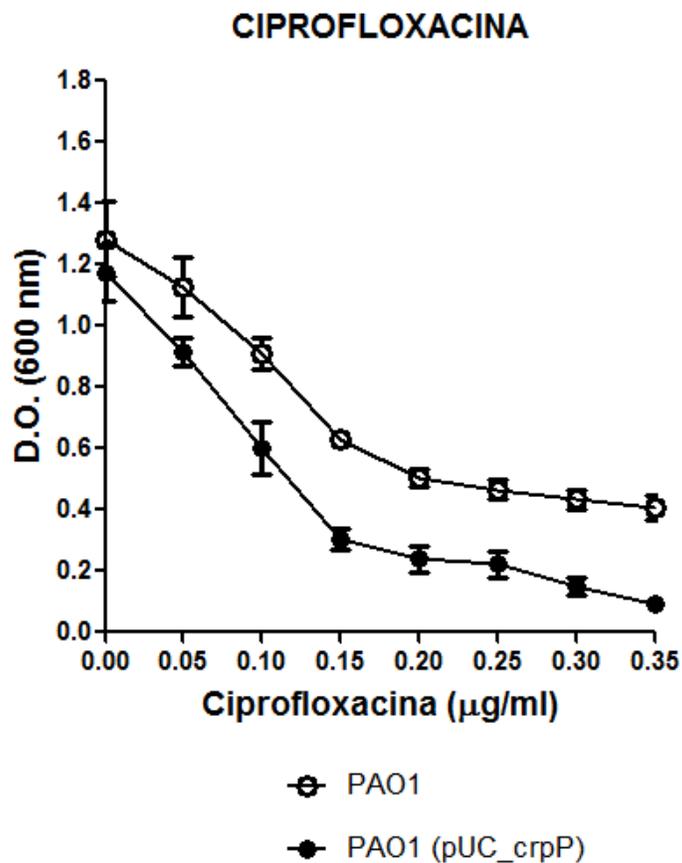
Primeramente, se llevo a cabo la purificación del DNA del plásmido pUCP\_ *crpP* el cual fue empleado para transformar células competentes de *P. aeruginosa lasI/rhII*, seleccionando transformantes resistentes a carbenicilina. Con el propósito de confirmar que las transformantes obtenidas poseen el plásmido pUCP\_ *crpP* se realizó la caracterización mediante la amplificación por PCR del DNA. Se aisló el DNA plasmídico por medio de una lisis alcalina de una de las transformantes de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*) y se amplificó el gen *crpP* utilizando los oligos directo y reverso correspondientes. Los productos amplificados se sometieron a corrimiento electroforético. En los carriles 1, 2 y 3 de la **Figura 13** se puede observar producto de amplificación del gen *crpP* de un tamaño aproximado de 230 pb, empleando el DNA plasmídico de las transformantes obtenidas de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*), con lo cual se comprobó la transferencia del plásmido.

### 2. Pruebas de susceptibilidad a CIP de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*)

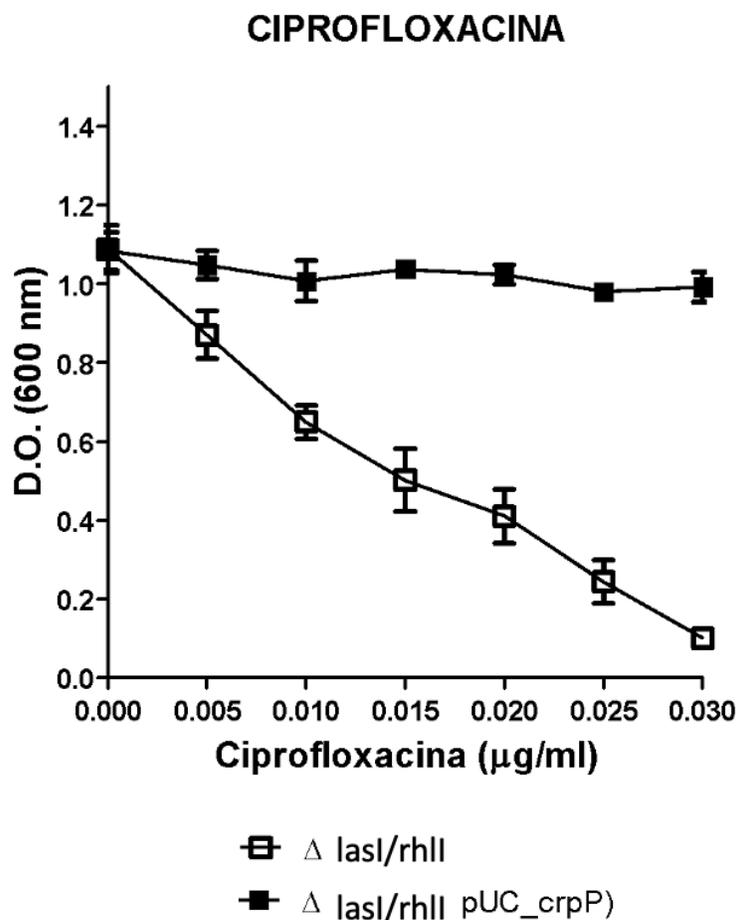
Una vez que se obtuvieron las transformantes, se realizaron pruebas de susceptibilidad para así evaluar el efecto del QS en la resistencia a Cip conferida por *crpP*. Se realizó una curva de susceptibilidad a concentraciones crecientes de Cip utilizando como cepa control a la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1; en ausencia y presencia de *crpP*. En la **Figura 14** se observa que la presencia del gen *crpP* no es capaz de incrementar la resistencia a Cip en este fondo genético, de hecho los resultados nos permiten apreciar que la transferencia del gen *crpP* aumenta ligeramente la sensibilidad de la bacteria a Cip. Posteriormente, se realizó una curva de susceptibilidad a Cip con la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* sin el gen y a la mutante del QS con el gen *crpP*. Los resultados mostraron que la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* con el gen *crpP* es resistente a Cip en



**Figura 13. Amplificación del gen *crpP* de la transformante de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUCP\_*crpP*).** Se muestra el corrimiento de por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se muestran los productos de amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos directo y reverso del gen *crpP*. Carril M: Marcador de 1 Kb; carriles 1, 2 y 3 transformantes de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUCP\_*crpP*). Las flechas señalan los tamaños en pb del marcador; así como de las bandas obtenidas en el PCR.



**Figura 14. Curva de susceptibilidad a Cip de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 en presencia y ausencia del gen *crpP*.** Los cultivos de las cepas de interés se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante. Se graficó las D.O. (600 nm) que fueron obtenidas a las concentraciones crecientes de Cip. Se muestra la cepa silvestre en ausencia del gen *crpP* (○) y la cepa silvestre en presencia del gen *crpP* (●). El ensayo se realizó con una N=3 (duplicado).



**Figura 15. Curva de susceptibilidad a Cip de *P. aeruginosa lasI/rhII* en presencia o ausencia del gen *crpP*.** Los cultivos de las cepas de interés se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante. Se graficó las D.O. (600 nm) que fueron obtenidas a las concentraciones crecientes de Cip. Se muestra a la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* en ausencia ( $\square$ ) y en presencia del gen *crpP* ( $\blacksquare$ ). El ensayo se realizó con una N=3 (duplicado).

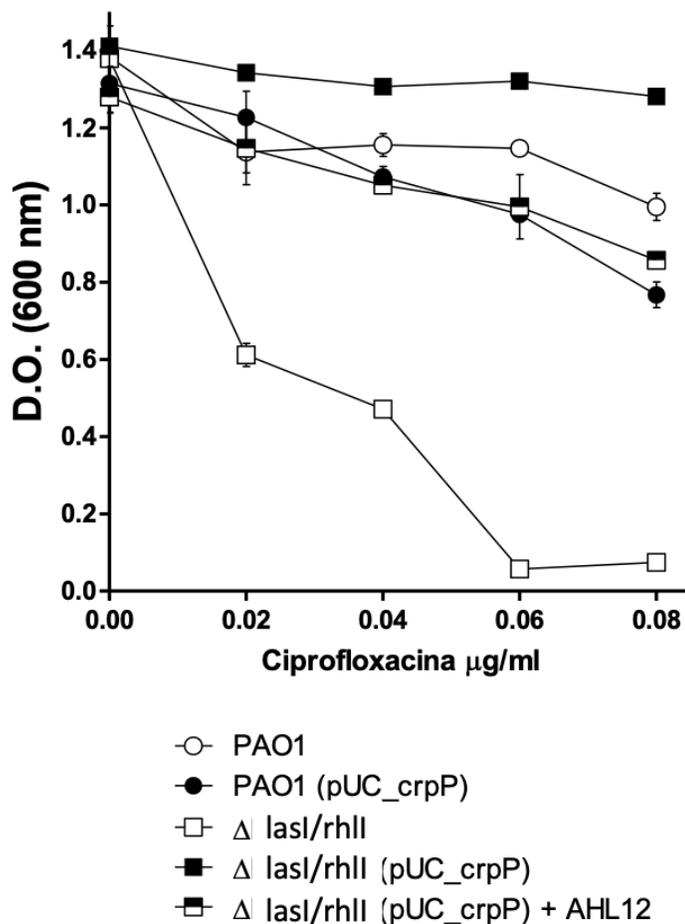
comparación con la cepa control la cual muestra falta de crecimiento en presencia del antibiótico (**Figura 15**). Este resultado sugiere fuertemente que la resistencia a Cip conferida por CrpP es dependiente del sistema de QS.

### **3. Efecto de la adición de AHL en la susceptibilidad a Cip de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*)**

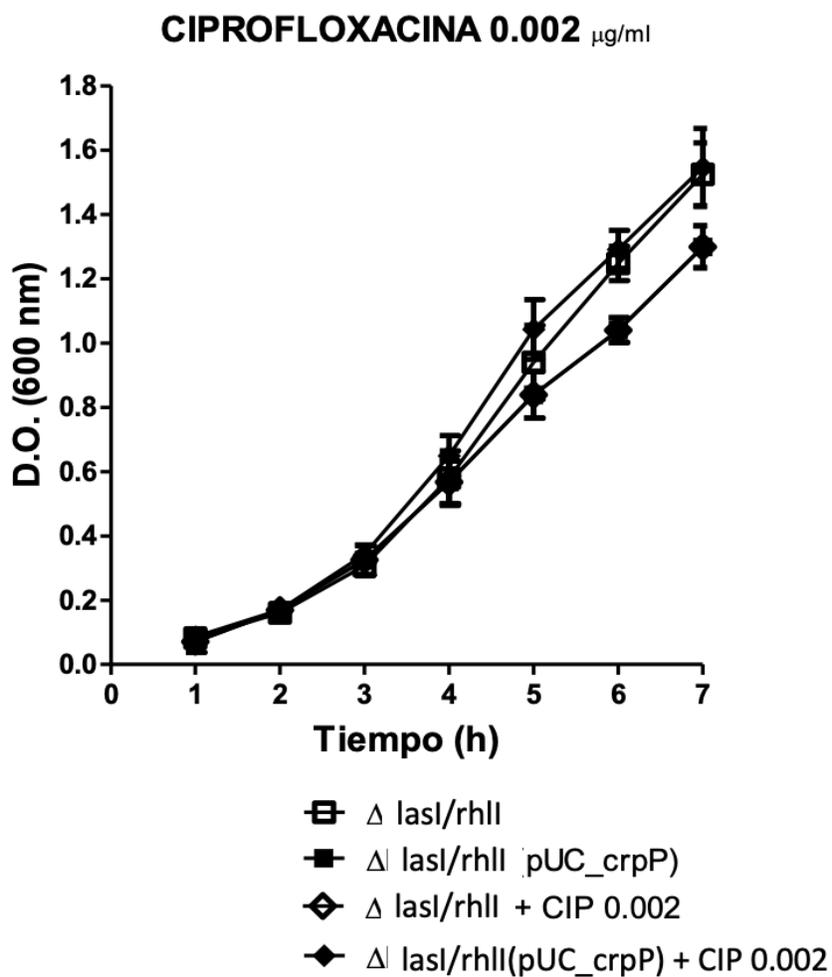
Con el propósito de evaluar la deficiencia del sistema de QS es responsable del incremento de la resistencia a Cip en la cepa *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*), se realizó la complementación química de la mutación mediante la adición de la AHL N-3-oxo-dodecanoyl-homoserín lactona (AHL12), para lo cual se realizó una curva de susceptibilidad en donde a *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*) se le adicionó el autoinductor de manera exógena. Los resultados mostraron que la adición de la AHL12 al cultivo de la cepa *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*) disminuyó el crecimiento de la cepa en comparación con el nivel de crecimiento observado para el cultivo de la cepa *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*) sin la adición del autoinductor (**Figura 16**). La adición de la AHL12 generó el crecimiento del cultivo similar al observado para *P. aeruginosa* PAO1 en presencia o ausencia del gen. Este resultado refuerza la hipótesis de que la resistencia a Cip conferida por CrpP es controlada por el sistema de QS y además sugiere que la regulación del sistema de resistencia conferido por CrpP es regulado negativamente por el QS.

### **4. Cinéticas de crecimiento de la transformante de *P. aeruginosa lasI/rhII*(pUCP\_ *crpP*) en presencia y ausencia de Cip**

Para determinar si la regulación por el sistema de QS de la resistencia a Cip conferido por CrpP es dependiente de la etapa de crecimiento bacteriano, se realizaron cinéticas de crecimiento de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con el gen *crpP* en presencia y ausencia de una concentración subinhibitoria Cip (0.002 µg/ml). Las cinéticas se realizaron en CN durante 8 h, midiendo la absorbancia del cultivo en lapsos de 1 hora. En la **Figura 17** se observa que el crecimiento de todas las cepas fue similar en ausencia



**Figura 16. Curva de susceptibilidad a CIP adicionando AHL en la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP).** Los cultivos se crecieron en CN durante 18-22 h a 37°C. Se midió la absorbancia a 600 nm. Cepa silvestre *P. aeruginosa* PAO1 (○), cepa silvestre en presencia del gen *crpP* (●), cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (□), *P. aeruginosa lasI/rhII* con *crpP* (■) y la cepa mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con AHL12 (◻). El ensayo se realizó con una N=3 (duplicado).

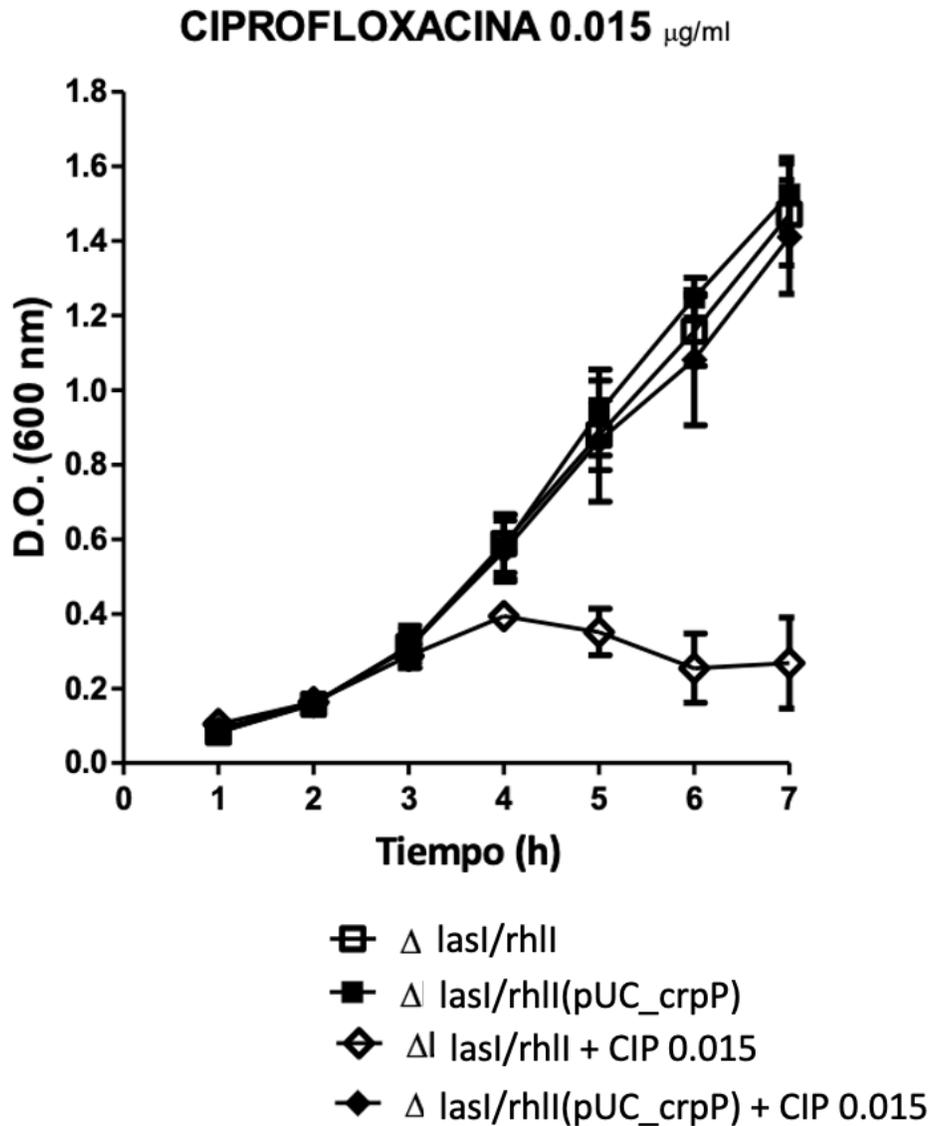


**Figura 17. Cinéticas de crecimiento en una concentración subinhibitoria de Cip de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ crpP).** Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante por los tiempos señalados y las concentraciones indicadas. Se midió la absorbancia a 600 nm. Cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (□), *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ crpP) (■), la cepa mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con CIP 0.002  $\mu\text{g/ml}$  (◇) y *P. aeruginosa lasI/rhII*(pUCP\_ crpP) con CIP 0.002  $\mu\text{g/ml}$  (◆).

y presencia de Cip. Aunado a esto, los resultados observados cuando se empleo una concentración inhibitoria de Cip (0.015 µg/ml) (**Figura 18**) mostrarón que el crecimiento de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* en presencia de Cip se vió afectado en a partir de las 4 horas de crecimiento en comparación con el crecimiento de las cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUC\_crpP) la cual mostró crecimiento parecido a las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con o sin el gen *crpP*. Este resultado confirmó que la resistencia a Cip conferida por el sistema conferido por el gen *crpP* es regulado por el sistema de QS. Además de que muestra que la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* no es capaz de alcanzar el crecimiento exponencial en presencia de Cip.

### **5. Pruebas de susceptibilidad a norfloxacin (Nor) de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP)**

Con el propósito de evaluar si la transferencia del gen *crpP* a la cepa mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* solo confiere resistencia a Cip o a otros antibióticos del grupo de las quinolonas, se evaluó la resistencia a norfloxacin (Nor) que es una quinolona de segunda generación. Se realizaron pruebas de susceptibilidad de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUC\_crpP) en la resistencia a Nor. Primeramente los resultados mostraron que en el fondo de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 el gen *crpP* no fue capaz de incrementar la resistencia a Nor, por el contrario la transferencia del gen incremento la sensibilidad de la bacteria a este antibiótico, resultado similar a lo observado para Cip (**Figura 19**). Sin embargo, la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP) mostro ser claramente resistente a Nor en comparación a la cepa mutante sin el gen *crpP* (**Figura 19**), sugiriendo que en ausencia de un sistema de QS funcional el gen *crpP* codifica a un mecanismo que además de conferir resistencia a Cip confiere resistencia a otras quinolonas.



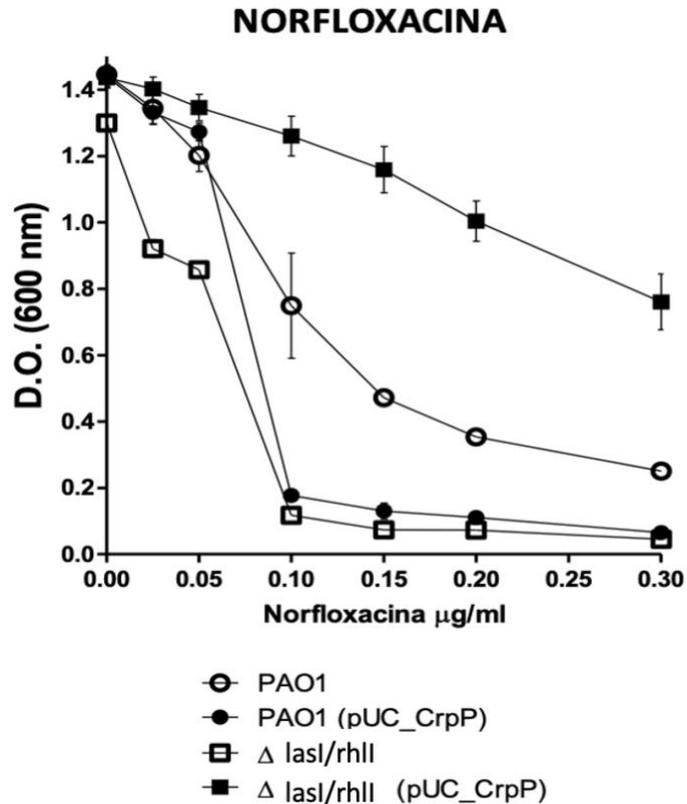
**Figura 18. Cinéticas de crecimiento en una concentración inhibitoria de Cip de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP).** Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante por los tiempos señalados y las concentraciones indicadas. Se midió la absorbancia a 600 nm. Cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (□), *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP) (■), la cepa mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con CIP 0.015  $\mu\text{g/ml}$  (◇) y *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP) con CIP 0.015  $\mu\text{g/ml}$  (◆).

## 6. Pruebas de susceptibilidad a estreptomicina (Sm) de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ *crpP*)

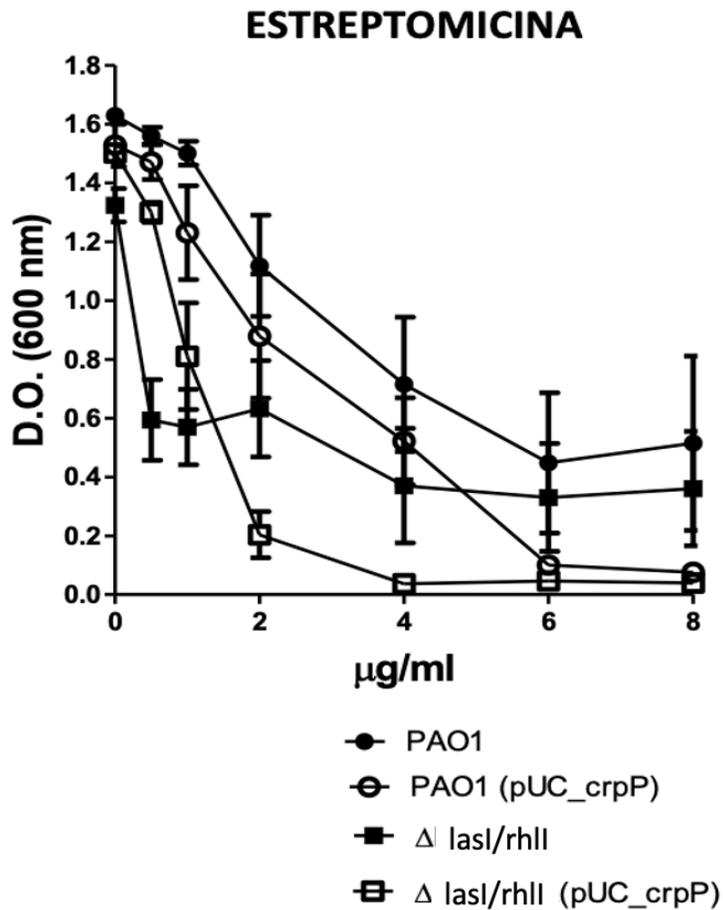
Con el propósito de evaluar si el gen *crpP* además de conferir resistencia a quinolonas es capaz de conferir resistencia a otro tipo de antibióticos en un fondo bacteriano deficiente del sistema de QS se evaluó la resistencia a estreptomicina. Se realizaron pruebas de susceptibilidad para evaluar el efecto de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con el gen *crpP* en la resistencia a estreptomicina (Sm), un aminoglucósido. Se realizó una curva de susceptibilidad a concentraciones crecientes de Sm utilizando como cepa control a la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1; en ausencia y presencia de *crpP* y con la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* sin el gen *crpP*. Los resultados mostraron que el gen *crpP* no es capaz de incrementar la resistencia a Sm en la cepa silvestre o en la mutante *P. aeruginosa lasI/rhII* (**Figura 20**). Lo que indica que el gen *crpP* solo participa en la resistencia a quinolonas en el fondo mutante de QS

## 7. CrpP modifica la virulencia de la mutante *P.aeruginosa lasI/rhII*

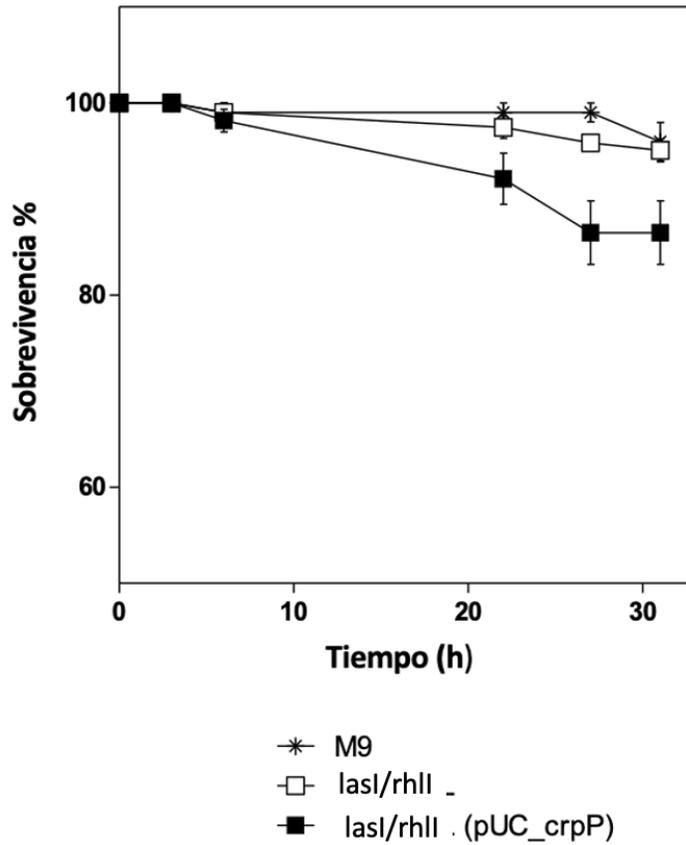
Debido a que la mutante *P. aeruginosa lasI/rhII* es deficiente en el sistema de QS, sistema que controla la expresión de genes que codifican a factores de virulencia ha sido reportado que esta mutante no es virulenta en comparación con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1. Con el propósito de evaluar la virulencia de la mutante de la mutante *P. aeruginosa lasI/rhII* en presencia y ausencia del gen *crpP*, se realizaron ensayos de virulencia empleando el modelo de *C. elegans*. Los resultados mostraron como se esperaba que la mutante *P. aeruginosa lasI/rhII* no disminuye la sobrevivencia de los nematodos, lo que indica que esta cepa no es virulenta (**Figura 21**). Sin embargo, la transferencia del gen *crpP* ligeramente incremento la virulencia de la bacteria al generar alrededor de un 10% de disminución de la sobrevivencia.



**Figura 19. Curva de susceptibilidad a Nor de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_ crpP).** Los cultivos se crecieron en CN durante 18-22 h a 37°C. Se graficó las D.O. (600 nm) que fueron obtenidas a las concentraciones crecientes de Nor. Se muestra la cepa silvestre *P. aeruginosa* PAO1 (○), cepa silvestre en presencia del gen *crpP* (●), cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (□) y la cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con *crpP* (■). El ensayo se realizó con una N=3 (duplicado).



**Figura 20. Curva de susceptibilidad a Sm en la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUCP\_crpP).** Los cultivos se crecieron en CN durante 18-22 h a 37°C. Se graficó las D.O. (600 nm) que fueron obtenidas a las concentraciones crecientes de Sm. Se muestra la cepa silvestre *P. aeruginosa* PAO1 (●), cepa silvestre en presencia del gen *crpP* (○), cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* (■) y la cepa de la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con *crpP* (□). El ensayo se realizó con una N=3 (duplicado).



**Figura 21. Virulencia de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhII* (pUC\_crpP).** Efecto de la transformante de *P. aeruginosa lasI/rhII* con el gen *crpP* sobre la viabilidad de *C. elegans*. Se incubaron grupos de 20 gusanos con  $1 \times 10^5 (\pm 1 \times 10^4)$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las cepas indicadas, como se describe en Métodos. Las mezclas se incubaron a 20°C y se determinó el número de gusanos vivos en los tiempos indicados. El ensayo se realizó con una N=3 (duplicado).

## X. DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo suelo y agua, así como en asociación con varios organismos vivos y es fuente de infecciones oportunistas en humanos (Ochoa y col., 2013).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud clasificó a *P. aeruginosa* como uno de los patógenos prioritarios contra los que es necesario, urgentemente, desarrollar nuevos antibióticos, puesto que se ha estimado que las infecciones causadas por bacterias resistentes podrían causar la muerte de más de 10 millones de personas en el año 2050. Esta bacteria posee múltiples factores de virulencia implicados en la infección aguda y daño de la célula huésped, además de que es capaz de adquirir genes que pueden contribuir en la resistencia e incrementar la virulencia, a través de la transferencia horizontal de genes, mediada por elementos genéticos móviles como plásmidos. Además, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar biopelículas (forma organizada de comunidades bacterianas) que incrementa la virulencia de la bacteria y contribuye al aumento de la resistencia a antibióticos, el incremento en la incidencia de resistencia a antibióticos por la formación de biopelículas ocasiona severas complicaciones terapéuticas y se ha asociado con falla en los tratamientos y la muerte (Wang y col., 2013).

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado en la ciudad de Morelia, Michoacán. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se identificó el gen *crpP*, el cual es capaz de conferir resistencia a ciprofloxacina, a través de un mecanismo enzimático de fosforilación dependiente de ATP, que favorece a la degradación del antibiótico. El gen *crpP* es codificado por el plásmido pUM505, aislado de un caso clínico de *P. aeruginosa* (Chávez y col., 2018). El producto de 65 aminoácidos codificado por *crpP* (*orf* 131) muestra un 18% de identidad de aminoácidos con una aminoglucósido acetiltransferasa de *Mycobacterium smegmatis*, esta enzima fosforila e inactiva los antibióticos aminoglucósidos. El gen *crpP* se encuentra ampliamente distribuido en aislados de origen clínico, y las proteínas homologas CrpP

posee los aminoácidos conservados como la Gly7, Asp9, Lys33 y Cys40. Al realizarse ensayos de mutación mediante fusión por PCR, se logró identificar que estos aminoácidos conservados en proteínas CrpP, desempeñan un papel esencial para el mecanismo enzimático. Además, se determinó que mutaciones en los codones que codifican a estos aminoácidos, no ejercen actividad catalítica, por lo que no son capaces de modificar la molécula de ciprofloxacina (Chávez-Jacobo y col., 2020).

En este trabajo exploramos si el sistema de QS regula la resistencia a Cip conferida por el gen *crpP* codificado en plásmido pUM505, evaluando los efectos del gen *crpP* en la doble mutante *lasI/rhII* de *P. aeruginosa*. Los resultados mostraron que la proteína CrpP al ser expresada en la mutante de *P. aeruginosa lasI/rhII* es capaz de incrementar la resistencia a Cip, contrario a lo observado en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 en donde incluso aumenta la susceptibilidad al antibiótico, lo que indica que la resistencia a Cip conferida por la proteína CrpP depende de QS, sugiriendo la regulación negativa sobre la expresión del gen *crpP*. Se ha descrito que QS controla la expresión de genes de virulencia en bacterias Gam-negativas y Gram-positivas y, en algunos casos, este fenómeno ha demostrado ser relevante para la virulencia bacteriana *in vivo* (Antunes y col., 2010). En *P. aeruginosa*, los sistemas QS tienen funciones importantes en algunos comportamientos fisiológicos y metabólicos, como la virulencia, la resistencia a los antibióticos, la motilidad y la formación de biopelículas (Hemati y col., 2014); y la formación de biopelículas no solo ayuda a las bacterias a sobrevivir en condiciones deficientes de nutrientes, sino que también las ayuda a resistir los antibióticos y los sistemas inmunitarios (Klausen y col., 2003). Curiosamente, además del mecanismo QS que promueve la maduración del biofilm (Antunes y col., 2010). Nuestros datos sugieren que la proteína CrpP codificada por plásmido pUM505 aislado de una cepa de *P. aeruginosa* de origen clínico, que confiere resistencia a Cip, puede ser regulada por QS, reforzando la idea de una correlación entre los sistemas QS y la resistencia a antibióticos.

Además, nuestros datos mostraron que la resistencia a Cip conferida por el gen *crpP* en el fondo mutante *lasI/rhII* de *P. aeruginosa* es independientemente de la fase de crecimiento bacteriano, lo que sugiere que la expresión de *crpP* está regulada por QS. En *P. aeruginosa* QS juega un papel clave en la modulación de la expresión de genes

de virulencia y los sistemas Las y Rhl regulan el tiempo y la producción de múltiples factores de virulencia, incluyendo elastasa, proteasa alcalina, exotoxina A, ramnolípidos, piocianina, lectinas y superoxidasa dismutasa (Antunes y col., 2010). Aunado a esto se observo que en ausencia de la regulación por QS la proteína CrpP también es capaz de conferir resistencia a Norf, otro antibiótico del grupo de las quinolonas. Interesantemente los datos sugieren que la resistencia conferida por *crpP* abarca únicamente a antibióticos del grupo de las quinolonas ya que la expresión de este gen no fue capaz de conferir resistencia a otros antibióticos como la Sm, un antibiótico del grupo de los amino glucósidos.

El sistema de resistencia codificado por el gen *crpP* solamente confiere resistencia a Cip en la cepa de *E. coli* J53-3, una cepa altamente sensible a quinolonas, sin embargo, no es capaz de conferir resistencia a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, sugiriendo que la función de la proteína CrpP puede ser regulada negativamente por algún componente o factor presente en la cepa silvestre. El hallazgo de la participación del gen *crpP* en la resistencia a Cip en la mutante de *P. aeruginosa* *lasI/RhlI*, sugiere que el QS es una de los componente que regula de manera negativa la función del sistema codificado por *crpP*.

La expresión del gen *crpP* en el fondo de la mutante de *P. aeruginosa* *rhlI/lasI* aumento la virulencia de la bacteria sobre el nematodo *C. elegans*. Desconocemos por que la presencia de la proteína CrpP conduce a este evento, sin embargo, esto pudiera estar asociado a que el gen codifica a un sistema capaz de conferir resistencia a Cip, lo que a su vez favorece la adaptación de la bacteria en condiciones adversas de crecimiento.

Varios sistemas QS basados en muchos patógenos bacterianos producen y liberan pequeñas señales químicas llamadas autoinductores comúnmente asociados con la regulación de genes que codifican la producción de factores de virulencia y la formación de biopelículas (Whitehead y col., 2001; Ng y Bassler, 2009; Deng y col., 2011; Pereira y col., 2013). En *P. aeruginosa*, el gen *lasI* sintetiza N-3-oxo-homoserina lactona (3-oxo-C12-AHL), una molécula señal de acil homoserina lactona (autoinductor), mientras que el gen *rhlI* sintetiza N-butirilhomoserina lactona (C4-AHL), una segundo autoinductor (Pearson y col.,1994). La complementación química mediante la adición del compuesto

3-oxo-C12-AHL a cultivos de *P. aeruginosa* *lasI* / *rhlI* (pUC\_crpP) fue capaz de disminuir la resistencia a Cip conferida por *crpP*, generando valores de crecimiento similares a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, lo que indica que los sistemas LasI y RhlI regulan la función de la proteína CrpP. Además, se ha descrito que en *P. aeruginosa* casi el 10% de los genes del genoma están regulados por QS y, por tanto, explica la mayoría de los procesos fisiológicos y fenotipos de virulencia y de formación de biopelícula (Schuster y Greenberg, 2006). En *P. aeruginosa*, mutantes en los genes *lasI* y *rhlI* revelaron que algunos genes responden dramáticamente bien a la adición exógena de 3-oxo-C12-AH (por ejemplo, *lasA*), aunque algunos genes se expresan de manera específica por la presencia de C4-AHL (por ejemplo, *rhlAB*), y algunos igualmente son regulados transcripcionalmente por ambas moléculas señal (Schuster y col., 2003; Schuster y Greenberg, 2006).

En resumen, hasta donde sabemos este trabajo describe por primera vez el papel del sistema de QS en la regulación de la resistencia a quinolonas conferida por la proteína CrpP codificado un plásmido aislado de *P. aeruginosa*, una bacteria patógena.

## **XI. CONCLUSIÓN**

El mecanismo de resistencia a Cip conferido por la proteína CrpP es modulado negativamente por el sistema de Quorum sensing.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldred, K. J., Kerns, R. J. y Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*. 53: 1565-1574.
2. Alekshun, M. N. y Levy, S. B. (1999). Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J Bacteriol* 181: 4669-4672.
3. Álvarez, H.D.A., Garza, M.G.S., Vázquez, L.R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chil Infectol*. 32(5):499-504.
4. Andersson, M. I. y MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother*. 51 Suppl 1: 1-11.
5. Andriole V. T. (2005). The quinolones: past, present and future. *Clin. Infect. Dis*. 41: 113-119.
6. Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M. y Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*. 156(8):2271–2282.
7. Ball, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J. Antimicrob. Chemother*. 46: 17-24.
8. Battle, S. E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V. L. y Hauser, R. (2008). Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J. Bacteriol*. 190: 7130-7140.
9. Bisacchi, G. S. y Mancherter, J. L. (2015). A new-class antibacterial-almost. Lessons in drug discovery and development: a critical analysis of more than 50 years of effort toward ATPase inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. *ACS Infect Dis* 1 (1): 4-41.
10. Bolon, M. K. (2011). The newer fluoroquinolones, *Med. Clin. North Am*. 95: 793-817.
11. Brighty, K. E. y Gootz, T. D. (2000). Chapter 2: Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. En Andriole V., T., ed. *The quinolones* 3rd ed. San Diego: Academic Press.

12. Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173-176.
13. Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 369-413.
14. Chávez, J.V.M., García, J.P., López, Y., Meza, C.V., Ramírez, D.M.I. (2020). Identification of essential residues for ciprofloxacin resistance of ciprofloxacin-modifying enzyme (CrpP) of pUM505. *Microbiology.* 166(4):367-374.
15. Chávez, J.V.M., Hernández, R.K.C., Romo, R.P., Pérez, G.R.V., Campos, G.J., Gutierrez, C.J.F., García, M.J.P., Meza, C. V., Silva, S.J., Ramírez, D.M.I. (2018). CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(6): 02629-17.
16. Davies D., Parsek M., Pearson J., Iglewski B., Costerton J. y Greenberg E. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilms. *Science.* 280: 295-298.
17. Davis, J. y Davis, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 417-433.
18. Deng, Y., Wu, J., Tao, F. y Zhang, L.H.(2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev.* 111:160–173.
19. Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Cámara, M. y Williams, P. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry and Biology.* 14(1):87–96.
20. Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A. y Zhao X. (2009). Quinolones: actions and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem.* 9: 981-998.
21. Emmerson, A. M. y Jones, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 13-20.
22. Ezelarab, H. A. A., Abbas, S. H., Hassan, H. A. y Abuo-Rahma, G. E. A. (2018) Recent updates of fluoroquinolone as antibacterial agents. *Arch Pharm* 351(9): 1-13.

23. Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F. y Martínez J. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*. 3: 1619.
24. Forterre, P. Gribaldo, S., Gabelle, D. y Serre, M. C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 89: 427-446.
25. Green S., Schroth M., Cho J., Kominod S. y Vitanza-jack V. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 28: 978-991.
26. Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A. H. y Sorensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3332-3337.
27. Hardalo, C., Edberg, S.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* 23(1):47-75.
28. Hemati, S., Azizi-Jalilian, F., Pakzad, I., Taherikalani, M., Maleki, A., Karimi, S., Monjezei, A., Mahdavi, Z., Fadavi, M. R., Sayehmiri, K. y Sadeghifard, N. (2014). The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol.* 6(3):133-9.
29. Hernández, A., Sánchez M. B. y Martínez J. L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Frontiers in Microbiology.* 2, 22.
30. Holloway, B. W., Krishnapillai, V. y Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43: 73-102.
31. Hooper, D. C. (2005). Efflux Pumps and Nosocomial Antibiotic Resistance: A Primer for Hospital Epidemiologists. *Healthcare Epidemiology.* 40:1811-1817.
32. Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 2: 120-126.
33. Khodursky, A. B. y Cozzarelli N. R. (1998). The mechanism of inhibition of Topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* 273: 27668-27677.
34. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes- Jørgensen, A. y Molin S. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48:1511–1524.

35. Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K. E., Fisher, L. M. y Sanderson, M. R. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 667-669.
36. Leo, E., Gould, K., Pan, S., Capranico, G., Sanderson, M., Palumbo, M. y Fisher, L. M. (2005). Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV and gyrase are clustered at the DNA breakage site. *J Biol Chem* 280: 14252-14263.
37. Leshner, G. Y., Froelich, E. J. Gruett, M. D., Bailey, J. H. y Brundage R. P. (1962). 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1063-1068.
38. Li, J., Heying, Z., Jianan, N., Abdul, S., Guyue, C., Zonghui, Y., y Haihong, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 8:44.
39. Martínez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276: 2521-2530.
40. Maseda, H., Sawada I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae T., y Nomura, N. (2004). Enhancement of the *mexAB-OprM* Efflux Pump Expression by a Quorum-Sensing Autoinducer and Its Cancellation by a Regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* Efflux Pump Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(4):1320–28.
41. Ng, W. L. y Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet.* 43:197–222.
42. Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., y Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México.* 70(2):136-150.
43. Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276: 139-144.
44. Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(1):197-201.

45. Pendleton, J. N., Gorman S. P. y Gilmore B. F. (2013). Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11(3):297–308.
46. Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB (2013) AI-2-mediated signaling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37:156–181.
47. Peterson, L. R. (2001). Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin. Infect Dis.* 33: 180- 186.
48. Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4: 629-636.
49. Poirel, L., Cattoir, V. y Nordmann, P. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance: interactions between human, animal, and environment ecologies. *Front Microbiol* 3: 1-7.
50. Ramírez-Díaz, M. I., Diaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. y Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal genes. *Plasmid.* 66: 7-18.
51. Redgrave, S. L., Sutton, B. S., Webber, A. M. y Piddock, J. L. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 22: 438-445.
52. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Buch, K. y Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside-acetyltransferase. *Nat. Med.* 12: 83-88.
53. Rojas, M. M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 13(2): 135-143.
54. Salah, F.D., Soubeiga, S.T., Ouattara, A.K., Sadji, A.Y., Metuor-Dabire, A., Obiri-Yeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., Simpore, J. (2019). Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in *ESBL*-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Antimicrob Resist Infect Control.* 8:14.
55. Schuster M, Greenberg EP (2006) A network of networks: quorum sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296:73–81.

56. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg E. P.(2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum- controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol.* 185:2066–2079.
57. Sousa, A. M. y Pereira, M. O. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs. *Pathogens* 3:680–703.
58. Stover C., Pham X., Erwin A., Mizoguchi S., Warrenner P., Hickey M., Brinckman F., Hufnagle W., Kowalik D. y Lagrou M. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406: 959-964.
59. Toyofuku, M., Nobuhiko N., Tatsuya F., Naoki T., Hideaki M., Isao S., Toshiaki N. y Hiroo U. (2007). Quorum Sensing Regulates Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology.* 189(13):4969–72.
60. Tran, J. H. y Jacoby G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 5638-5642.
61. Vetting, M. W., Hegde, S. S., Fajardo, J. E., Fiser, A., Roderick, S. L., Takiff, H. E. y Blanchard, J. S. (2006). The pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45: 1-10.
62. Wang, H., Dzink-Fox. J. L., Chen, M. y Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1515-1521.
63. Wang, H., Faping T., Zhihong G., Xianghong L. y Weihua C. (2013). Antibiotic Resistance Profiles and Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Microbiology.* 53(2):163–67.
64. Waters, M. W. y Bassler, B. L. (2005). Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 21:319–46.
65. Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*25:365–404.
66. Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. y Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolones efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolated. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 3354-3360.

67. Yoshida, T., Yamamoto, Y., Orita, H. (1996) Studies on quinolone antibacterials. IV. Structure activity relationships of antibacterial activity and site effects for 5- or 8-substituted and 5,8-disubstituted-7(3-amino-1-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Chem. Pharm. Bull.* 44: 1074-1085.