



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DEL PLÁSMIDO pUM505 IMPLICADOS  
EN LA RESISTENCIA A QUINOLONAS”**

**TESIS**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

**Q.F.B. Víctor Manuel Chávez Jacobo**

Asesora:

**Doctora en Ciencias en Biología en Biología Experimental Martha Isela Ramírez Díaz**

Co-asesor:

**Doctor en Ciencias Bioquímicas Carlos Cervantes Vega**

**Morelia, Mich; Enero del 2015**

## A. RESUMEN

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, posee un tamaño de 123 kilobases y cuenta con 138 marcos de lectura abiertos (ORF). Un análisis *in silico* reveló que el plásmido no posee genes de resistencia a antibióticos reportados hasta la fecha; sin embargo, al ser transferido a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se encontró que pUM505 confiere resistencia a ciprofloxacina (Cp), un antibiótico de la familia de las quinolonas empleado en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria. Para tratar de identificar los determinantes responsables de la resistencia a Cp, se seleccionó un grupo de genes (*orf35*, *orf36* y *orf37*) de pUM505 que probablemente codifican un sistema de expulsión tripartita. Se encontró que estos genes confieren resistencia a Cp únicamente cuando se transfieren a la cepa de *Escherichia coli* J53-2, lo cual sugiere que se trata de genes adicionales los responsables de la resistencia en *P. aeruginosa*. El objetivo del presente trabajo es identificar genes de pUM505 implicados en la resistencia a Cp. Inicialmente el plásmido fue transferido a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1SR para la generación de un banco de mutantes por transposición al azar. Se seleccionaron mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp<sup>S</sup>) y resistentes a gentamicina y estreptomina. De un total de 12,000 mutantes probadas, se obtuvieron 12 mutantes Cp<sup>S</sup> y empleando pruebas de susceptibilidad a Cp se dividieron en sensibles e hipersensibles. Mediante secuenciación se determinó que en las mutantes sensibles se encuentra interrumpido un probable operón formado por los *orf57*, *orf58* y *orf59*, mientras que en las mutantes hipersensibles está interrumpido un probable operón formado por los *orf85*, *orf86* y *orf87*. La complementación de la mutante afectada en el *orf57* con el gen silvestre condujo a la recuperación del fenotipo de resistencia a Cp confirmó la relación de este gen con el fenotipo de pUM505. Un análisis *in silico* reveló que el *orf131* tiene similitud con una aminoglucósido fosfotransferasa, por lo que este gen se clonó y transfirió a cepas de *E. coli* J53, J53-2 y *P. aeruginosa* PAO1. Se determinó que el *orf131* confiere resistencia a Cp en J53-2 mientras que en las cepas J53 y PAO1 confiere susceptibilidad a Cp y a la quinolona levofloxacina. Finalmente, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se determinó que el *orf131* causa una modificación química en la molécula de Cp, lo cual probablemente inactiva al antibiótico y origina la resistencia.

**Palabras clave:** Plásmido, resistencia a quinolonas, recombinasa y fosfotransferasa.

## B. ABSTRACT

The pUM505 plasmid was isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*; it has a length of 123 kilobases and contains 138 coding regions. DNA sequence analysis revealed that pUM505 lacks antibiotic resistance genes reported to date; however, when the plasmid was transferred to the *P. aeruginosa* PAO1 standard strain, conferred resistance to ciprofloxacin (Cp), an antibiotic of the quinolone family, which is used in the treatment of infections caused by *Pseudomonas*. In an attempt to identify the determinants responsible for resistance to Cp, a group of genes from pUM505 was selected (*orf35*, *orf36* and *orf37*) because it probably encodes a tripartite efflux system. It was found that these genes confers Cp resistance only when they were transferred to the *Escherichia coli* J53-2 strain, suggesting that Cp resistance in *P. aeruginosa* is caused by additional pUM505 genes. The aim of this study is identify genes of pUM505 involved in Cp resistance. Initially, the plasmid was transferred to the *P. aeruginosa* PAO1SR strain for the setting-up of a mutant bank by random transposition. Mutants were selected by ciprofloxacin sensitive (Cp<sup>S</sup>), gentamycin and streptomycin resistance. From a total of 12,000 clones tested, 12 Cp<sup>S</sup> mutants were obtained, and using susceptibility tests to Cp. The mutants were divided into sensitive and hypersensitive. By DNA sequencing, it was determined that in sensitive mutants a probable operon form by *orf57*, *orf58* and *orf59* was disrupted, while in hypersensitive mutants was disrupted a probable operon form by *orf85*, *orf86* and *orf87*. Complementation of the *orf57* affected mutant with the wild type gene lead to recovery of the Cp resistance phenotype, which confirmed the relation of this gene with the Cp<sup>R</sup> phenotype of pUM505. Additionally, an *in silico* analysis showed that the *orf131* has similarity with an aminoglycoside phosphotransferase. Because of this, the *orf131* gene was cloned and transferred to *E coli* J53, J53-2 and *P. aeruginosa* PAO1 strains. It was found that the *orf131* confers Cp resistance in J53-2, while in J53 and PAO1 confers sensitivity to Cp and levofloxacin, another quinolone. Finally, by using high performance liquid chromatography (HPLC), it was determined that the *orf131* causes a chemical modification of the Cp molecule, which probably inactivates the antibiotic and originates the resistance.

**Key words:** Plasmid, quinolone resistance, recombinase and phosphotransferase.

## C. ÍNDICE

A. RESUMEN.....	I
B. ABSTRACT.....	II
C. ÍNDICE.....	III
D. ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
E. ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Historia de las quinolonas.....	1
2. Estructura de las quinolonas.....	4
3. Clasificación de las quinolonas.....	5
3.1. Primera generación.....	6
3.2. Segunda generación.....	6
3.3. Tercera generación.....	6
3.4. Cuarta generación.....	8
4. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	8
5. Resistencia bacteriana a quinolonas.....	13
5.1. Modificación de las moléculas blanco.....	14
5.2. Regulación de la expresión de porinas.....	16
5.3. Sistemas de expulsión codificados por genes cromosómicos.....	16
5.4. Proteínas Qnr.....	18
5.5. Sistemas de expulsión codificados por genes plasmídicos.....	19
5.6. Modificación enzimática.....	20
II. ANTECEDENTES.....	21
III. JUSTIFICACIÓN.....	27
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. OBJETIVOS.....	28
A) Objetivo general.....	28
B) Objetivos particulares.....	28
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Medios de cultivo.....	30
2. Cepas empleadas.....	30
3. Plásmidos empleados.....	31

4. Oligonucleótidos empleados.....	34
5. Conjugación en medio líquido.....	34
6. Mutagénesis por transposición al azar.....	37
7. Pruebas de susceptibilidad en medio sólido.....	37
8. Pruebas de susceptibilidad en medio líquido.....	38
9. Purificación de DNA total.....	38
10. Secuenciación.....	39
11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
12. Electroforesis en geles de agarosa.....	40
13. Purificación de DNA en geles de agarosa.....	41
14. Tratamientos enzimáticos.....	41
14.1. Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt.....	41
14.2. Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20.....	42
14.3. Restricción con endonucleasas.....	42
14.4. Desfosforilación.....	42
15. Aislamiento de DNA plasmídico mediante lisis alcalina.....	42
16. Transformación con plásmidos recombinantes.....	43
16.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	44
16.2. Preparación de células competentes de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> .....	44
16.3. Transformación por el método de electroporación.....	44
17. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	45
VIII. RESULTADOS.....	46
1. Transferencia del plásmido pUM505 a la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1SR.....	46
2. Obtención de mutantes sensibles a ciprofloxacina.....	46
3. Selección de mutantes sensibles a ciprofloxacina.....	49
4. Susceptibilidad a ciprofloxacina en medio líquido.....	49
5. Amplificación del transposón <i>Himar1::Gm<sup>R</sup></i> mediante PCR.....	50
6. Identificación de los genes interrumpidos por el transposón <i>Himar1::Gm<sup>R</sup></i> en las mutantes Cp <sup>S</sup> .....	53
7. Análisis <i>in silico</i> de los genes interrumpidos en las mutantes Cp <sup>S</sup> .....	53
8. Clonación del gen <i>xerC</i> del plásmido pUM505.....	56
9. Subclonación del gen <i>xerC</i> en el vector pUCP20.....	57
10. Pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina en las mutante Cp <sup>S</sup> complementada.....	57
11. Análisis del <i>orf131</i> del plásmido pUM505.....	60

12. Clonación del <i>orf131</i> del plásmido pUM505.....	63
12.1. Clonación del <i>orf131</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	63
12.2. Subclonación en el vector pUCP20.....	63
13. Pruebas de susceptibilidad a quinolonas de las transformantes con el <i>orf131</i> .....	66
14. Modificación química de ciprofloxacina inducida por el producto del <i>orf131</i> .....	68
IX. DISCUSIÓN.....	74
X. CONCLUSIÓN.....	88
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	89

## D. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Síntesis de la primera quinolona.....	2
<b>Figura 2.</b>	Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente.....	3
<b>Figura 3.</b>	Primera y segunda generación de quinolonas.....	7
<b>Figura 4.</b>	Tercera y cuarta generación de quinolonas.....	9
<b>Figura 5.</b>	Acción de las topoisomerasas tipo IIA en el DNA.....	10
<b>Figura 6.</b>	Representación esquemática de la acción de las quinolonas.....	12
<b>Figura 7.</b>	Resistencia bacteriana a quinolonas.....	15
<b>Figura 8.</b>	Mapa genético del plásmido pUM505.....	23
<b>Figura 9.</b>	Resistencia a ciprofloxacina conferida por el plásmido (pUM505).....	25
<b>Figura 10.</b>	Susceptibilidad a ciprofloxacina de PAO1 (pUC_Orf35-37) y J53-2 (pUC_Orf35-37).....	26
<b>Figura 11.</b>	Mapa del vector pJET 1.2/Blunt.....	32
<b>Figura 12.</b>	Mapa del vector de expresión binaria pUCP20.....	33
<b>Figura 13.</b>	Mapa del plásmido pFAC.....	35
<b>Figura 14.</b>	Amplificación mediante PCR de los genes <i>merA</i> y <i>chrA</i> .....	47
<b>Figura 15.</b>	Susceptibilidad a ciprofloxacina y cromato de <i>P aeruginosa</i> PAO1SR y PAO1SR (pUM505).....	48
<b>Figura 16.</b>	Susceptibilidad a ciprofloxacina de las mutantes Cp <sup>S</sup> .....	51
<b>Figura 17.</b>	Amplificación del transposón Himar1::Gm <sup>R</sup> .....	52
<b>Figura 18.</b>	Posición de los genes identificados en el mapa genético del plásmido pUM505.....	54
<b>Figura 19.</b>	Clonación del gen <i>xerC</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	58
<b>Figura 20.</b>	Subclonación del gen <i>xerC</i> en el vector pUCP20.....	59
<b>Figura 21.</b>	Susceptibilidad a ciprofloxacina de la mutante Cp <sup>S</sup> <i>xerC</i> <sup>-</sup> complementada con el gen <i>xerC</i> de pUM505.....	61
<b>Figura 22.</b>	Alineamiento de la secuencia de la proteína codificada por el <i>orf131</i> con la enzima aminoglucósido fosfotransferasa de <i>P. aeruginosa</i> M18.....	64
<b>Figura 23.</b>	Clonación del <i>orf131</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	65
<b>Figura 24.</b>	Subclonación del gen <i>orf131</i> en el vector pUCP20.....	67
<b>Figura 25.</b>	Susceptibilidad a ciprofloxacina de las transformantes con el plásmido pUC_orf131.....	69
<b>Figura 26.</b>	Susceptibilidad a levofloxacina de las transformantes con el plásmido	

	pUC_orf131.....	70
<b>Figura 27.</b>	Cromatogramas de la HPLC de extractos de las cepas de E. coli J53-2 (pUC_orf131) y J53-2 (pUCP20).....	72
<b>Figura 28.</b>	Área bajo la curva.....	73
<b>Figura 29.</b>	Probable mecanismo de acción de la recombinasa XerC codificada por el plásmido pUM505.....	79
<b>Figura 30.</b>	Modelo del probable mecanismo de acción del Orf131 en las cepas de E. coli J53-2 (pUC_orf131) y J53 (pUC_orf131).....	87

## E. ÍNDICE DE TABLAS

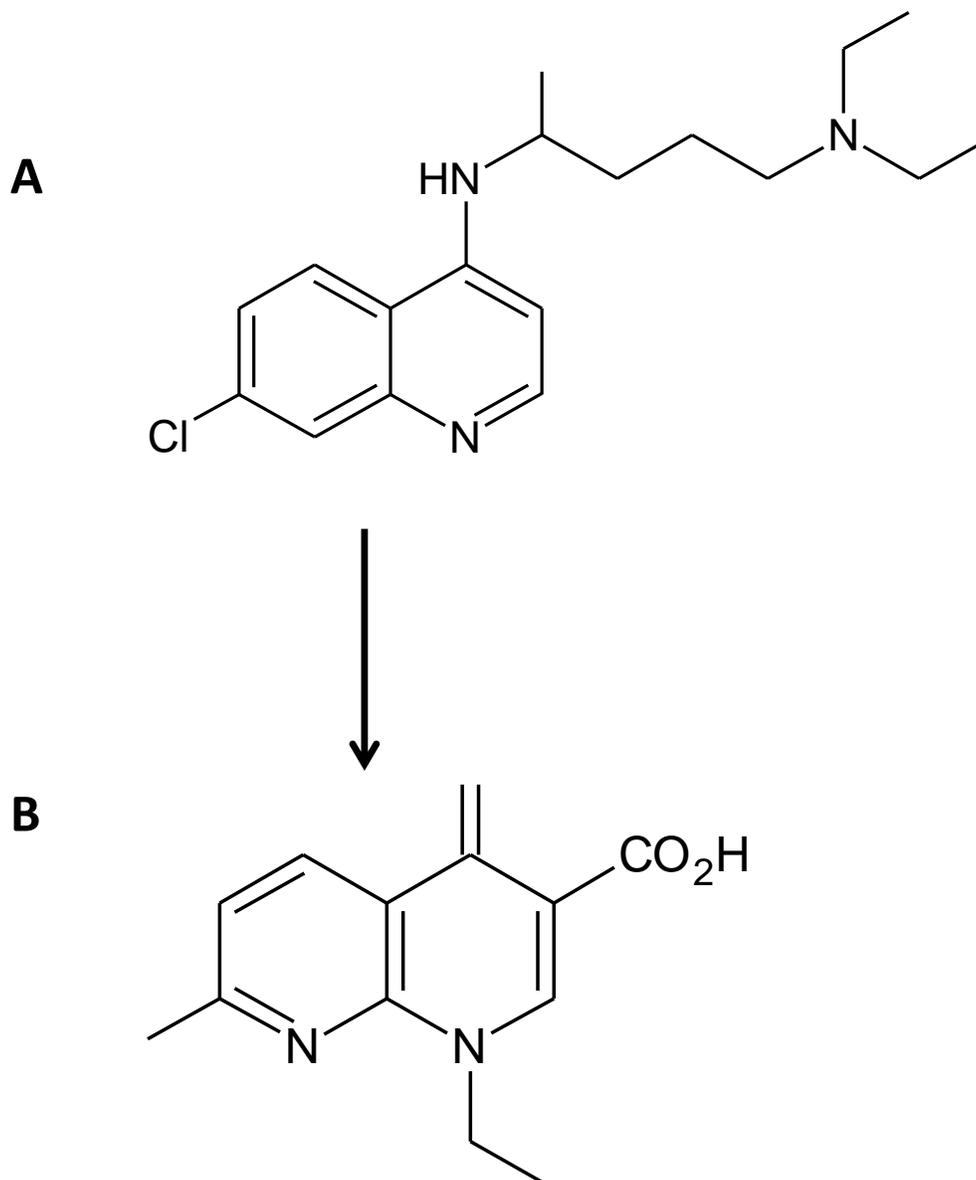
<b>Tabla 1.</b>	Oligonucleótidos empleados.....	36
<b>Tabla 2.</b>	Funciones predichas para los productos de los genes interrumpidos en las mutantes Cp <sup>S</sup> .....	55
<b>Tabla 3.</b>	Análisis <i>in silico</i> de la proteína codificada por el <i>orf131</i> .....	62

## I. INTRODUCCIÓN

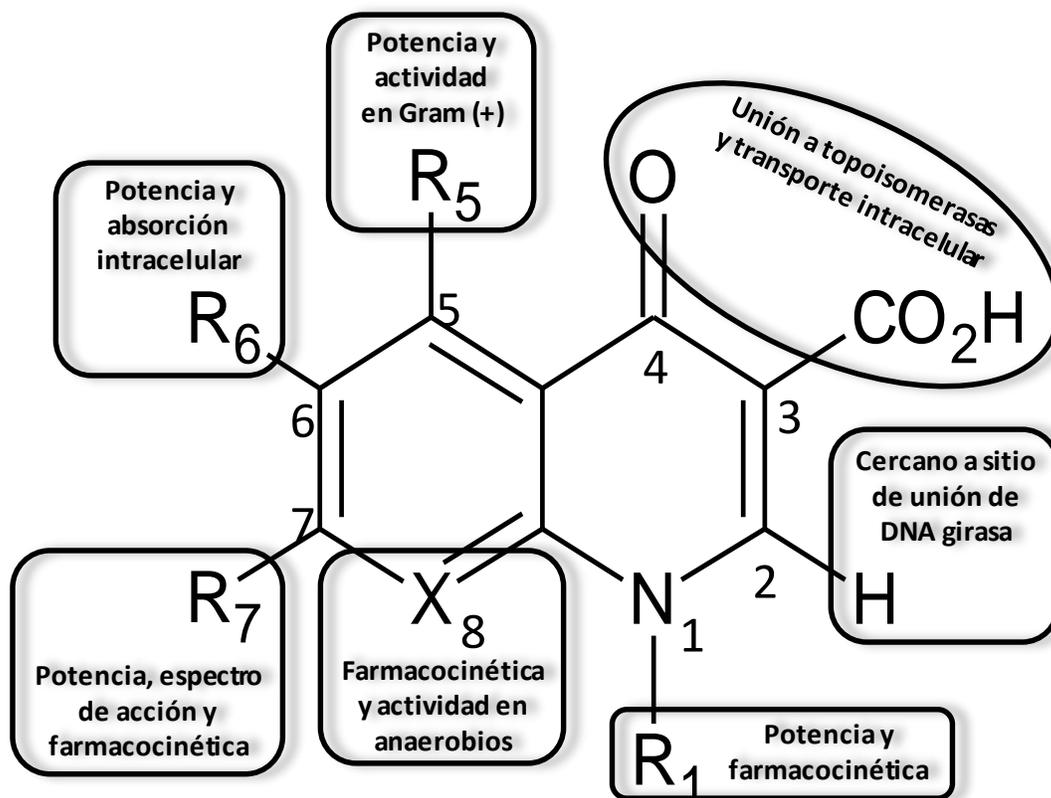
### 1. Historia de las quinolonas

El término quinolonas se usa de manera genérica para referirse a un grupo de agentes antibacterianos de amplio espectro de acción el cual incluye naftiridinas, quinolonas, quinazolininas e isotiazoloquinolonas (Drlica y col., 2009). La síntesis del ácido nalidíxico, molécula derivada de la cloroquina (**Figura 1**) (Lesher y col., 1962) y su introducción en 1967 para uso clínico en el tratamiento de enfermedades del tracto urinario ocasionadas por bacterias Gram-negativas marcó el inicio de cinco décadas de desarrollo y uso de las quinolonas (Emmerson y Jones, 2003). Descubrimientos posteriores han permitido un mejor entendimiento del mecanismo de acción, además de la capacidad de modificar el núcleo naftiridina del ácido nalidíxico, que es considerado la estructura base (**Figura 2**), para mejorar la potencia y el espectro antibacterial, así como la oportunidad de modificar parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (Andriole, 2005).

Aunque tomó dos décadas producir compuestos con mejor biodisponibilidad y mayor espectro de acción que el ácido nalidíxico, la siguiente fase del desarrollo ocurrió de una manera relativamente rápida, entre 1978 y 1982 se patentaron un gran número de quinolonas, incluyendo ciprofloxacina y norfloxacina; en la década de 1990 destacan levofloxacina y gatifloxacina y en la década de 2000, moxifloxacina, gemifloxacina y garenoxacina (Emmerson y Jones, 2003). Hasta 1976, con el desarrollo de la flumequina, ningún compuesto había ofrecido alguna mejora significativa con respecto del ácido nalidíxico. Éste fármaco fue el primer compuesto en ser desarrollado con un grupo flúor en la posición 6 (**Figura 2**) y su espectro de acción incluía enterobacterias resistentes al ácido nalidíxico (Emmerson y Jones, 2003). Hoy día, ciprofloxacina, patentada en 1981, continúa



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



**Figura 2.** 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).

siendo una de las quinolonas más empleadas en el tratamiento contra bacterias Gram-negativas; es activa contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, sin embargo, a pesar de los excelentes resultados en muchas infecciones respiratorias, se reportó el fallo en el tratamiento de infecciones neumocócicas, limitando su uso en esta área (Ball, 2000).

En la actualidad, la demanda por quinolonas con mayor actividad y menor resistencia microbiana ha impulsado el desarrollo de nuevos compuestos, como el caso de nemonoxacina, una quinolona no fluorada que actualmente se encuentra en la fase clínica III, penúltima fase del desarrollo farmacéutico, y que ha mostrado mayor actividad *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* que otros compuestos fluorados como ciprofloxacina y moxifloxacina (Qin y Huang, 2014).

## 2. Estructura de las quinolonas

Las quinolonas han sido el centro de un considerable interés tanto científico como clínico debido a que potencialmente ofrecen muchos de los atributos de un antibiótico ideal: alta potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, formulaciones orales e intravenosas, altos niveles en suero, un amplio volumen de distribución y baja incidencia de efectos adversos (Bolon, 2011); sin embargo, para lograr estas características se han realizado una gran cantidad de modificaciones tomando como base el núcleo de las quinolonas (**Figura 2**).

Una de las primeras modificaciones fue la adición de grupo flúor en la posición 6 la 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). La posición 1 forma parte de la unión al sitio blanco y la sustitución de un grupo ciclopropil parece ser la mas

adecuada; sin embargo, la adición de un grupo 2,4-difluorfenil también incrementa la potencia, especialmente contra anaerobios. La posición 2 se encuentra muy cerca de la unión a sitio blanco y la adición de sustituyentes ha resultado en la disminución de la actividad antibacteriana. Las posiciones 3 y 4 se consideran críticas para la unión a sitio blanco y hasta la fecha no se han reportado sustituciones que puedan incrementar la actividad (Andersson y MacGowan, 2003). Sustituciones en la posición 5 aparentemente son capaces de cambiar la configuración planar de la estructura base y 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). 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 la molécula base, al igual que la posición 5, un grupo halógeno incrementa la actividad contra anaerobios y la adición de nitrógeno, grupos metilo o metoxilo incrementan la actividad (Peterson, 2001).

A pesar de que ciertos sustituyentes, como los mencionados anteriormente, pueden producir importantes cambios en la actividad biológica de las quinolonas, las características finales de la molécula derivan de la interacción entre cada uno de los radicales (Peterson, 2001).

### **3. Clasificación de las quinolonas**

A través de los años las quinolonas han sido clasificadas de distintas maneras, por ejemplo, se les conoce como fluoroquinolonas a todas las que presentan un grupo flúor en la posición 6, sin embargo, la manera más común de clasificarlas es dentro de cuatro generaciones en función de su desarrollo y actividad antibacteriana (Ball, 2000).

### 3.1. Primera generación

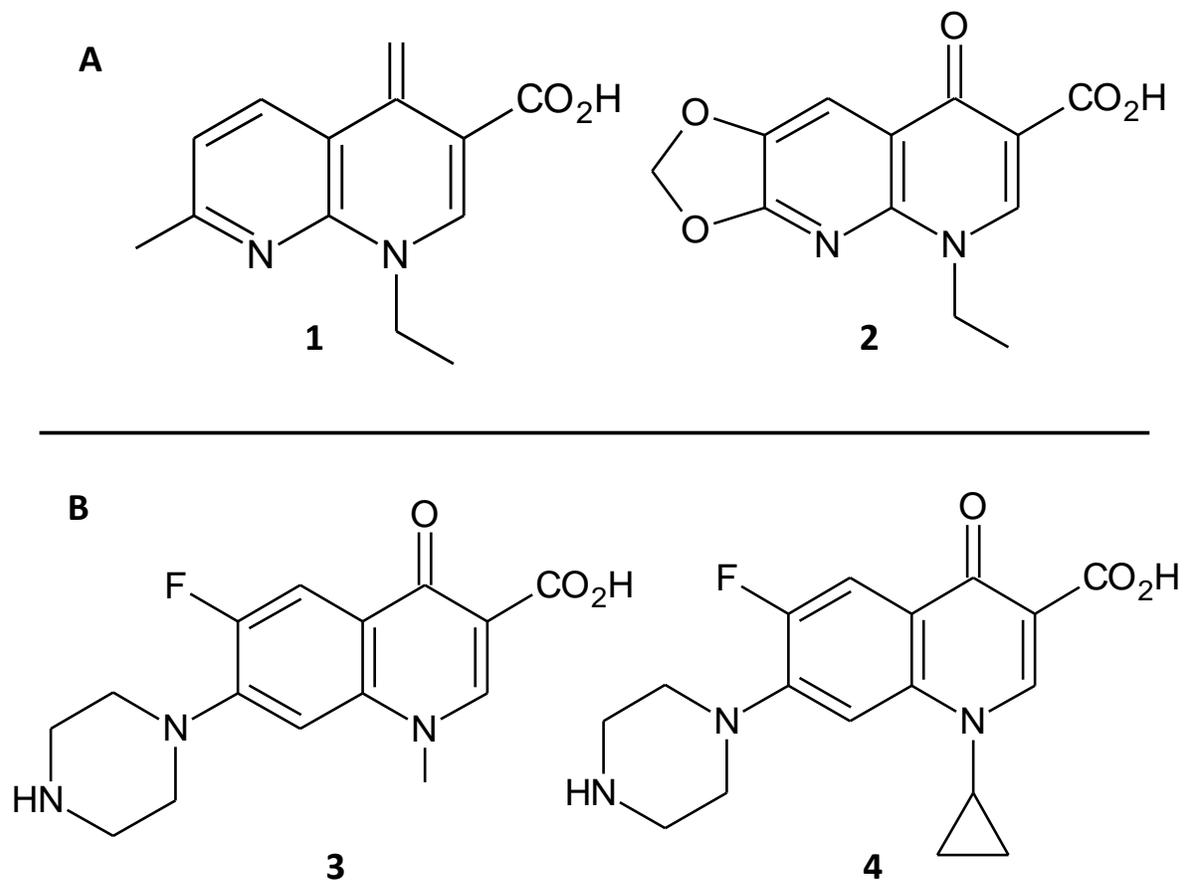
Está conformada por las primeras moléculas sintetizadas, como son: ácido nalidíxico y ácido oxolínico (**Figura 3A**). Eran utilizadas en el tratamiento de infecciones de vías urinarias causadas por la mayoría de las bacterias Gram-negativas, sin embargo, presentan actividad nula contra organismos Gram-positivos, anaerobios y contra *P. aeruginosa*. Una característica de esta generación fue un rápido desarrollo en el número de organismos resistentes (Emmerson y Jones, 2003).

### 3.2. Segunda generación

La segunda generación de quinolonas ha estado disponible desde mediados de 1980 y fue responsable de un enorme cambio en el tratamiento clínico. Con estos agentes se incrementó la actividad contra organismos Gram-negativos con respecto de la primera generación; adicionalmente, infecciones por *P. aeruginosa* en niños con fibrosis quística pudieron ser tratadas oralmente con quinolonas de la segunda generación (Ball, 2000). La principal desventaja de los antibióticos de esta generación fue su limitada actividad en organismos Gram-positivos. En esta generación se encuentran, por ejemplo, norfloxacina y ciprofloxacina, siendo ésta última una de las quinolonas más empleadas en el tratamiento contra bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa* (Emmerson y Jones, 2003) (**Figura 3B**).

### 3.3. Tercera generación

La tercera generación de quinolonas se caracteriza por la presencia de heterociclos de nitrógeno en la posición 7, encontrando entre estas moléculas a gatifloxacina y levofloxacina (**Figura 4A**). Estas modificaciones tuvieron como consecuencia el



**Figura 3. Primera y segunda generaciones 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.

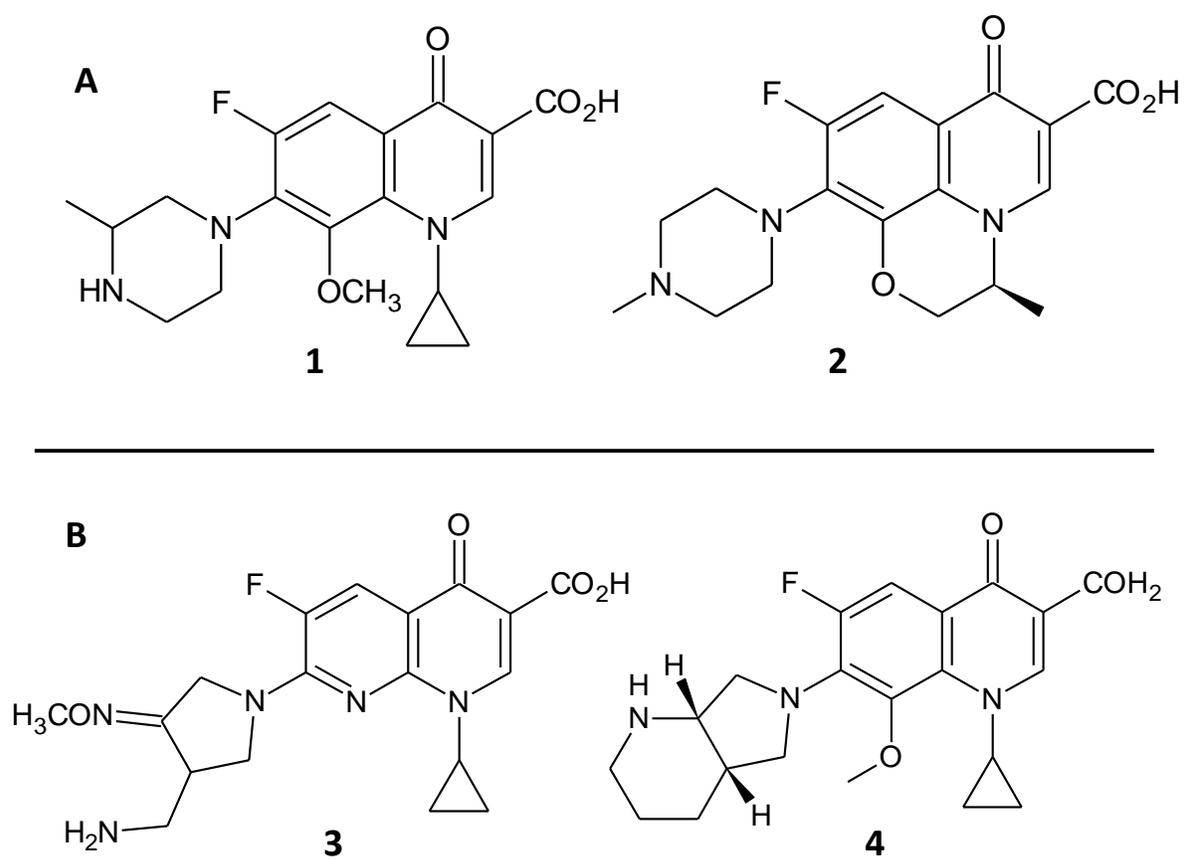
incremento de la actividad contra bacterias Gram-positivas como *Streptococcus pneumoniae* y una alta efectividad en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias, además de conservar la actividad contra organismos Gram-negativos (Andriole, 2005).

### **3.4. Cuarta generación**

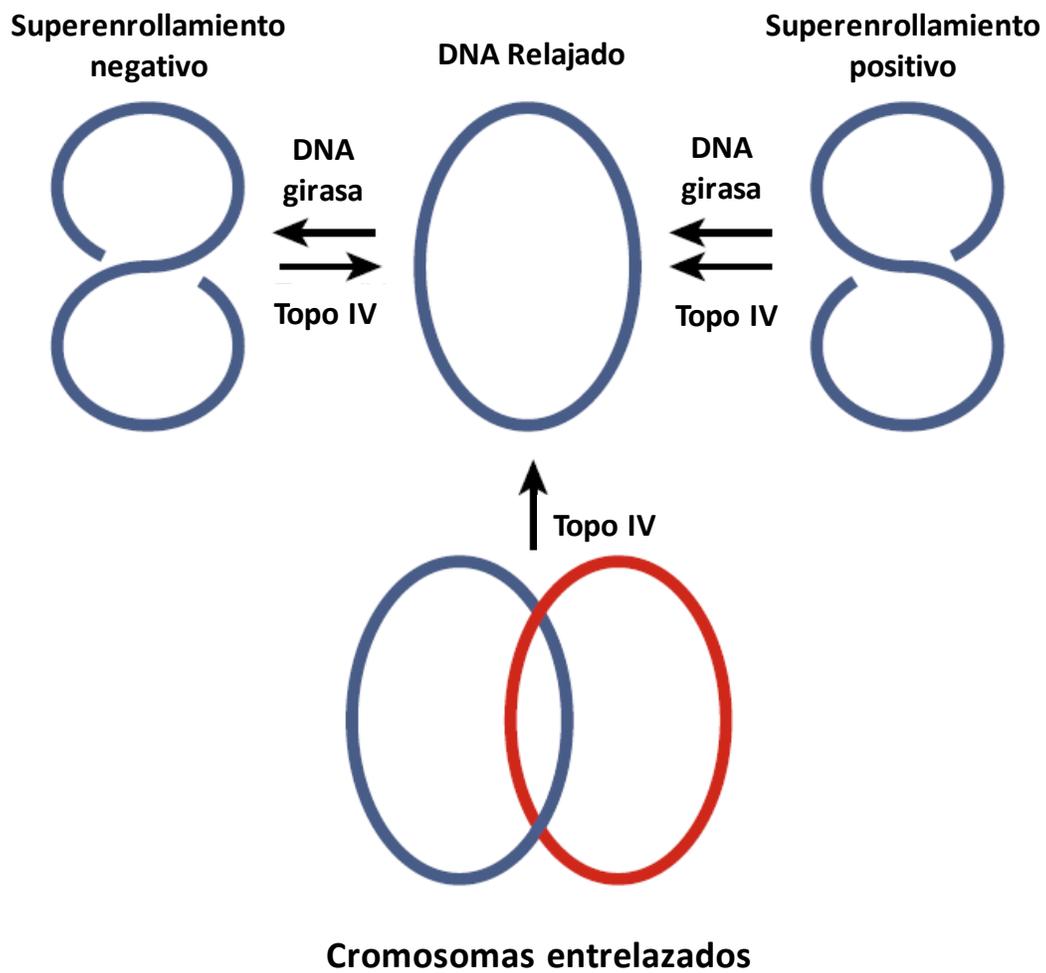
Las quinolonas de la cuarta generación se caracterizan por su alta potencia contra organismos anaerobios y un incremento en la actividad contra *S. pneumoniae*, además de conservar las características de las generaciones anteriores (Andriole, 2005). Moléculas como gemifloxacina y moxifloxacina forman parte de esta generación, siendo éste último uno de los antibióticos más empleados en el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio como la neumonía e infecciones en pacientes con fibrosis quística (Beisswenger y col., 2014) (**Figura 4B**).

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

Para ejercer su mecanismo de acción, las quinolonas son transportadas al interior de la célula bacteriana mediante difusión simple (Jacoby, 2005). El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en la inhibición de dos enzimas claves para la replicación, transcripción y reparación del DNA de la célula bacteriana, la DNA girasa y la topoisomerasa IV (**Figura 5**) (Drlica y col., 2009). Ambas enzimas pertenecen a la familia de topoisomerasas tipo IIA y están compuestas de dos subunidades. Las subunidades de la DNA girasa son GyrA de 97 kDa, codificada por el gen *gyrA*, y GyrB de 90 kDa, codificada por *gyrB*. Para la topoisomerasa tipo IV, las subunidades correspondientes son ParC de 75 kDa y ParE de 70 kDa, codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente. Ambas enzimas tienen



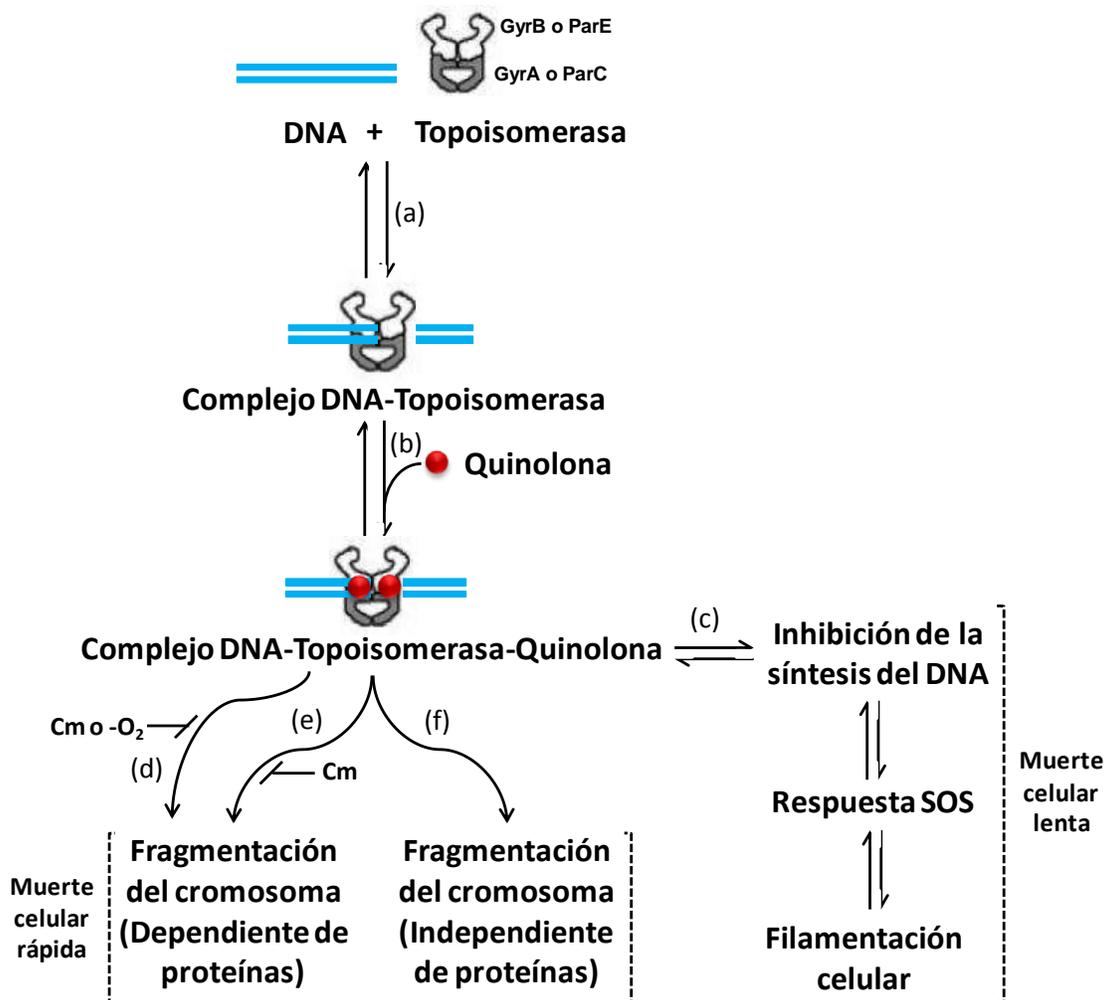
**Figura 4. Tercera y cuarta generaciones de quinolonas.** (A) Se muestran moléculas de la tercera generación: (1) gatifloxacin y (2) levofloxacin; y (B) de la cuarta generación: (3) gemifloxacin y (4) moxifloxacin.



**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).

estructuras muy similares, excepto por el dominio C-terminal de las proteínas GyrA y ParC (Champoux, 2001). Las dos topoisomerasas 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 la 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 topoisomerasas tipo IIA introducen un par de cortes en la cadena sencilla de DNA, uniéndose covalentemente al extremo 5' formando un complejo DNA-topoisomerasa, lo cual relaja el superenrollamiento del DNA (Kampranis y col., 1998). Las quinolonas se unen rápidamente al complejo atrapando a la topoisomerasa en el DNA, lo que da como resultado la inhibición de la replicación del DNA (**Figura 6**). Este nuevo complejo ternario, DNA-Topoisomerasa-Quinolona, bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo el crecimiento bacteriano; no obstante, es reversible si se remueve la quinolona, ya sea por la adición del agente quelante EDTA o por un tratamiento térmico. En los sistemas *in vitro*, cuando la DNA girasa es el blanco, la inhibición ocurre en minutos (Heddle y Maxwell, 2002) mientras que si el blanco es la topoisomerasa IV la inhibición ocurre lentamente (Khodursky y col., 1998). La inhibición rápida de la síntesis de DNA es reversible y por lo tanto no puede ser la causa inminente de la muerte celular que puede ocurrir mediante dos vías: i) una que se puede bloquear mediante el uso de un inhibidor de la síntesis de proteínas, como el cloranfenicol (Cm), y en condiciones de anaerobiosis (**Figura 6**), la cual es característica de la primera generación de quinolonas, y ii) la segunda vía que es activa en presencia de cloranfenicol y



**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 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 que requiere síntesis de proteínas, que puede inhibirse con cloranfenicol (Cm) y condiciones aeróbicas; (e) fragmentación letal del cromosoma que requiere síntesis de proteínas pero no condiciones aeróbicas; (f) fragmentación letal del cromosoma que no requiere síntesis de proteínas o condiciones aeróbicas (modificado de Drlica y col., 2009).

oxígeno (**Figura 6**) (Malik y col., 2006a). Para las generaciones posteriores a la primera, la elección de una vía depende directamente de la concentración. La acción letal de las quinolonas surge a altas concentraciones del antibiótico, 5 a 10 veces más que la concentración mínima inhibitoria, en paralelo con la fragmentación del cromosoma (Malik y col., 2006b). La escisión del cromosoma surge debido a la remoción del complejo ternario, la cual puede ocurrir mediante la digestión de las topoisomerasas mediada por proteasas o nucleasas. Una vez que la fragmentación del cromosoma comienza, las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan serán las responsables de la muerte celular (**Figura 6**)

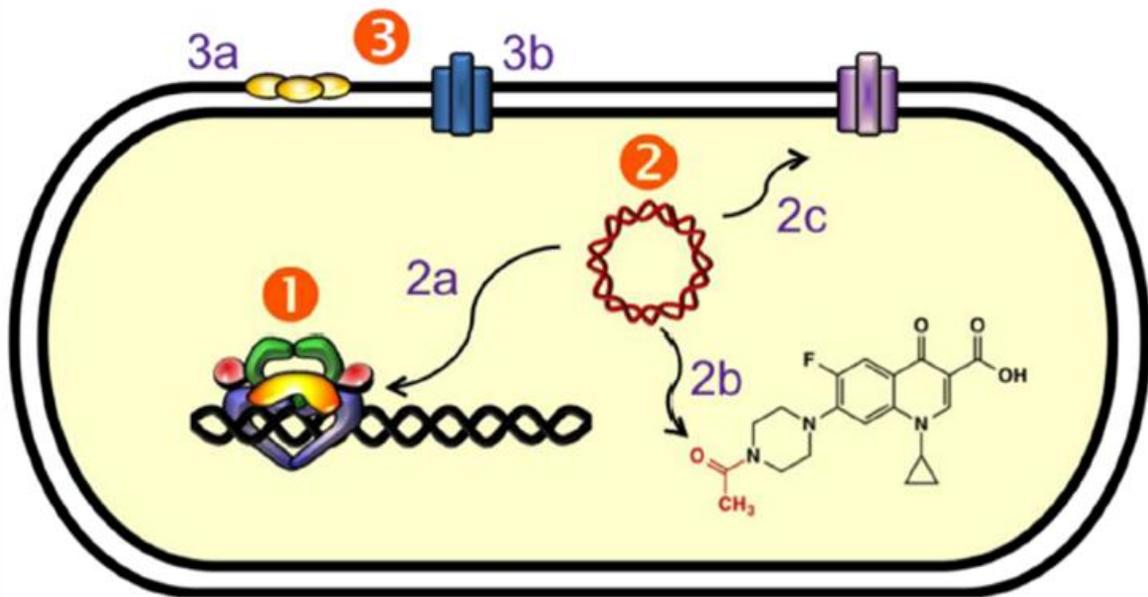
## **5. Resistencia bacteriana a quinolonas**

El uso exitoso de cualquier antibiótico se ve comprometido desde que es empleado por primera vez por el potencial desarrollo de tolerancia o resistencia por parte del microorganismo contra el que es empleado; no obstante, los antibióticos han revolucionado la medicina en muchos aspectos y su descubrimiento marcó el inicio de una era en la historia humana (Davis y Davis, 2010). Debido al origen sintético de las quinolonas, se propuso que el único mecanismo de resistencia que las bacterias podrían adquirir de manera inmediata serían las mutaciones en los genes que codifican las proteínas blanco, las topoisomerasas tipo IIA, o los transportadores de membrana (Martínez, 2009). En cuanto a la adquisición de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes, aquella que ocurre cuando una bacteria que ya posee los genes de resistencia los transfiere a otra que no es su descendiente, para el caso de las quinolonas se pensó que esto no sería posible, ya que el origen de los genes de resistencia a antibióticos de origen biológico, son los propios organismos productores (Hernández y col., 2011). Hasta la fecha, los sistemas de

resistencia a quinolonas pueden dividirse en dos grandes grupos (**Figura 7**), i) cuando está codificada por genes cromosómicos, que incluyen modificaciones en los sitios blanco y sistemas de expulsión, y ii) los codificados por genes plasmídicos, que incluyen proteínas Qnr, sistemas de expulsión y la enzima aminoglucósido acetil transferasa modificada [AAC(6')-Ib-cr] (Aldred y col., 2014).

### 5.1. Modificaciones de las moléculas blanco

Durante mucho tiempo, y conforme a lo que se había estipulado, las bacterias reportadas como resistentes a quinolonas contenían únicamente mutaciones en los genes que codifican las moléculas blanco de dicho antibiótico (**Figura 7**). Las mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa se encontraron principalmente en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *S. aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*, siendo las mutaciones en *gyrA* las involucradas principalmente en la resistencia (Cambau y col., 1995). Para el caso de microorganismos Gram-positivos resistentes a ciprofloxacina, como *Streptococcus pneumoniae*, los genes que codifican la topoisomerasa IV son el principal blanco; las mutaciones se encuentran principalmente en el gen *parC*, no obstante, las cepas altamente resistentes poseen mutaciones adicionales en los genes *gyrA* y *parE* (Ferrándiz y col., 2000). La resistencia involucra sustituciones de aminoácidos en la llamada “región determinante de resistencia a quinolonas” (QRDR, por sus siglas en inglés) la cual se encuentra cercana al sitio activo donde la enzima se une al DNA (Heddle y Maxwell, 2002). Además se reportó que en una cepa de *S. aureus* resistente a ciprofloxacina, la mutación puntual (G→A) 13 pb río arriba del codón de inicio del gen *parE* disminuye la expresión de la topoisomerasa IV sin encontrarse defectos en el crecimiento (Ince y Hooper, 2003). Debido al efecto tóxico que produce la formación del complejo ternario



**Figura 7. Resistencia bacteriana a quinolonas.** Se representa una célula bacteriana mostrando los sistemas de resistencia a 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 Qnr (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) Sistemas de expulsión (Tomada de Aldred y col., 2014).

seguido de la fragmentación del cromosoma (**Figura 6**), una disminución en el número de copias de las topoisomerasas reduciría la acción del fármaco, restringiendo la formación de dicho complejo y originando una resistencia relativa a quinolonas (Ince y Hooper, 2003).

## **5.2. Regulación de la expresión de porinas**

Para alcanzar su blanco, las quinolonas deben cruzar la pared celular y la membrana citoplasmática en bacterias Gram-positivas, mientras que en bacterias Gram-negativas, las quinolonas deben atravesar una barrera externa adicional, conocida como peptidoglicano (Jacoby, 2005). Aparentemente, las quinolonas atraviesan la membrana citoplasmática por difusión simple mediante porinas localizadas en la membrana externa que sirven como canales de difusión y permiten el paso de moléculas hidrofílicas pequeñas, como las quinolonas (**Figura 7**) (Hooper, 2005). 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 ve 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).

## **5.3. Sistemas de expulsión codificados por genes cromosómicos**

Las bacterias poseen sistemas de expulsión inespecíficos, es decir, que pueden expulsar más de un tipo de molécula; algunos son capaces de expulsar quinolonas confiriendo así resistencia al reducir la concentración intracelular del fármaco (**Figura 7**) (Hernández y col., 2011). Los sistemas de transporte se agrupan en superfamilias que incluyen facilitadores mayores (MFS), sistemas que unen ATP (ABC), sistemas de resistencia,

nodulación y división celular (RND), proteínas pequeñas de resistencia a multidrogas (SMR) y sistemas de expulsión de multidrogas y compuestos tóxicos (MATE) (Martínez y col., 2009).

Algunos genes de *S. aureus*, una bacteria Gram-positiva, que codifican sistemas de expulsión se han caracterizado y entre ellos, los más estudiados son los que codifican las proteínas NorA, NorB y NorC, que pertenecen a la familia MFS. Los sistemas constan de una única proteína de membrana la cual se encarga de reconocer al sustrato y expulsarlo fuera de la célula (**Figura 7**). Se encontró que, en condiciones normales, la capacidad de estos sistemas para expulsar quinolonas no es significativa; sin embargo, la sobreexpresión de los genes que codifican a estas proteínas, sí confiere resistencia considerable a ciprofloxacina y norfloxacina, pero no a moxifloxacina (Truong-Bolduc y col., 2005, 2006). La expresión de los genes que codifican estos sistemas de expulsión está regulada de manera negativa por las proteínas NorG y MgrA (Truong-Bolduc y Hooper, 2007).

Un sistema de expulsión ampliamente estudiado en *P. aeruginosa* es MexAB-OprM que pertenece a la familia RND y confiere resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina; además, es capaz de expulsar bromuro de etidio, un compuesto aromático fluorescente que se intercala con el DNA (Xu y col., 2012). El sistema está formado por una proteína de membrana interna, MexB, que se conecta con una proteína de membrana externa, OprM, mediante una proteína periplásmica denominada proteína de fusión, MexA, que se postula que conecta a MexB y OprM. MexB es la encargada de reconocer el sustrato que se va a expulsar y se ha reportado que cuando el gen que codifica MexB es transferido a un organismo Gram-positivo, como *Lactococcus lactis*, éste es capaz de expulsar bromuro de etidio, lo cual indica que MexB podría expulsar quinolonas por sí sola (Agyie y col., 2012).

#### 5.4. Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr se encontraron por primera vez codificadas en el plásmido pMG252, el cual fue aislado de una cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* resistente a ciprofloxacina (Martínez y col., 1998). Se determinó que la presencia del plásmido no modifica la concentración intracelular de las quinolonas, sin embargo, al ser transferido a otras bacterias Gram-negativas confirió resistencia al fármaco (Tran y Jacoby, 2002). Posteriormente se identificó en el plásmido pMG252 un gen que se predijo codifica una proteína de 219 aminoácidos, la cual se nombró Qnr porque confiere resistencia a quinolonas (Tran y Jacoby, 2002).

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos, definida así por los cinco aminoácidos repetidos en tándem con un motivo recurrente [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly] (Vetting y col., 2006). Aunque han sido identificadas más de 500 secuencias que contienen el motivo pentapéptido repetido, se desconoce la función de casi todas ellas (Vetting y col., 2006); sin embargo, es probable que se unan a las topoisomerasas y no permitan la unión de las quinolonas (**Figura 7**) (Tavío y col., 2014). Una de estas proteínas que contiene un motivo pentapéptido es McbG, encontrada en cepas de *E. coli*, la cual tiene un 19.6% de identidad con la proteína Qnr de *K. pneumoniae* y protege a las bacterias que sintetizan microcina B17, un péptido que bloquea la replicación del DNA (Heddle y col., 2001).

Se han identificado también las proteínas QnrB de *K. pneumoniae* (Jacoby y col., 2006) y QnrS de *Shigella flexneri* (Cattoir y col., 2008), por lo que la primera proteína en ser identificada fue renombrada como QnrA (Jacoby y col., 2006). Finalmente, se ha

encontrado que las proteínas Qnr se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias patógenas, particularmente en enterobacterias (Xiong y col., 2011).

### **5.5. Sistemas de expulsión codificados por genes plasmídicos**

Se han identificado hasta la fecha dos plásmidos que confieren resistencia a quinolonas mediante la disminución de la concentración intracelular del fármaco mediada por sistemas de expulsión (**Figura 7**).

El plásmido pHPA aislado de la cepa clínica de *E. coli* C316, contiene el gen *qepA* el cual codifica la proteína de membrana interna QepA, con 14 segmentos transmembranales, que se agrupa en la familia MFS. La proteína confiere resistencia a quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina (Yamane y col., 2007).

El plásmido pOLA52 de una cepa de *E. coli* aislada de estiércol de cerdo, contiene los genes *oqxA* y *oqxB*. Estos genes codifican OqxA, una proteína de membrana interna que pertenece a la familia RND, y OqxB, una proteína de periplasma. Las proteínas OqxAB confieren resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico; además, son capaces de expulsar bromuro de etidio, lo que sugiere que también expulsan dichos antibióticos (Hansen y col., 2004). Se determinó que OqxA y OqxB necesitan de una proteína de membrana externa, como TolC de *E. coli*, para conferir resistencia a quinolonas, por lo que parecen funcionar como un complejo tripartita de expulsión similar a los codificados por genes cromosómicos (Hansen y col., 2004). Los genes *oqxA* y *oqxB* se han identificado en aislados clínicos de *E. coli* y en el cromosoma de *K. pneumoniae*, formando parte de un posible transposón en esta última especie (Kim y col., 2009).

## 5.6. Modificación enzimática

La capacidad de degradar quinolonas se había descrito únicamente en hongos (Wetztein y col., 1997); sin embargo, se creía que en la naturaleza no se encontrarían bacterias capaces de introducir modificaciones enzimáticas selectivas a quinolonas, debido al origen sintético de este antibiótico.

El primer sistema de modificación selectiva de quinolonas descrito se encuentra codificado en el plásmido pHSH10-2, el cual se identificó en una cepa clínica de *E. coli* resistente a ciprofloxacina (Robicsek y col., 2006). pHSH10-2 posee el gen *qnrA*; sin embargo, el nivel de resistencia conferido por el plásmido fue cuatro veces mayor que lo reportado anteriormente para los genes *qnr*. Mediante mutagénesis por transposición, se encontró que pHSH10-2 posee el gen *aac(6')-Ib*, que codifica una enzima aminoglucósido acetiltransferasa que proporciona resistencia a los 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 se encuentra modificado en los codones 102 (Trp → Arg) y 179 (Asp → Tyr); la mutagénesis dirigida a estos codones, mostró que en ausencia de estas mutaciones, el gen no se asocia con la resistencia a quinolonas. Se determinó mediante ensayos de acetilación, utilizando kanamicina y ciprofloxacina como sustratos, que la enzima puede introducir un grupo acetilo en el nitrógeno del grupo piperazina que poseen ciprofloxacina y norfloxacina en la posición 6 (**Figura 3B**) y de esta manera reduce la afinidad de las topoisomerasas por los antibióticos (**Figura 7**) (Robicsek y col., 2006).

## II. ANTECEDENTES

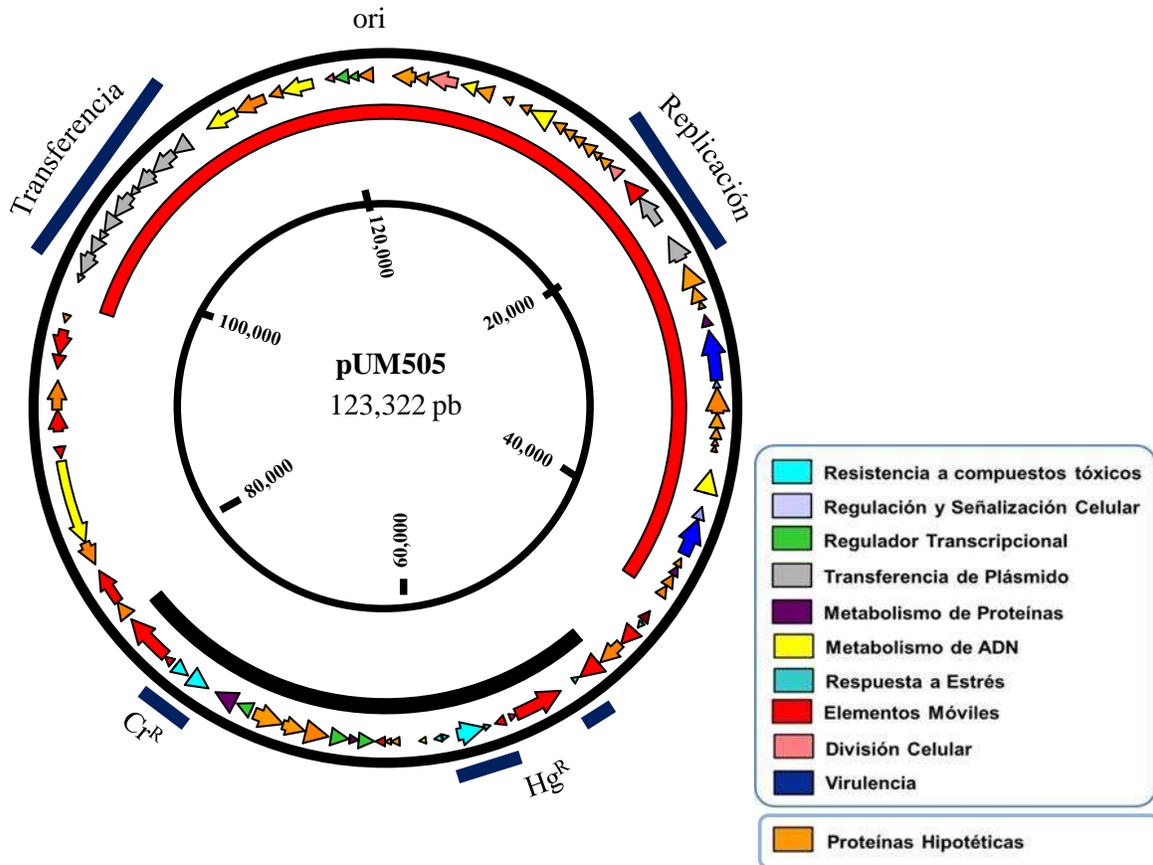
*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo agua y suelo, así como en asociación con diversos organismos vivientes (Battle y col., 2008). Esta bacteria es la mayor causa de infecciones hospitalarias y es el patógeno más comúnmente asociado con la mortalidad de pacientes con fibrosis quística. Las infecciones causadas por este microorganismo son muy difíciles de tratar debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos como quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos (Breidenstein y col., 2008). Las quinolonas, como ciprofloxacina, son los antibióticos de primera elección en la mayoría de los países en desarrollo (Hoiby, 2011); sin embargo, el uso masivo de quinolonas ha tenido como consecuencia un incremento en la resistencia de *P. aeruginosa* (Breidenstein y col., 2008). El principal mecanismo de resistencia en las cepas de *P. aeruginosa* está dado por mutaciones en los genes que codifican las proteínas blanco de las quinolonas, la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Hernández y col., 2011). Sin embargo, *P. aeruginosa* es conocida por tener una membrana que de manera intrínseca limita la difusión; además, la sobreexpresión de sistemas de expulsión, como el caso de MexAB-OprM, ocurre en algunas cepas confiriendo resistencia a quinolonas y a otros antibióticos (Bearden, 2001).

Además de los mecanismos de resistencia cromosómicos mencionados, en las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *K. pneumoniae* se han identificado sistemas de resistencia a quinolonas codificados por genes plasmídicos, como son: proteínas Qnr, sistemas de expulsión y la enzima aminoglucósido-acetil transferasa modificada, aac(6')-Ib-cr (Jacoby, 2005); sin embargo, no se han reportado sistemas de resistencia a quinolonas codificados por genes plasmídicos en *P. aeruginosa* (Wong y Kassen, 2011).

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986; Cervantes y Ohtake., 1988). Se ha determinado que al transferirse a la cepa de *P. aeruginosa* PU21 confiere mayor resistencia a quinolonas con respecto a la cepa sin el plásmido (Ramírez-Díaz y col., 2011). El plásmido pUM505 se secuenció y se realizó el análisis *in silico* donde se identificaron 138 regiones codificantes (**Figura 8**) (Ramírez-Díaz y col., 2011). pUM505 se divide en dos regiones correspondientes a islas genómicas: Una región que presenta homología con una isla de patogenicidad de cepas de *Pseudomonas*, donde se encuentran genes probablemente relacionados con replicación, transferencia del plásmido y factores de virulencia; la segunda región corresponde a una isla de resistencia a metales pesados, donde se identificaron genes de resistencia a mercurio inorgánico y a cromato (Ramírez-Díaz y col., 2011) (**Figura 8**). Sin embargo, no se identificaron genes relacionados con resistencia a antibióticos (Ramírez Díaz y col., 2011). Adicionalmente, se identificaron 64 regiones que codifican proteínas hipotéticas distribuidas en diferentes regiones del plásmido.

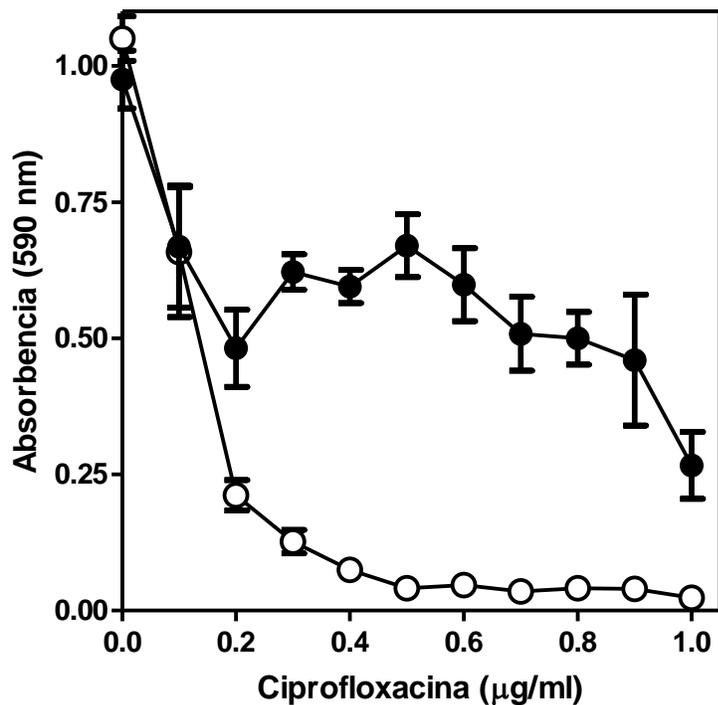
El plásmido pUM505 al transferirse a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, una cepa estándar de laboratorio, confiere mayor resistencia a la quinolona ciprofloxacina (**Figura 9**) con respecto de la cepa PAO1 que no contiene el plásmido. Esto indica que genes codificados por pUM505 confieren resistencia a quinolonas, por un mecanismo aún no reportado, en el que podrían participar los genes que codifican proteínas hipotéticas.

Nuestro grupo de trabajo realizó la búsqueda de los genes del plásmido pUM505 responsables de la resistencia a quinolonas seleccionando inicialmente los genes *orf35*, *orf36* y *orf37* que codifican proteínas hipotéticas. El producto del *orf36* tiene una probable localización en la membrana, sugiriendo que la resistencia es mediante un mecanismo de

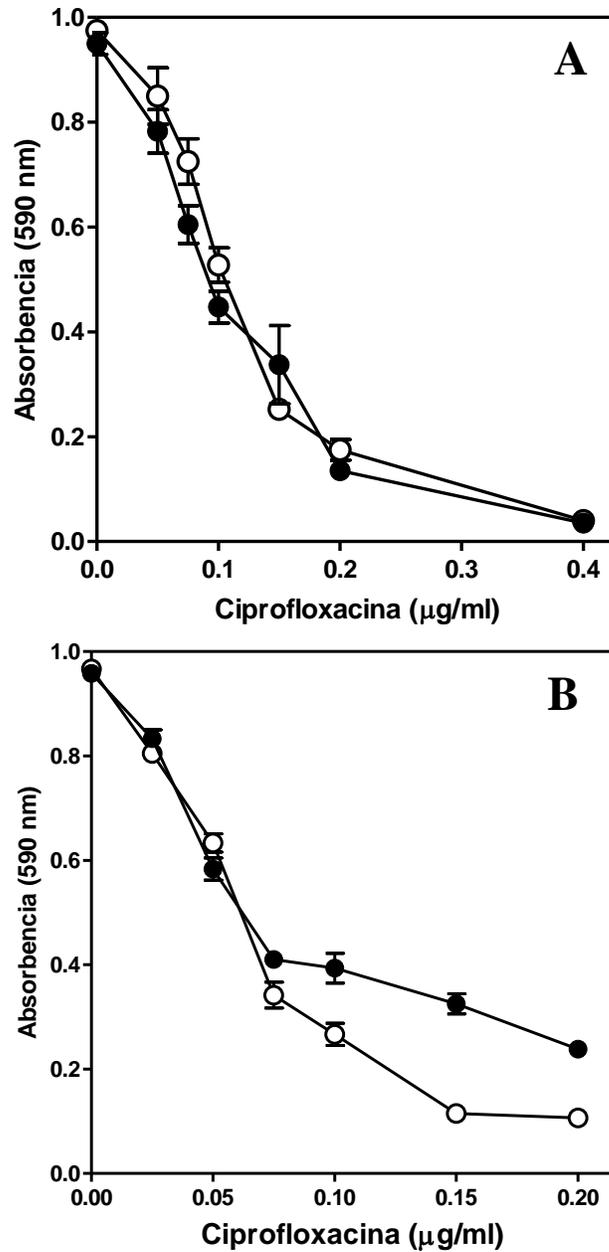


**Figura 8. Mapa genético del plásmido pUM505.** Las regiones codificantes se muestran con flechas o puntas de flecha, indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones asignadas de las proteínas codificantes se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas. La isla de patogenicidad 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 ( $Hg^R$ ) y resistencia a cromato ( $Cr^R$ ) (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

expulsión. Los genes fueron clonados en el vector de expresión binario pUCP20 y transferidos a *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 10a**) y a *E. coli* J53-2 (**Figura 10b**); finalmente, debido a que el crecimiento en esta última fue superior a la cepa utilizada como control, J53-2 (pUCP20), se sugiere que los genes confieren resistencia a ciprofloxacina (Rojas-Rojas, 2012). Este resultado sugiere que genes adicionales a los *orf35-37* participan en la resistencia en PAO1. El objetivo de este trabajo es identificar genes adicionales a los *orf35-37* presentes en el plásmido pUM505, responsables de la resistencia a quinolonas, así como proponer un posible mecanismo de resistencia.



**Figura 9. Resistencia a ciprofloxacina conferida por el plásmido pUM505.** Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se midió la absorbancia a 590 nm. *P. aeruginosa* PAO1 (○) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (●). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6. (Díaz-Magaña, 2011.Tesis de Doctorado en proceso).



**Figura 10. Susceptibilidad a ciprofloxacina de cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*.** Los cultivos se crecieron en CN con las concentraciones de ciprofloxacina indicadas por 18 h a 37°C con agitación constante y se midió la absorbencia a 590 nm. (A): *P. aeruginosa* PAO1 (pUCP20) (○) y PAO1 (pUC\_Orf35-37) (●); (B): *E. coli* J53-2 (pUCP20) (○) y J53-2 (pUC\_Orf35-37) (●). Se muestran las barras de error estándar de la media, (A) n=4 y (B) n=6. (Rojas-Rojas, 2012)

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El plásmido pUM505 confiere resistencia a quinolonas cuando se transfiere a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Sin embargo, después de realizar el análisis de la secuencia de pUM505, no se identificaron genes relacionados con la resistencia a quinolonas. Cuando se clonaron los *orf35-37* de pUM505, éstos sólo confirieron resistencia en *E. coli* pero no en *P. aeruginosa*. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende identificar los genes responsables de la resistencia a quinolonas, adicionales a los *orf35-37*, los cuales probablemente codifican un sistema de resistencia constituido por genes aún no reportados.

### **IV. HIPOTESIS**

Genes adicionales a los *orf35-37* presentes en el plásmido pUM505 confieren resistencia a quinolonas mediante un mecanismo aún no reportado.

## **V. OBJETIVOS**

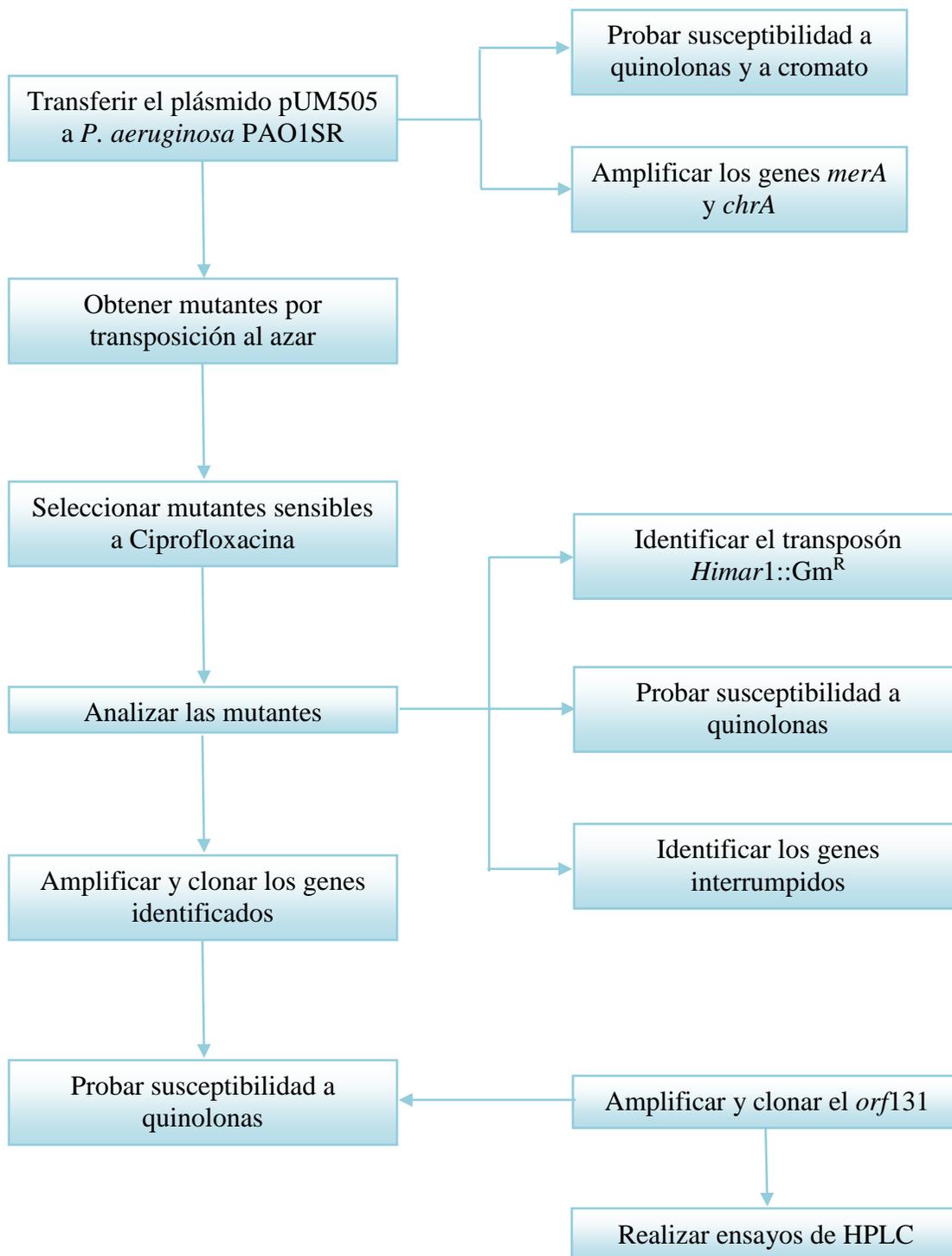
### **A) Objetivo general**

Identificar los genes del plásmido pUM505 implicados en la resistencia a quinolonas.

### **B) Objetivos particulares**

- 1.- Identificar los genes del plásmido pUM505 implicados en la resistencia a quinolonas.
- 2.- Evaluar el nivel de resistencia a quinolonas conferida por los genes de pUM505 identificados.
- 3.- Determinar un mecanismo de resistencia a quinolonas conferido por los genes de pUM505.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

- Caldo Luria Bertani (CL). Se preparó utilizando los siguientes componentes; NaCl (J. T. Baker) 1%, peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5%.
- Agar Luria Bertani (AL). Se preparó adicionando 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon) al CL.
- Caldo nutritivo (CN). Se utilizó el medio preparado por la casa comercial Bioxon, y su composición es la siguiente: peptona de gelatina 0.5% y extracto de carne de res 0.3%.
- Agar nutritivo (AN). Se preparó adicionando 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon) al CN.
- Medio mínimo M9 (M9): sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.1 mM y MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O mM (Sambrook y col., 1989) complementado con peptona de caseína 0.1%.

### 2. Cepas empleadas

Las cepas empleadas fueron las siguientes:

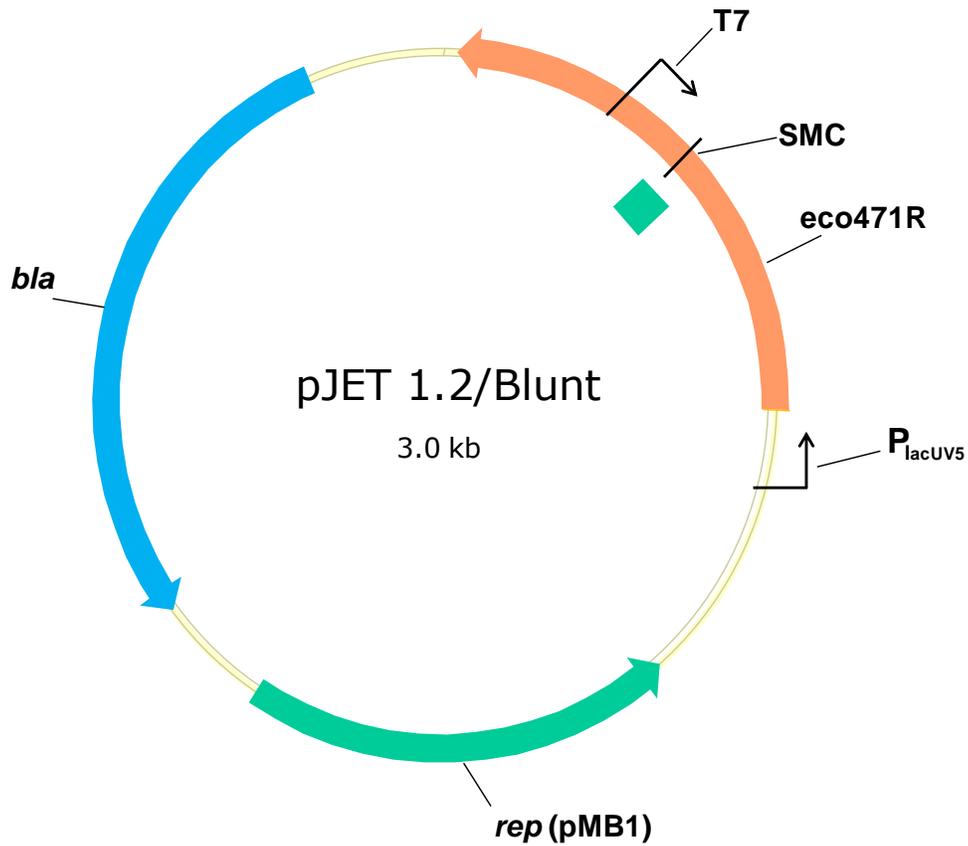
- 1) *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1979). Cepa que se empleó como receptora de los plásmidos recombinantes derivados del vector pUCP20 y en pruebas de susceptibilidad.
- 2) *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505). Cr<sup>R</sup>, Hg<sup>R</sup>, Cp<sup>R</sup>, Sm<sup>S</sup>. Cepa que se utilizó como donadora del plásmido pUM505 mediante conjugación.

- 3) *P. aeruginosa* PAO1SR. Sm<sup>R</sup> (Wong y Mekalanos, 2000). Cepa que se utilizó como receptora del plásmido pUM505.
- 4) *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505). Cr<sup>R</sup>, Hg<sup>R</sup>, Cp<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>. Cepa que se utilizó como receptora del plásmido pFAC para la generación de mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp<sup>S</sup>).
- 5) *E. coli* S17-1 (pFAC). [recA, F<sup>-</sup>, thi, pro, hsdR, RP4-2-TC::Mu<sup>-</sup>, Kn::Tn7, Tra<sup>+</sup>, Tp<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, Gm<sup>R</sup>] (Simon y col., 1983). Cepa empleada como donadora del plásmido pFAC, para la generación del banco de mutantes por transposición.
- 6) *E. coli* JM101 [F<sup>-</sup>, traD36, proAB, lacIqDM15], thi, D (lac-proAB) (Yanisch-Perron y col., 1985). Cepa receptora de los plásmidos recombinantes derivados de los vectores pJET1.2/Blunt y pUCP20.
- 7) *E. coli* J53 [F<sup>-</sup>, lac<sup>+</sup>, met<sup>-</sup>, pro<sup>-</sup>, Nal<sup>S</sup>] (Clowes y Hayes, 1968). Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes y en pruebas de susceptibilidad.
- 8) *E. coli* J53-2 [F<sup>-</sup>, met<sup>-</sup>, pro<sup>-</sup>, Nal<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>] (Coetzee y col., 1972). Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes y en pruebas de susceptibilidad.

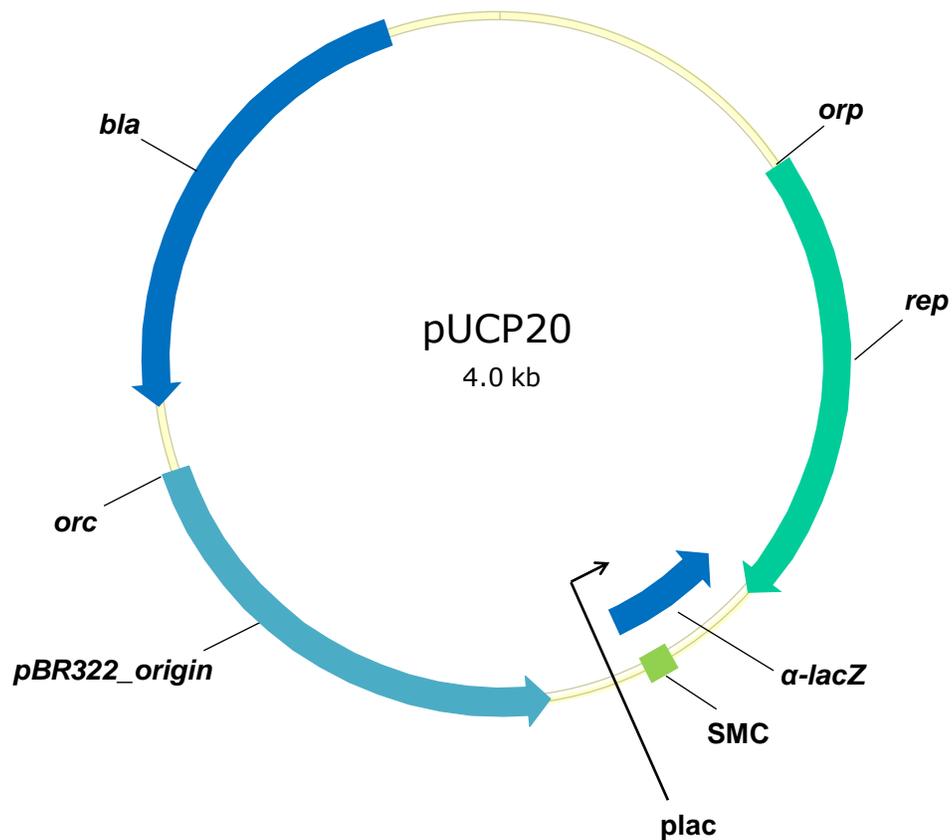
### 3. Plásmidos empleados

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

- pUM505 (Cervantes y col., 1986). Plásmido conjugativo, confiere resistencia a Cr<sup>R</sup>, Hg<sup>R</sup> y Cp<sup>R</sup> (**Fig. 8**).
- pJET 1.2/Blunt (Fermentas). Vector que se utilizó para la recuperación de productos de PCR, confiere resistencia a Ap<sup>R</sup> (**Fig. 11**).
- pUCP20 (West y col., 1994). Vector binario que se utilizó para la expresión de los genes de interés, confiere resistencia a Ap<sup>R</sup> y Cb<sup>R</sup> (**Fig. 12**).



**Figura 11. Mapa del vector pJET 1.2/Blunt.** Contiene el gen *bla* de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para *E. coli* rep (pMB1), el gen letal *eco471R* que permite la selección positiva de las transformantes con el inserto en el vector, el promotor T7 para la transcripción *in vitro* del inserto y el promotor PlacUV5 para la expresión del gen *eco471R* a un nivel suficiente para permitir la selección positiva y un sitio múltiple de clonación (SMC) (Fermentas).



**Figura 12. Mapa del vector de expresión binaria pUCP20.** Contiene el gen *bla* de resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 (*pBR322\_origin*) y *P. aeruginosa* (*orp*); el gen *rep*, que codifica una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; *α-lacZ*, una parte del gen que codifica la β-galactosidasa; el promotor *plac* y un sitio múltiple de clonación (SMC) (West y col., 1994).

- pFAC (Wong y Mekalanos, 2000) (**Fig. 13**). Contiene el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>*, confiere resistencia a Gm<sup>R</sup> y Ap<sup>R</sup>.

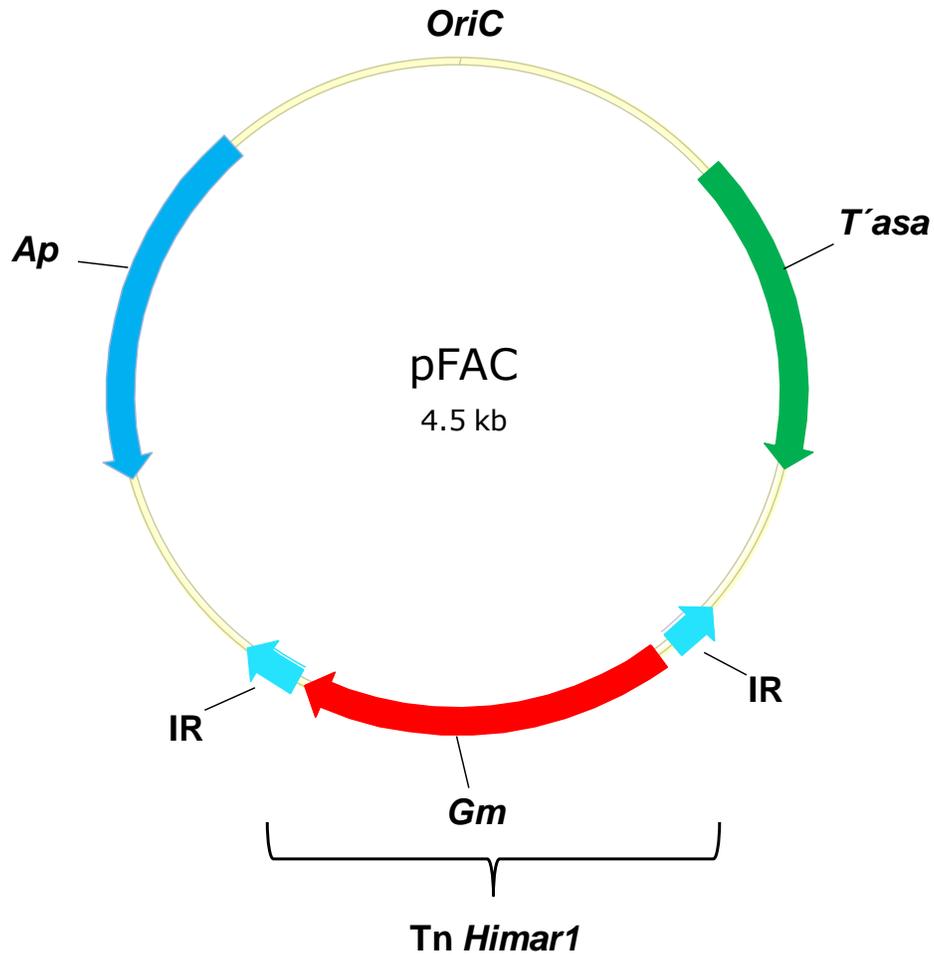
#### **4. Oligonucleótidos empleados**

Se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos diseñados con base en la secuencia del plásmido pUM505 para la amplificación de los siguientes genes: *chrA*, *merA*, *orf57* y *orf131*. Para la amplificación del transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* se utilizó el oligonucleótido MarIN y para la secuenciación del gen interrumpido se utilizó el oligonucleótido MarOUT (Wong y Mekalanos, 2000). Las secuencias de los oligos y sus características se enlistan en la **Tabla 1**.

#### **5. Conjugación en medio líquido**

Para la transferencia del plásmido pUM505 de la cepa donadora (D) *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) a la cepa receptora (R) *P. aeruginosa* PAO1SR se utilizó la técnica de conjugación en medio líquido de acuerdo al siguiente protocolo:

Se crecieron ambas cepas D y R en 4 ml de CL durante 24 h a 37°C con agitación constante. Se realizó una dilución 1:50 en CL, la cepa D se incubó hasta alcanzar una absorbencia de 0.5 a 590 nm y la cepa R se incubó a 42°C durante 18 h. Se hicieron mezclas de las cepas D y R en proporciones 1:1, 1:10 y 10:1 y se incubaron durante 24 h a 37°C sin agitación. Se realizaron diluciones de las mezclas en proporciones 1:10 y 1:100, se sembraron 100 µl de cada dilución en cajas con medio selectivo (AL con estreptomicina (100µg/ml) y cloruro de mercurio (0.1 mM)) y se incubaron durante 18-24 h a 37°C. Se seleccionaron algunas de las colonias transconjugantes obtenidas y se sometieron a pruebas de resistencia a antibióticos para comprobar la transferencia del plásmido pUM505.



**Figura 13. Mapa del plásmido pFAC.** Contiene el transposón (Tn) *Himar1*::Gm<sup>R</sup> tiene un gen de resistencia a gentamicina (Gm) flanqueado por dos secuencias de repetidos invertidos (IR). T'asa, gen que codifica la transposasa. El gen *bla* de resistencia a ampicilina y OriC, origen de replicación para *E. coli* (Wong y Mekalanos, 2000).

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados**

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre de la enzima
Dir-chrA	TGGCTT <u>CTGCAGCAAGG</u> TGGATCGGAAACG	<i>Pst</i> I
Rev-chrA	GTTACGAG <u>GATCCAACA</u> ACGTGAAGGCCCCG	<i>Bam</i> HI
Dir-merA	GCTGCCAATGATGGCGATATG	-
Rev-merA	TGACCGAAATCACCGTGAATGG	-
Dir-orf57	GAACAAG <u>GATCCG</u> AGGGATT	<i>Bam</i> HI
Rev-orf57	CCTTTAGTGAA <u>AGCTT</u> GCATTTCA	<i>Hind</i> III
Dir-orf131	CAACATGAT <u>GAATTCT</u> ACCGGAAAC	<i>Eco</i> RI
Rev-orf131	GAGAAATGA <u>AGCTT</u> GCGTTGTT	<i>Hind</i> III
MarIN	TACGTAACAGGTTGGCTGATAAGTCG	-
MarOUT	CCGGGGACTTATCAGCCAACC	-

Se indica en la secuencia y el sentido de los oligonucleótidos empleados: Dir (Directo) y Rev (Reverso). Se encuentra subrayado el sitio de corte con la enzima de restricción que se muestra en la columna de la derecha.

## **6. Mutagénesis por transposición al azar**

Para la obtención de mutantes de *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505) sensibles a ciprofloxacina se utilizó el método de mutagénesis por transposición adaptado de Wong y Mekalanos, (2000), de acuerdo al siguiente protocolo:

Un matraz de 125 ml con 24.5 ml con CN se inoculó con 500 µl de cultivo de la cepa donadora, *E. coli* S17-1 (pFAC), crecida durante 18-24 h a 37°C con agitación constante, y se incubó a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (0.6-0.8 a 590 nm). De igual manera, un matraz con 20 ml de CN se inoculó con 500 µl de un cultivo de la cepa receptora *P. aeruginosa* PAO1SR previamente crecido durante 18-24 h a 37°C con agitación constante, posteriormente fue incubado durante 12-14 h a 42 °C con agitación constante. De ambos cultivos se tomaron alícuotas de 500 µl, 1000 µl y 1500 µl y se centrifugaron 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de CN. Con los sedimentos resuspendidos se realizaron mezclas de apareamiento (Donador:Receptor): 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, las cuales se depositaron sobre filtros estériles de nitrato de celulosa (Millipore) de diámetro de poro 0.45 µm previamente colocados sobre placas con AN. Las placas se incubaron durante 18-24 h a 37°C. Cada filtro fue suspendido en 3 ml de CN y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Se espatularon 100 µl de las suspensiones en medio selectivo de AN con 100 µg/ml de estreptomicina (Sm) y 30 µg/ml de gentamicina (Gm). Las placas se incubaron durante 18-24 h a 37 °C y las colonias resultantes se sometieron a pruebas de susceptibilidad en medio sólido.

## **7. Pruebas de susceptibilidad en medio sólido**

Se prepararon placas de AN con Gm (30 µg/ml)/Sm (100 µg/ml), HgCl<sub>2</sub> (0.1 mM), ciprofloxacina (0.2 µg/ml) y AN sin adiciones. Se sembraron por picadura las colonias obtenidas de la mutagénesis por transposición al azar y se incubaron a 37°C durante 18 h.

### **8. Pruebas de susceptibilidad en medio líquido**

De un cultivo de 4 ml de CN crecido durante la noche se tomaron 40 µl para inocular tubos con 4 ml de CN con concentraciones crecientes de ciprofloxacina (Cp), levofloxacina (Lv) o HgCl<sub>2</sub>. Los tubos se incubaron 18 h a 37°C con agitación constante y la susceptibilidad se determinó en función de la turbidez de los cultivos al medir la absorbencia a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

### **9. Purificación de DNA total**

Se recuperó la pastilla celular de un cultivo crecido toda la noche, centrifugando 3 min y desechando el sobrenadante, la pastilla se lavó en 1 ml de solución TE (Tris-EDTA). Se resuspendió la pastilla en 450 µl de solución TE, se agregó 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló y se incubó 30 min a 37°C. Se adicionaron 25 µl de pronasa (pronasa E o proteinasa K, 20 mg/ml), se mezcló e incubó 15 min a 37°C. Se agregaron 50 µl de SDS 10%, se mezcló e incubó 15 min a 37°C. Se calentó la solución de CTAB/NaCl (bromuro de cetiltrimetilamonio/cloruro de sodio, 20%) a 65°C. Se adicionaron 100 µl de NaCl 5M, se mezcló y se incubó a 65°C por 5 min. Se agregaron 80 µl de solución CTAB/NaCl, se mezcló y se incubó 10 min a 65°C. Se adicionaron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló hasta homogenizar y se centrifugó 5 min a 10000 rpm. Se transfirió la fase acuosa y se agregó 500 µl de fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), se mezcló y centrifugó 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 1 ml de

etanol absoluto. Se mantuvo 20 min a -80 °C. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min. Se lavó la pastilla 3 veces con etanol 70%. Se secó la pastilla y se resuspendió en 45 ml de buffer TE, se agregaron 5 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 15 min. Se inactivó la RNasa a 65°C durante 15 min. Se corrió de 2-5 µl del DNA purificado en un gel de agarosa.

## 10. Secuenciación

El DNA purificado se diluyó a la concentración adecuada y se envió para su secuenciación al CINVESTAV. Irapuato.

Para la secuenciación de los fragmentos interrumpidos por el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* se empleó el oligonucleótido MarOUT (**Tabla 1**) el cual está diseñado con base en los extremos repetidos invertidos del transposón (Wong y Mekalanos, 2000).

Las secuencias de nucleótidos se compararon con la secuencia del plásmido pUM505 empleando el software Vector NTI Advance 11.5.2 (Life Technologies).

## 11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El procedimiento de amplificación de los genes de interés se llevó a cabo empleando un termociclador de gradiente MultiGene (Labnet International, Inc.).

Para las reacciones de PCR se utilizó DNA a una concentración aproximada de 200 ng/ml, 10 picomoles de los oligonucleótidos específicos, 12.5 µl de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y dNTPs a concentraciones optimizadas en un volumen final de 25 µl. Para la amplificación de los diferentes genes se siguieron las siguientes especificaciones:

Para el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* se empleó el oligonucleótido MarIN (**Tabla 1**) el cual está

diseñado con base en las secuencias repetidas invertidas del transposón (Wong y Mekalanos, 2000). La mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 56°C por 45 seg, polimerización a 72°C por 1 min y a un ciclo final de polimerización a 72°C por 5 min.

Para el caso del gen *chrA*, se utilizaron los oligonucleótidos Dir-*chrA* y Rev-*chrA* (**Tabla 1**), la mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 58°C por 45 seg y polimerización a 72°C por 1.5 min, y finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 5 min.

Para el gen *merA*, se utilizaron los oligonucleótidos Dir-*merA* y Rev-*merA* (**Tabla 1**), la mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 60°C por 30 seg y polimerización a 72°C por 40 seg, y finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 5 min.

Para el *orf57*, se utilizaron los oligonucleótidos Dir-*orf57* y Rev-*orf57* (**Tabla 1**), la mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 52°C por 30 seg y polimerización a 72°C por 1.5 min, y finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 5 min.

Para el *orf131*, se utilizaron los oligonucleótidos Dir-*orf131* y Rev-*orf131* (**Tabla 1**), la mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 50°C por 30 seg y polimerización a 72°C por 45 seg, y finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 5 min.

## **12. Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de los productos de PCR y del DNA plasmídico se realizó en geles de agarosa (Sigma) a una concentración de 1% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M (pH 7.5) y EDTA (Ácido etilendiamino tetracético) 0.5 M (pH 8.0)). Los geles se depositaron en una cámara de electroforesis horizontal, conteniendo TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con solución amortiguadora [azul de bromofenol 0.05%, EDTA 0.1 M (pH 8.0), SDS (dodecil sulfato de sodio) 5% y sacarosa 40%] y se colocaron en los orificios del gel. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 125 voltios por un periodo de 30-40 min. Posteriormente los geles se teñieron con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas teñidas se observaron en un transluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc). Los marcadores de tamaño molecular que se utilizaron fueron el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* y el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

### **13. Purificación de DNA en geles de agarosa**

Para purificar el DNA que se utilizó en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. La presencia y concentración del DNA recuperado se verificó en un gel de agarosa al 1% (p/v) comparando con el marcador de tamaño molecular.

### **14. Tratamientos enzimáticos**

Para realizar las técnicas de ligación del DNA y posterior clonación en un vector, el DNA tiene que ser sometido a diferentes tratamientos enzimáticos, los cuales se describen a continuación:

#### **14.1. Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt**

Los productos de PCR se ligaron en el vector pJET 1.2/Blunt manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) empleando el kit comercial CloneJET™ PCR Cloning kit (Fermentas) siguiendo las indicaciones del proveedor.

#### **14.2. Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20**

Los fragmentos de DNA purificados se ligaron con el vector pUCP20 manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando una unidad de la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.

#### **14.3. Restricción con endonucleasas**

El DNA purificado se digirió utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por cada µg de DNA, se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en geles de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

#### **14.4. Desfosforilación**

El DNA de plásmidos utilizados como vectores se desfosforiló adicionando una unidad de fosfatasa alcalina (Boehringer) por cada pmol de extremo 5'fosforilado, se incubó por una hora a 37°C y se inactivó a 65°C por 15 min.

#### **15. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina**

Para el aislamiento de plásmidos se utilizó el método de lisis (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo:

Un cultivo bacteriano crecido en 4 ml de CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante se centrifugó durante 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM), y se le adicionó 20 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 300 µl de la solución lítica recién preparada (NaOH 0.2N y SDS 1%), se mezcló suavemente y se mantuvo durante 10 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se le adicionó 300 µl de la solución de acetato de potasio 3M pH 4.8, se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se adicionaron 500 µl de la mezcla fenol:cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior, se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 20 min a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. El sedimento se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 12,000 rpm entre cada lavado, se recuperó el sedimento y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla de DNA obtenida en 50 µl de agua desionizada y estéril. Se adicionó 5 µl de RNasa y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la RNasa incubando 15 min a 65°C. Las muestras se almacenaron a -20°C y se sometieron a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

## **16. Transformación con plásmidos recombinantes**

La transformación de células competentes con plásmidos recombinantes se llevó a cabo por el método de electroporación.

### **16.1. Preparación de células competentes de *E. coli***

Para la preparación de células competentes se creció la cepa en 4 ml de CL a 37°C con agitación constante durante 18-24 h. Posteriormente se inoculó 250 ml de CL con los 4 ml del preinóculo y se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 590 nm. Posteriormente el cultivo se colocó en hielo por 20 min y a partir de este punto se mantuvieron siempre a una temperatura cercana a 4°C. Se centrifugó el cultivo por 10 min a 6,000 rpm a 4°C. La pastilla celular se lavó dos veces con 40 ml de agua desionizada, estéril y fría, centrifugando 10 min a 6,000 rpm a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% estéril y frío y se almacenaron en alícuotas de 200 µl a -80°C.

### **16.2. Preparación de células competentes de *P. aeruginosa* y *E. coli***

Para la preparación de células competentes de *P. aeruginosa* y de *E. coli* se siguió el método adaptado de Enderle y Farwell, (1988), el cual se describe a continuación:

Se crecieron los cultivos en placas de AL durante 18-24 h a 37°C y posteriormente se transfirió una asada de células con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Las células se resuspendieron en vórtex hasta que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante. La 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 desionizada estéril.

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

A 100 µl de células competentes se les adicionó 1 µl de DNA a una concentración aproximada de 40 ng/µl; la mezcla se colocó en una celda para electroporación 215 (Eppendorf); la mezcla se sometió a un pulso eléctrico de 1.8 kilovoltios y se transfirió inmediatamente a un tubo con 2 ml de CL incubándose por 1 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl del cultivo en placas de AL selectivo (100 µg/ml de ampicilina para *E. coli* y 400 µg/ml de carbenicilina para *P. aeruginosa*) incubándose a 37°C durante toda la noche.

### **17. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Para los ensayos de HPLC la muestra se preparó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

De un cultivo crecido durante 18-24 h a 37°C con agitación constante se realizó una dilución 1:50 en medio mínimo M9, se incubó a 37 °C con agitación constante y se tomaron muestras de 10 ml a intervalos. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se filtró con un filtro de nitrato de celulosa (Millipore) de diámetro de poro 0.2 µm. Las muestras se etiquetaron y almacenaron a -4°C.

Para procesar los extractos se utilizó el equipo Varian ProStar 410 con las siguientes condiciones: temperatura del horno 50°C, flujo 1.5 ml/min, la longitud de onda del detector de Ultravioleta se ajustó a 210-285 nm. Se utilizó la columna Sephasil Peptide C18 12µm ST 4.6/250. Como solvente se utilizó agua: ácido fosfórico (1000:0.5).

## VIII. RESULTADOS

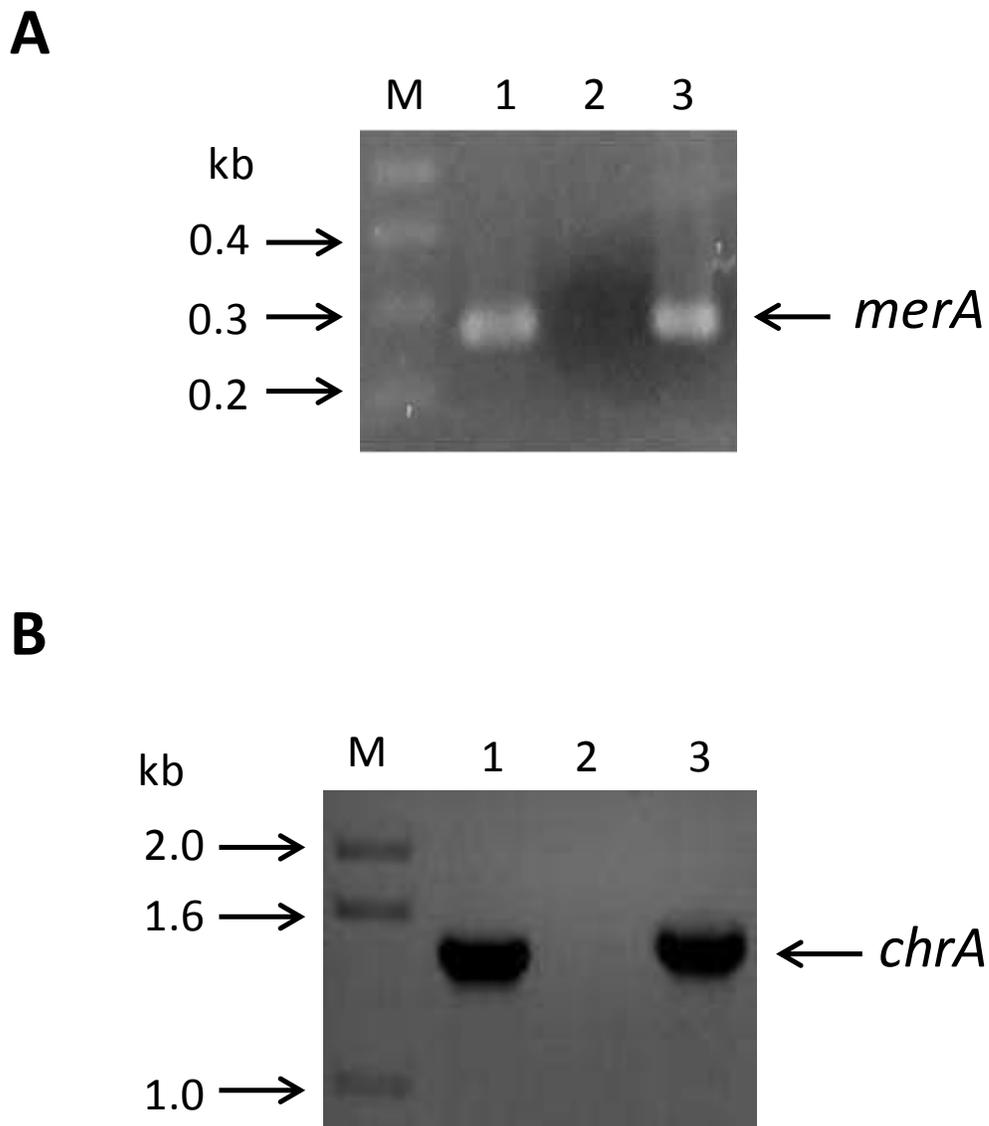
### 1. Transferencia del plásmido pUM505 a la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR

Utilizando la resistencia a estreptomicina de la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR como marcador de selección, se realizó la transferencia del plásmido pUM505 de la cepa donadora, *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505), a la cepa receptora, PAO1SR, mediante conjugación en medio líquido como se describe en Materiales y Métodos. De la conjugación se obtuvieron colonias transconjugantes de PAO1SR (pUM505), las cuales se crecieron en placas de AN con HgCl<sub>2</sub> (0.1mM) y Sm (100 µg/ml) para confirmar el fenotipo de la cepa PAOSR y el conferido por el plásmido pUM505.

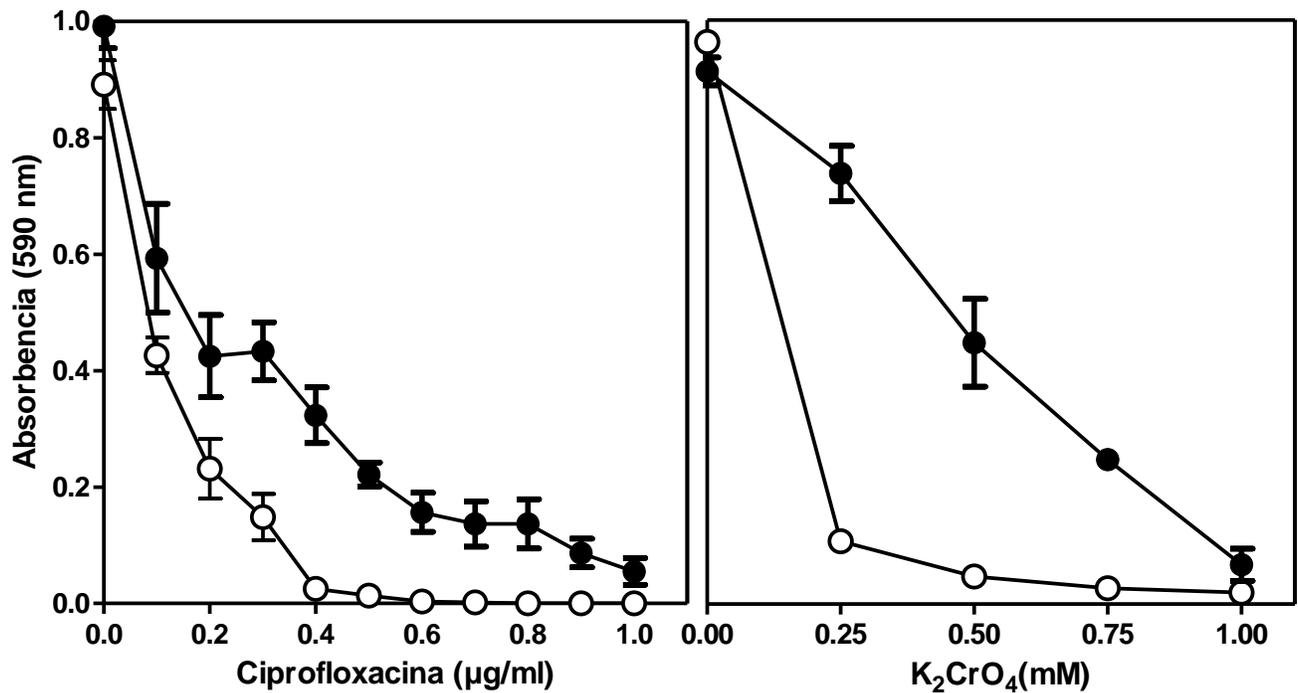
Para tener mayor certeza de la transferencia del plásmido se realizó la amplificación de los genes *merA* y *chrA* de pUM505, los productos de PCR fueron sometidos a corrimiento electroforético en un gel de agarosa. Se observó una banda de aproximadamente 250 pares de bases (pb) correspondiente a un fragmento del gen *merA* y una banda de aproximadamente 1.5 kilobases (kb) que corresponde al gen *chrA* (**Figura 14**), tamaños predichos por la localización de los oligos utilizados.

Para verificar el fenotipo conferido por el plásmido pUM505 se realizaron pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina y a cromato. Las cepas se crecieron en concentraciones de 0.0 a 1.0 µg/ml de ciprofloxacina y de 0.0 a 1.0 mM de cromato, utilizando como control sensible la cepa PAO1SR. La cepa PAO1SR (pUM505) mostró mayor crecimiento en presencia de ciprofloxacina y de cromato comparado con el control sensible (**Figura 15**).

### 2. Obtención de mutantes sensibles a ciprofloxacina



**Figura 14. Amplificación mediante PCR de los genes *merA* y *chrA*.** Fotografía del gel de agarosa que muestran los fragmentos de los genes *merA* (A) y *chrA* (B). M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles de 1 a 3, producto de PCR del DNA de PAO1 (pUM505), PAO1SR y PAO1SR (pUM505) respectivamente. Las flechas de la derecha indican las posiciones de las bandas esperadas.



**Figura 15. Susceptibilidad a ciprofloxacina y cromato de *P. aeruginosa* PAO1SR y PAO1SR (pUM505).** Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante y se les adicióno ciprofloxacina o cromato a las concentraciones indicadas. La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. PAO1SR (o) y PAO1SR (pUM505) (●). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 6 (A) y n=4 (B).

Para identificar los genes responsables del fenotipo de resistencia a ciprofloxacina, se generó un banco de mutantes de PAO1SR (pUM505) mediante el método de mutagénesis por transposición al azar utilizando el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>*, como se describe en Materiales y Métodos. Las mutantes por transposición al azar se seleccionaron por su capacidad de crecer en placas de AN con Gm (30µg/ml)/Sm (100µg/ml).

### **3. Selección de mutantes sensibles a ciprofloxacina**

Se generaron 12,000 mutantes por transposición al azar, las cuales fueron sometidas a un escrutinio para seleccionar a las mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp<sup>S</sup>). La selección se realizó sembrando a las colonias por picadura en placas de AN con Gm/Sm, como marcador de la presencia del transposón y el fondo genético de PAO1SR; HgCl<sub>2</sub> (0.1 mM), para confirmar la presencia del plásmido pUM505 y ciprofloxacina (0.2 µg/ml), como antibiótico de interés; finalmente se agregó una caja de AN como control positivo de crecimiento. Se seleccionaron las mutantes que crecieron en todas las placas excepto en ciprofloxacina. De este escrutinio se obtuvieron 12 mutantes las cuales se denominaron Cp<sup>S</sup> y se les asignó una clave numérica (4-55, 13-23, 14-26, 35-78, 59-93, 62-25, 65-45, 79-30, 95-02, 97-44, 97-47 y 105-67).

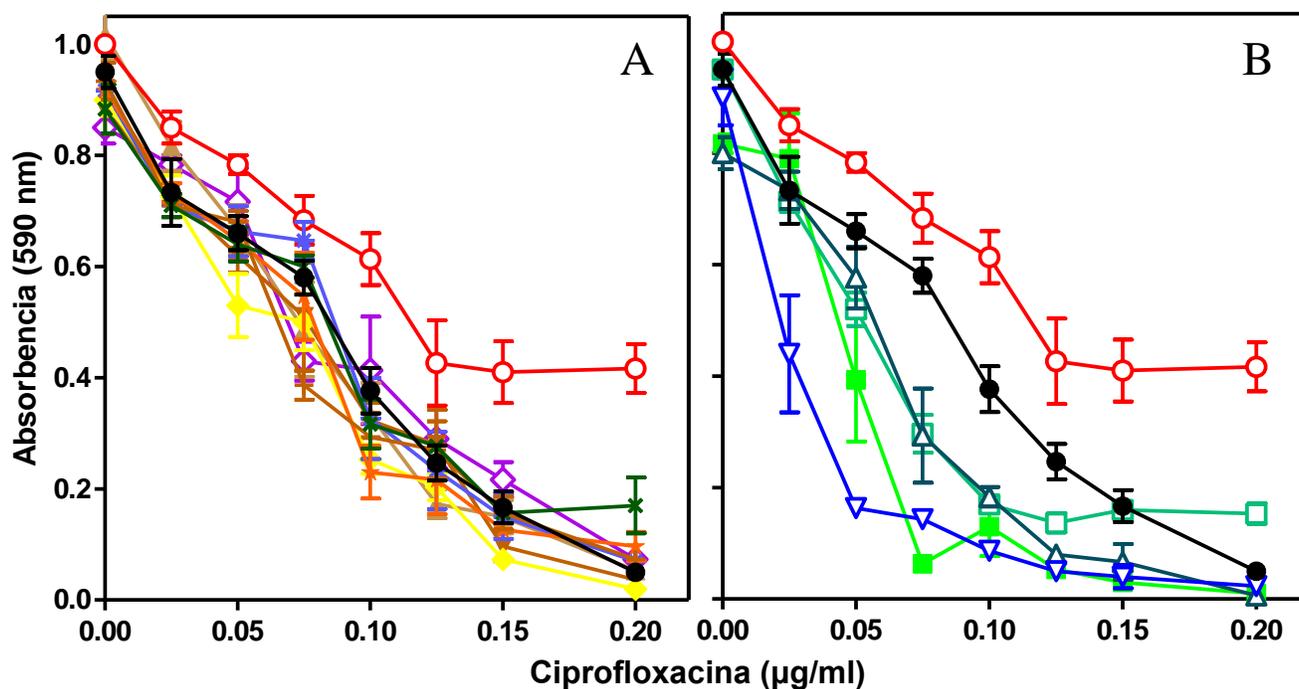
### **4. Susceptibilidad a ciprofloxacina en medio líquido**

Para verificar que las mutantes Cp<sup>S</sup> seleccionadas son efectivamente sensibles a Cp se realizaron pruebas de susceptibilidad al antibiótico, ya que durante la selección inicial sólo se empleó una concentración del fármaco. Las mutantes Cp<sup>S</sup> se crecieron en concentraciones crecientes de Cp utilizando como control resistente la cepa PAO1SR (pUM505) y como control sensible la cepa PAO1SR. El resultado de las pruebas de

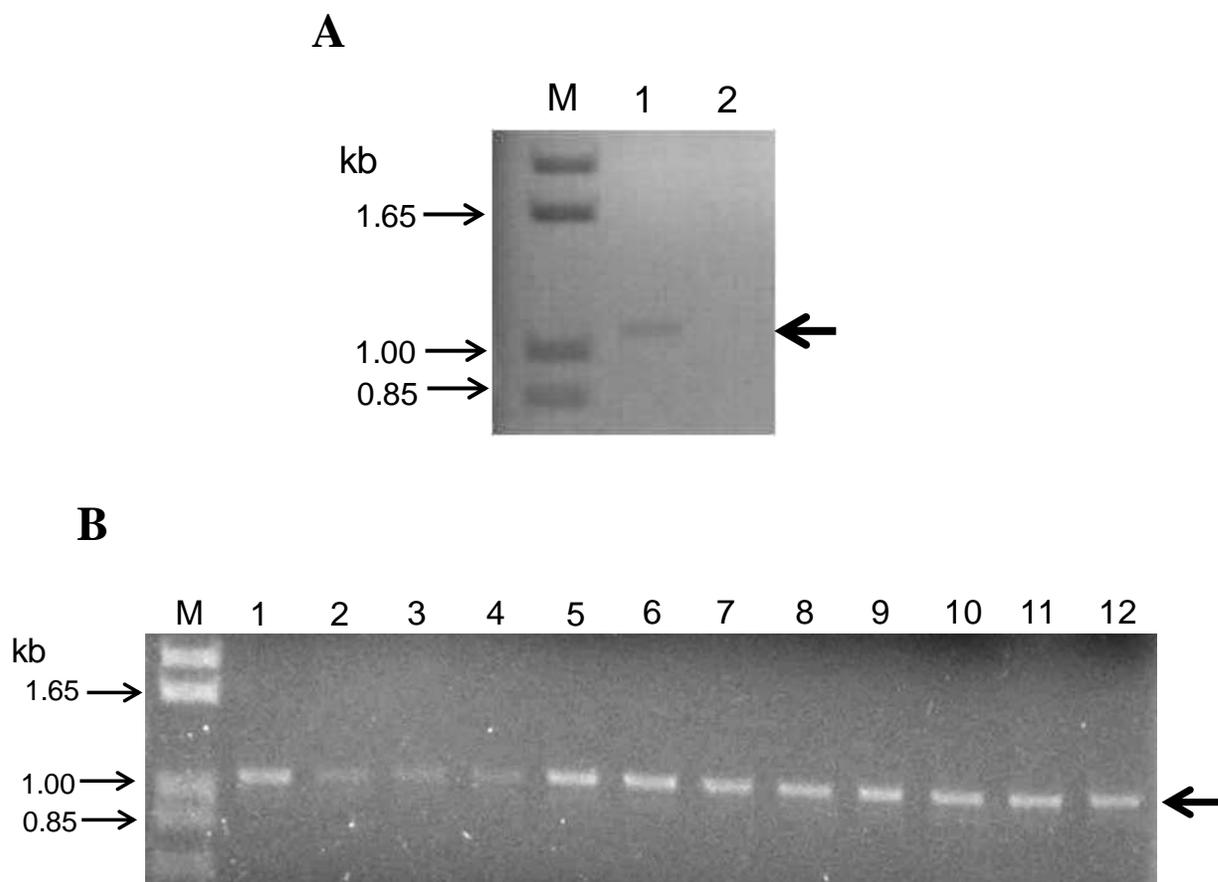
susceptibilidad a Cp fue que el crecimiento de todas las mutantes fue menor, comparado con el control resistente. El crecimiento de las mutantes 4-55, 13-23, 4-26, 79-30, 95-02, 97-44, 97-47 y 105-67 fue similar al control sensible, mientras que el crecimiento de las mutantes 35-78, 56-93, 62-25 y 65-45 fue menor que el control sensible, por lo tanto las mutantes seleccionadas son efectivamente sensibles a Cp, además, basado en este comportamiento las mutantes se dividieron en sensibles (**Figura 16A**) e hipersensibles (**Figura 16B**) a Cp respectivamente.

### 5. Amplificación del transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* mediante PCR

Para verificar la presencia del transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* en las mutantes Cp<sup>S</sup> y poder establecer una relación entre la susceptibilidad a ciprofloxacina y la presencia del mismo, se realizó la amplificación mediante PCR a partir del DNA total de las mutantes Cp<sup>S</sup> utilizando el oligonucleótido MarIN. Como control positivo se utilizó DNA total de la cepa *E. coli* S17-1 (pFAC) y como control negativo DNA total de la cepa PAO1SR (pUM505). Los productos del PCR fueron sometidos a corrimiento electroforético en un gel de agarosa para ser analizados. En el control positivo se observó una banda del tamaño esperado de aproximadamente 1 kb, y para el control negativo no se observó ninguna banda (**Figura 17A**), lo cual nos indica que la amplificación es específica para el transposon *Himar1::Gm<sup>R</sup>*. Para el caso de todas las mutantes Cp<sup>S</sup>, se observó un fragmento de aproximadamente 1 kb (**Figura 17B**) lo cual nos confirma que el transposón se encuentra presente en todas las mutantes Cp<sup>S</sup> y que existe una relación entre la inserción del transposon y la sensibilidad a Cp de las mutantes.



**Figura 16. Susceptibilidad a ciprofloxacina de las mutantes Cp<sup>S</sup>.** Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de ciprofloxacina indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. PAO1SR (●), PAO1SR (pUM505) (○). (A) Mutantes sensibles: Cp<sup>S</sup>: 4-55 (▲), 13-23 (▼), 14-26 (◆), 79-30 (◇), 95-02 (\*), 97-44 (★), 97-47 (+) y 105-67 (×). (B): Mutantes hipersensibles Cp<sup>S</sup>: 35-78 (■), 56-93 (□), 62-25 (△) y 65-45 (▽). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3.



**Figura 17. Amplificación del transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>*.** (A) Fotografía del gel de agarosa en la que se muestran los fragmentos amplificados mediante PCR de los controles. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb, 1; producto de la amplificación del DNA de *E. coli* S17-1 (pFAC); 2, producto de la amplificación del DNA de *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505). (B) Fotografía del gel de agarosa en el que se muestran los fragmentos amplificados mediante PCR de las mutantes Cp<sup>S</sup>. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles de 1-12 mutantes Cp<sup>S</sup>. La flecha de la derecha indica la amplificación esperada de 1 kb.

## **6. Identificación de los genes interrumpidos por el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* en las mutantes Cp<sup>S</sup>**

Para identificar a el o a los genes responsables del fenotipo de susceptibilidad en las mutantes Cp<sup>S</sup>, se realizó la secuenciación de un fragmento de los genes interrumpidos por el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* en las mutantes Cp<sup>S</sup>. Se utilizó el oligonucleótido MarOUT y DNA total de las mutantes Cp<sup>S</sup>. Se logró secuenciar el gen interrumpido en seis mutantes (4-55, 12-23, 14-26, 35-78, 65-45 y 74-30) y cada una de las secuencias obtenidas se alineó con la secuencia del plásmido pUM505 para identificar los genes responsables de la susceptibilidad a ciprofloxacina. Se encontró que la inserción del transposón en las mutantes Cp<sup>S</sup> ocurrió en diferentes genes que están distribuidos principalmente en la isla de resistencia a metales de pUM505 formando dos posibles operones, uno conformado por los *orf57*, *orf58* y *orf59* y otro por los *orf85*, *orf86* y *orf87* (**Figura 18**).

## **7. Análisis *in silico* de las secuencias los genes interrumpidos en las mutantes Cp<sup>S</sup>**

Para determinar si los genes interrumpidos en las mutantes Cp<sup>S</sup> se parecen a genes ya reportados se realizó una búsqueda tipo Blast.

En el posible operón comprendido por los *orf57*, *orf58* y *orf59*, se encontró que los tres genes presentan identidad con integrasas/recombinasas, sin embargo, el *orf58* además de presentar un porcentaje relativamente bajo de identidad (33%), no presenta un dominio conservado relacionado con esta función (**Tabla 2**). Además, se identificó una probable región promotora localizada 45 pb de bases río arriba del codón de inicio del *orf57* y no se identificó ningún otra región promotora río arriba de los *orf58* y *orf59*.

En el posible operón constituido por los *orf85*, *orf86* y *orf87*, se encontró que los tres genes

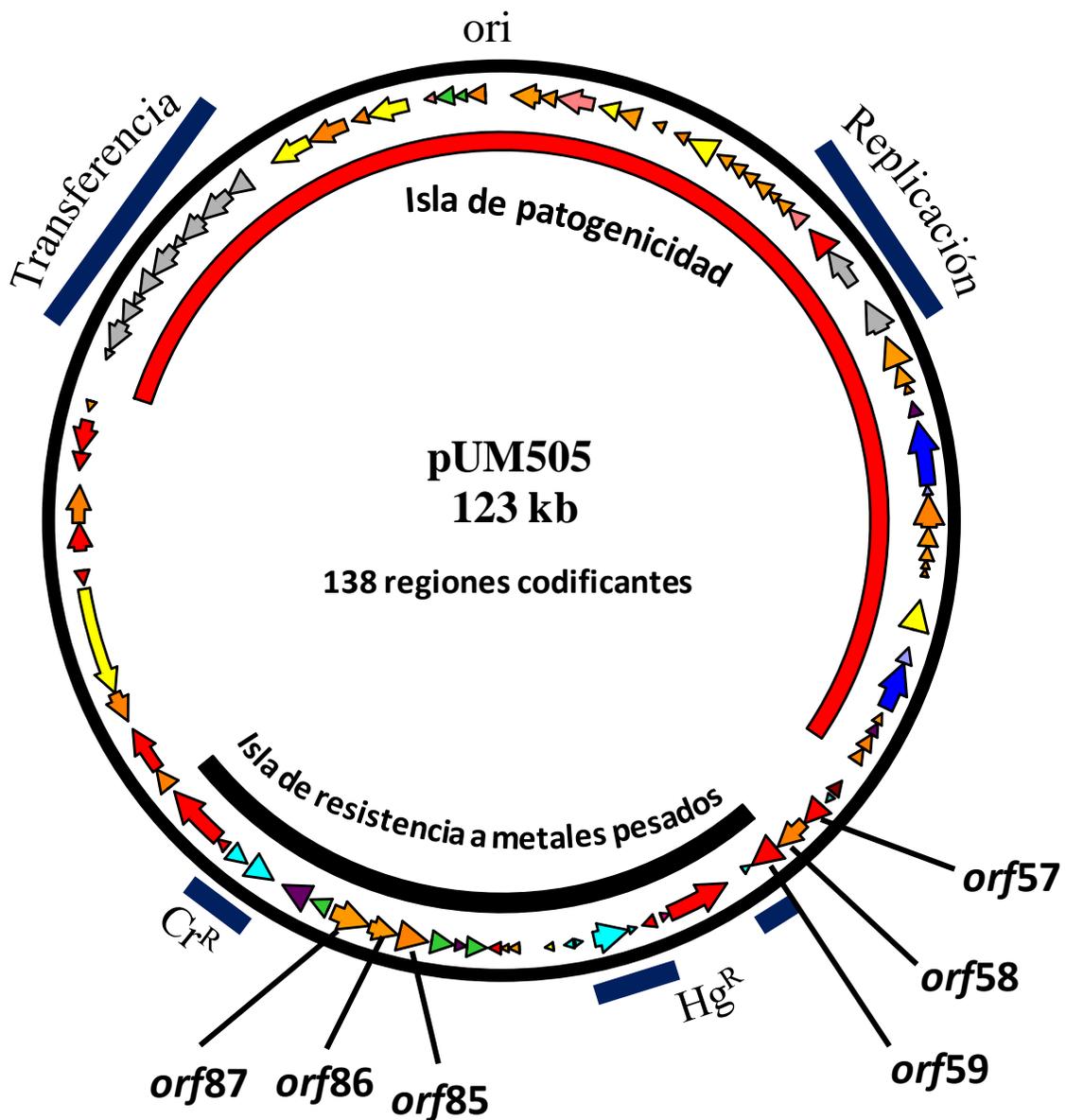


Figura 18. Posición de los genes identificados en el mapa genético del plásmido pUM505.

Esquema del mapa genético del plásmido pUM505 indicando donde se localizan los genes interrumpidos en las mutantes Cp<sup>S</sup> (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

**Tabla 2. Funciones predichas para los productos de los genes interrumpidos en las mutantes Cp<sup>S</sup>**

Mutante	Gen	Función	Organismo	Dominios conservados	Identidad (%)
12-23	<i>xerC</i> <sup>1</sup>	Integrasa	<i>Pseudomonas putida</i>	Integrasa/ Recombinasa	95
4-55/14-26	<i>Orf58</i>	Integrasa	<i>Burkholderia sp</i>	-	33
74-30	<i>xerC</i> <sup>2</sup>	Recombinasa sitio específico	<i>P. aeruginosa</i>	Recombinasa sitio específico	99
-	<i>Orf85</i>	Proteína de membrana	<i>Cupriavidus sp</i>	No caracterizado	45
-	<i>Orf86</i>	Proteína hipotética	<i>P. aeruginosa</i>	No caracterizado	100
35-78/65-45	<i>orf87</i>	Lipoproteína	<i>P. aeruginosa</i> PA7	No caracterizado	38

<sup>1</sup>*orf57*

<sup>2</sup>*orf59*

El alineamiento de las secuencias obtenidas en las mutantes Cp<sup>S</sup> se realizó con el software Vector NTI Advance 11.5.2.

Base de datos consultada en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

presentan un dominio conservado no caracterizado. Los *orf85*, y *orf87* presentan identidad con proteínas de membrana, sin embargo, para *orf86* no se encontró identidad que no sea la de una proteína hipotética (**Tabla 2**). Además, se identificó una región promotora 222 pb río arriba del codón de inicio del *orf87* y no se identificó ninguna otra región promotora río arriba de los *orf86* y *orf85*.

De las secuencias de ambos operones se realizó un análisis *in silico* para conocer la probable localización intracelular, si presentan probables segmentos transmembranales y la búsqueda de péptido señal de las proteínas codificadas por ese grupo de genes. El análisis se llevó a cabo con los programas SOSUI y TOPPED. Las tres proteínas codificadas por el operón donde se localizan los genes *xerC* presentan localización citoplasmática y son proteínas solubles y, aunque la predicción es que presentan segmentos transmembranales, no muestran péptido señal. El análisis del operón 85-87 predice que las proteínas codificadas por los *orf85* y *orf86* podrían estar localizadas en el periplasma mientras que la proteína codificada por *orf87* podría localizarse en la membrana externa.

## **8. Clonación del gen *xerC* del plásmido pUM505**

El gen *xerC* (*orf57*) fue identificado en las mutantes Cp<sup>S</sup> obtenidas mediante transposición al azar. Para comprobar que el gen *xerC* está relacionado con el fenotipo de susceptibilidad al antibiótico en la mutante Cp<sup>S</sup>, se clonó el gen y se transformó con en el plásmido recombinante la mutante interrumpida en dicho gen.

Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos se realizó la amplificación y clonación del gen *xerC*. Con la finalidad de verificar la correcta ligación del gen *xerC* en el vector pJET 1.2/blunt se realizó la digestión con la enzima de restricción *HindIII* y se

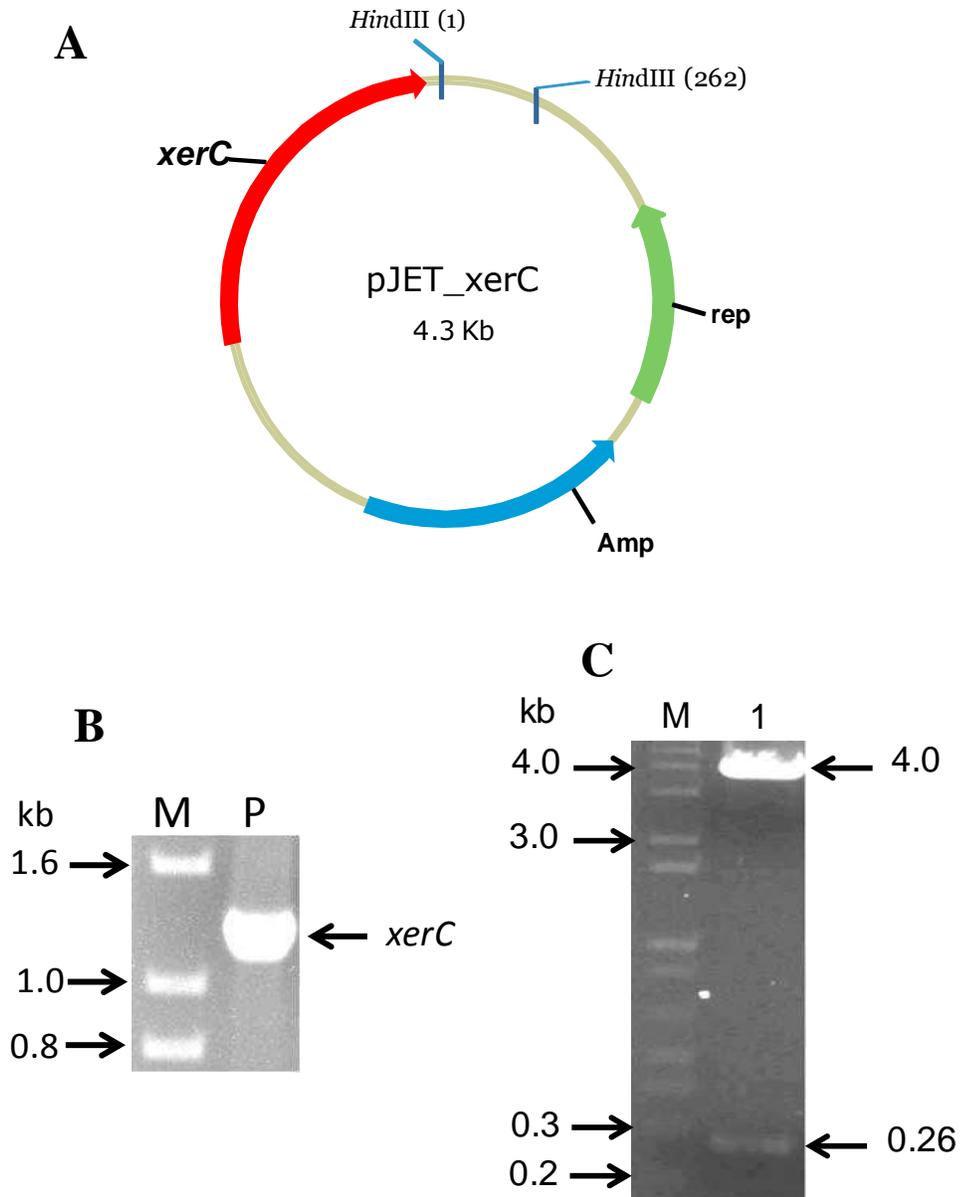
obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados de aproximadamente 4.0 y 0.26 kb (Figura 19).

### 9. Subclonación del gen *xerC* en el vector pUCP20

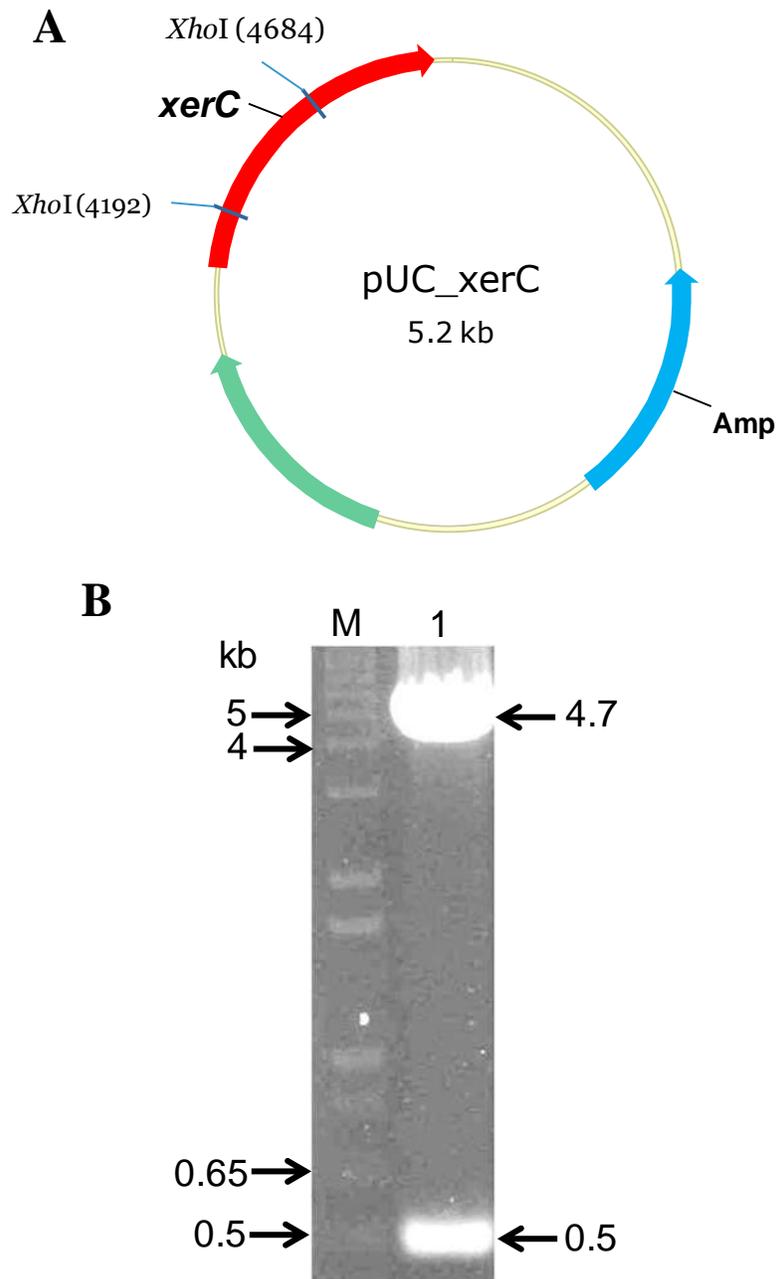
Con la finalidad de complementar la mutante afectada en el gen *xerC* (Cp<sup>S</sup> 13-23), se realizó la subclonación del gen *xerC* en el vector de expresión binaria pUCP20. Para ello se realizó la digestión del plásmido pJET\_*xerC* con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, liberando el inserto y de esta manera poder dirigir la ligación del gen *xerC* en el vector pUCP20 de acuerdo al método descrito en Materiales y Métodos. Se obtuvo el plásmido recombinante pUC\_*xerC* (Figura 20A), el cual se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* JM101. Con la finalidad de verificar que la subclonación del gen *xerC* en el vector pUCP20 se llevó a cabo de manera adecuada, se realizó la digestión con la enzima de restricción *Xho*I y de acuerdo al corrimiento electroforético se obtuvieron las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 4.7 y 0.5 kb (Figura 20B). Se realizó la transferencia del plásmido pUC\_*xerC* mediante electroporación a células competentes de la mutante Cp<sup>S</sup> 13-23 afectada en el gen *xerC*.

### 10. Pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina en la mutante Cp<sup>S</sup> complementada

Para comprobar si el gen *xerC* está relacionado con el fenotipo de susceptibilidad observado en la mutante Cp<sup>S</sup> 13-23, la cual fue nombrada *xerC*<sup>-</sup>, se realizaron los ensayos de susceptibilidad al antibiótico en medio líquido de la mutante complementada con el gen *xerC* silvestre. Se utilizó como control resistente la cepa PAO1SR (pUM505) y como control sensible la cepa Cp<sup>S</sup> *xerC*<sup>-</sup> (pUCP20).



**Figura 19. Clonación del gen *xerC* en el vector pJET 1.2/Blunt.** A. Mapa genético del plásmido pJET\_xerC. Se muestran los sitios de corte de la enzima de restricción *HindIII* y su posición entre paréntesis. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR del gen *xerC*; M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; P, producto del PCR del gen *xerC*; se muestra la banda de aproximadamente 1.3 kb. C. Digestión enzimática del plásmido pJET\_xerC. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; D, producto de la digestión con la enzima de restricción *HindIII*; en el lado derecho se muestran las bandas del tamaño esperado de aproximadamente 4.0 y 0.26 kb.



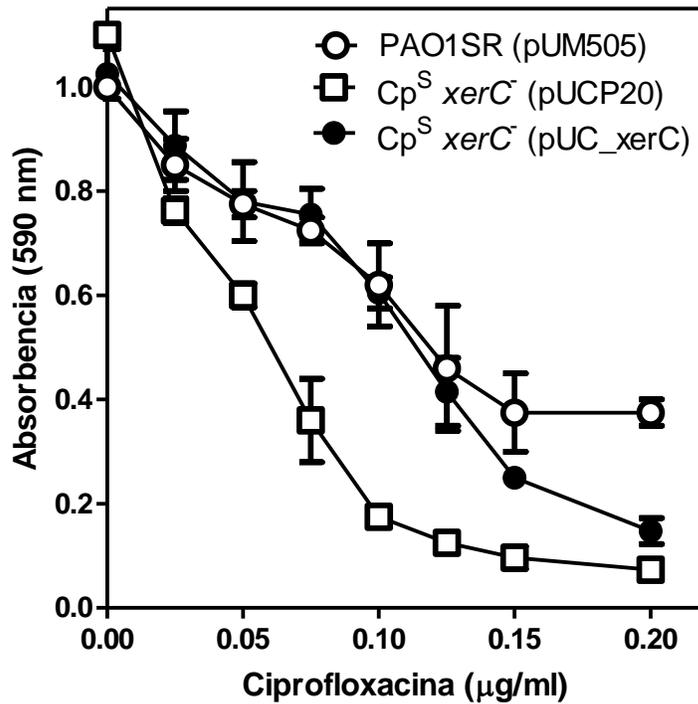
**Figura 20. Subclonación del gen *xerC* en el vector pUCP20. A.** Mapa genético del plásmido pUC\_*xerC*; se muestran los sitios de corte de la enzima de restricción *XhoI*. **B.** Gel de agarosa donde se muestra la restricción con la enzima *XhoI*, M, marcador de tamaño molecular de 1kb; D producto de la digestión con *XhoI*. A la derecha se muestran las bandas del tamaño esperado de aproximadamente 4.7 y 0.5 kb.

En las pruebas de susceptibilidad a Cp, se observó que el crecimiento de la mutante complementada Cp<sup>S</sup> xerC<sup>-</sup> (pUC\_xerC) se incrementó con respecto del control sensible y se comportó de manera similar al control resistente (**Figura 21**).

### **11. Análisis del *orf131* del plásmido pUM505**

Se realizó un análisis de la secuencia del plásmido pUM505 y se identificó que el *orf131* muestra similitud con una enzima aminoglucósido fosfotransferasa de *Mycobacterium smegmatis*. Debido a que se encuentra reportada que la enzima aminoglucósido acetiltransferasa Aac(6)-Ib-cr confiere resistencia a quinolonas (Robicsek y col., 2006), se decidió realizar un análisis más detallado.

El análisis tipo Blast mostró que la proteína codificada por el *orf131* muestra similitud con porcentajes altos (100% o cercanos) con proteínas hipotéticas y con un porcentaje de 40% de similitud en una región de 42 aa con la enzima aminoglucósido fosfotransferasa de *Mycobacterium smegmatis*. Además, se encontró que el *orf131* origina probablemente una proteína soluble de localización citoplasmática (**Tabla 3**). El tamaño de la probable proteína codificada por el *orf131* es de 65 aminoácidos mientras que el de la proteína de *M. smegmatis* es de 225 aminoácidos (**Tabla 3**). Debido a la gran diferencia de tamaños nos dimos a la tarea de identificar proteínas pertenecientes a la familia de las aminoglucósido fosfotransferasas con menor tamaño, encontrando a la proteína aminoglucósido fosfotransferasa (APH-IIb) de *P. aeruginosa* M18 de 79 aminoácidos, que confiere resistencia a los aminoglucósidos gentamicina y kanamicina (Wu y col., 2011). Se realizó un alineamiento utilizando el programa ClustalW y se encontró que la proteína codificada por el *orf131* del plásmido pUM505 tiene una identidad de tan solo 18% y una similitud de



**Figura 21. Susceptibilidad a ciprofloxacina de la mutante Cp<sup>S</sup> xerC<sup>-</sup> complementada con el gen *xerC* de pUM505.** Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de ciprofloxacina indicadas y se midió la absorbancia a 590 nm. PAO1SR (pUM505) (○), Cp<sup>S</sup> xerC<sup>-</sup> (pUCP20) (□) y Cp<sup>S</sup> xerC<sup>-</sup> (pUC\_xerC) (●) Se muestran las barras de error estándar de la media, n=4.

**Tabla 3. Análisis *in silico* de la proteína codificada por el *orf131***

<b>Proteína</b>	<b>Tamaño (aa)</b>	<b>Función</b>	<b>Organismo</b>	<b>Similitud (%)</b>	<b>Localización celular</b>
Orf131	65	Aminoglucósido fosfotransferasa	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	40	Citoplasma

El análisis se realizó en los servidores: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/> y <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>.

por el *orf131* del plásmido pUM505 tiene una identidad de tan solo 18% y una similitud de 26% con la proteína de *P. aeruginosa* M18 (**Figura 22**). Sin embargo, la búsqueda de residuos catalíticos conservados mostró que la proteína codificada por el *orf131* contiene dos de los ocho residuos conservados identificados en la proteína APH (IIb), la Gly de la posición 7 y la Ile de la posición 26 (**Figura 22**). Aunque la similitud e identidad son bajas la presencia de residuos catalíticos conservados nos indican que la proteína podría ser funcional.

## **12. Clonación del *orf131* del plásmido pUM505**

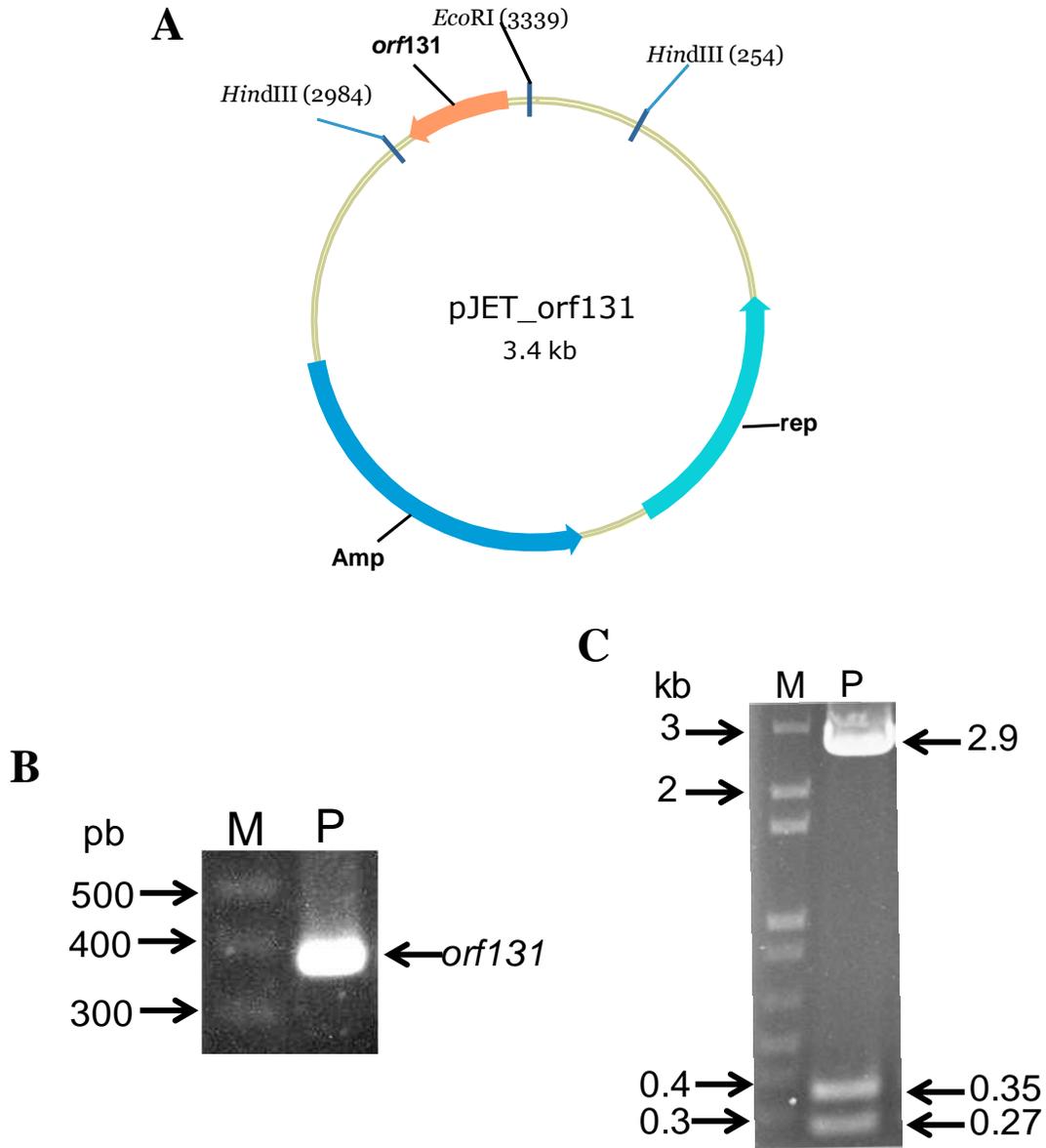
Debido a que el *orf131* codifica una probable aminoglucósido fosfotransferasa, que podría conferir resistencia a quinolonas, éste se clonó y se realizaron pruebas de susceptibilidad a quinolonas.

### **12.1. Clonación del *orf131* en el vector pJET 1.2/blunt**

Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos se realizó la amplificación del *orf131* mediante PCR y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 378 pb. Se realizó la ligación en el vector de recuperación de fragmentos de PCR pJET 1.2/blunt y se obtuvo el plásmido recombinante pJET\_orf131 que se empleó para transformar células competentes de *E. coli* JM101 como se describe en Materiales y Métodos. Con la finalidad de verificar la correcta ligación del *orf131* en el vector pJET 1.2/blunt se realizó la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* y se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados de aproximadamente 2.9, 0.35 y 0.27 kb (**Figura 23**).

### **12.2. Subclonación en el vector pUCP20**





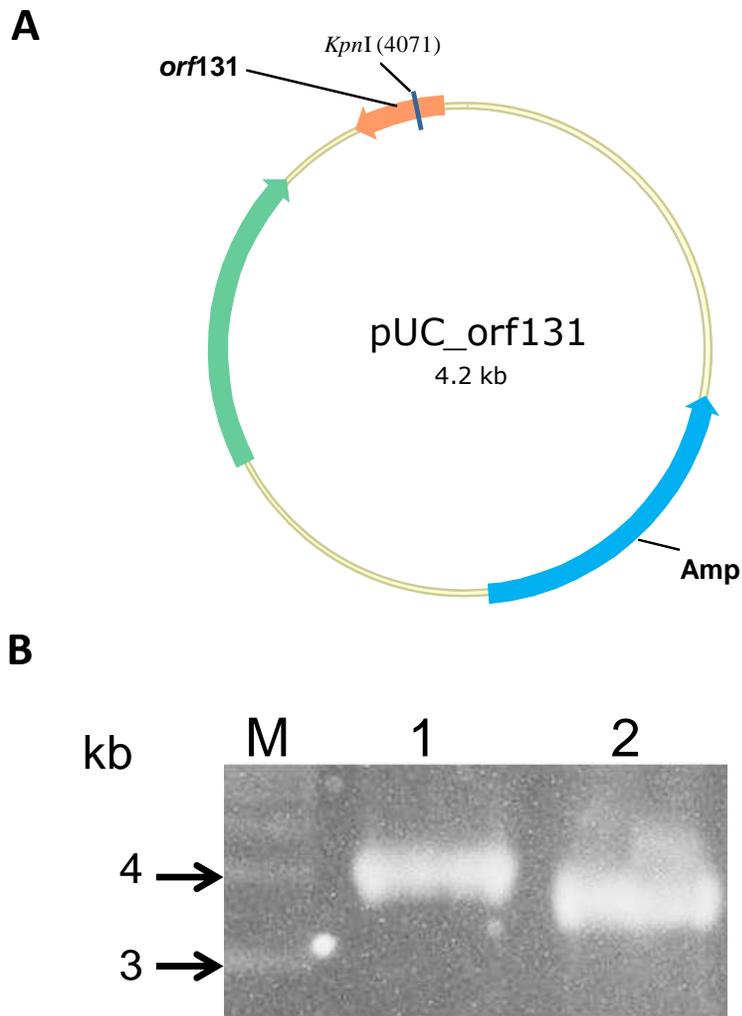
**Figura 23. Clonación del *orf131* en el vector pJET 1.2/Blunt.** **A.** Mapa genético del plásmido pJET\_orf131. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto del PCR del *orf131*; M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; P, producto del PCR del *orf131*; se muestra la banda de aproximadamente 378 pb. **C.** Digestión del plásmido pJET\_orf131 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; D, producto de la digestión con las enzimas de restricción; en el lado derecho se muestran las bandas del tamaño esperado de 2.9, 0.35 y 0.27 kb.

Con la finalidad de realizar pruebas de susceptibilidad a quinolonas tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*, se realizó la subclonación del *orf131* en el vector de expresión binaria pUCP20. Para ello se realizó la digestión del plásmido pJET\_orf131 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, liberando el inserto y dirigiendo la ligación del *orf131* en el vector pUCP20 de acuerdo al método descrito en Materiales y Métodos. Se obtuvo el plásmido recombinante pUC\_orf131 (**Figura 24A**), el cual se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* JM101, como se describe en Materiales y Métodos. Con la finalidad de verificar que la subclonación del *orf131* en el vector pUCP20 se llevo a cabo de manera adecuada, se realizó la digestión con la enzima de restricción *KpnI*. Se obtuvieron las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 4.2 kb; además, se realizó la digestión del vector pUCP20 con la enzima *KpnI* y se obtuvo la banda de tamaño esperado de aproximadamente 3.8 kb (**Figura 24B**). De manera adicional, se secuenció un fragmento del plásmido y se verificó que contiene el *orf131*. Se realizó la transferencia del plásmido pUC\_orf131 mediante electroporación a células competentes de las cepas *E. coli* J53, J53-2 y *P. aeruginosa* PAO1.

### **13. Pruebas de susceptibilidad a quinolonas de las transformantes con el *orf131***

Para comprobar si el *orf131* está relacionado con el fenotipo de resistencia a Cp del plásmido pUM505 se realizaron los ensayos de susceptibilidad al antibiótico en medio líquido de las cepas a las cuales se les transfirió el plásmido pUC\_orf131. Se utilizaron como controles sensibles las cepas J53 (pUCP20), J53-2 (pUCP20) y PAO1 (pUCP20).

En las pruebas de susceptibilidad a Cp, para las cepas J53 y PAO1 se observó que el crecimiento de las cepas que contienen el plásmido pUC\_orf131 disminuye con respecto



**Figura 24. Subclonación del gen *orf131* en el vector pUCP20.** A. Mapa genético del plásmido pUC\_orf131; se muestran los sitios de corte de la enzima de restricción *KpnI*. B. Gel de agarosa donde se muestra la restricción con la enzima *KpnI*, M, marcador de tamaño molecular de 1kb; 1, producto de la digestión de pUC\_orf131 con *KpnI*; 2, producto de la digestión de pUCP20 con *kpnI*.

del control, sin embargo, en la cepa J53-2 se observó que su crecimiento se incrementa con respecto del control (**Figura 25**), por lo tanto, el *orf131* confiere resistencia a Cp cuando se transfiere a la cepa J53-2 y susceptibilidad cuando se transfiere a las cepas J53 y PAO1. Además, para determinar si el fenotipo observado con ciprofloxacina se conserva con otra quinolona, se realizaron pruebas de susceptibilidad a levofloxacina, una quinolona de tercera generación. Para la cepa PAO1 se observó un fenotipo de susceptibilidad similar a las pruebas con Cp (**Figura 25**), mientras que para la cepa J53-2 no se observó diferencia con respecto al control (**Figura 26**), por lo tanto, el *orf131* confiere susceptibilidad a levofloxacina cuando se transfiere a la cepa PAO1.

#### **14. Modificación química de ciprofloxacina inducida por el producto del *orf131***

Para determinar si el producto del *orf131* produce una modificación química en la estructura de la Cp, se hicieron extractos del medio de cultivo (Medio mínimo M9) donde se creció la cepa *E. coli* J53-2 (pUC\_orf131) y como control la cepa *E. coli* J53-2 (pUCP20), ambas tratadas con 0.075 µg/ml del antibiótico. A ambos cultivos se les midió la absorbencia cada hora durante 8 horas para verificar que el crecimiento fuera similar, finalmente los extractos se sometieron a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), como se describe en Materiales y Métodos.

Como resultado del HPLC se determinó que el tiempo de retención de ciprofloxacina es de 6.5 min, como se señala en el cromatograma correspondiente (**Figura 27A**). Se muestran dos tiempos a los cuales se realizó el muestreo, 2 y 6 horas. A las 2 horas no se observa diferencias en el pico correspondiente a ciprofloxacina (**Figura 27B**), sin embargo a las 6

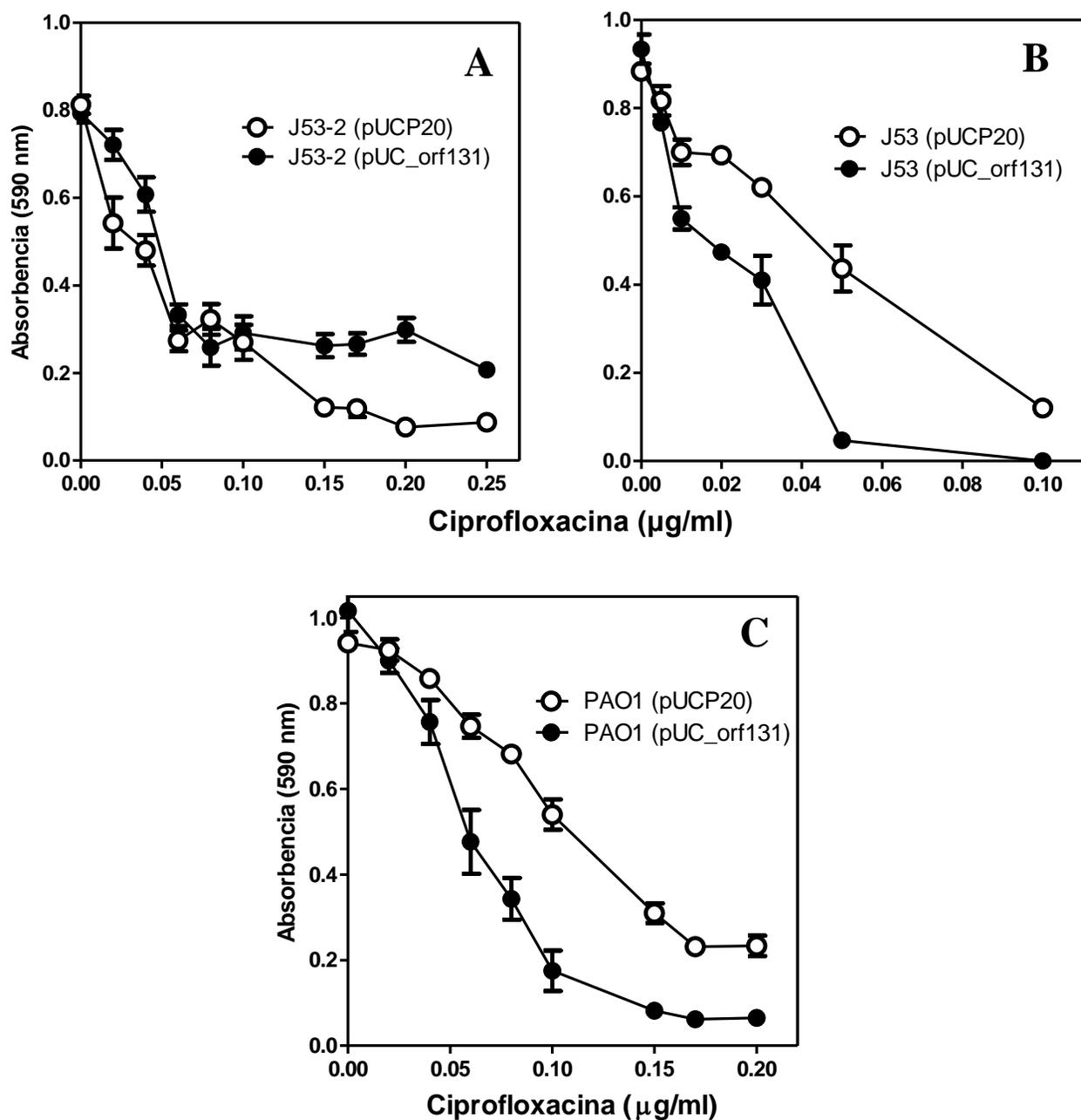
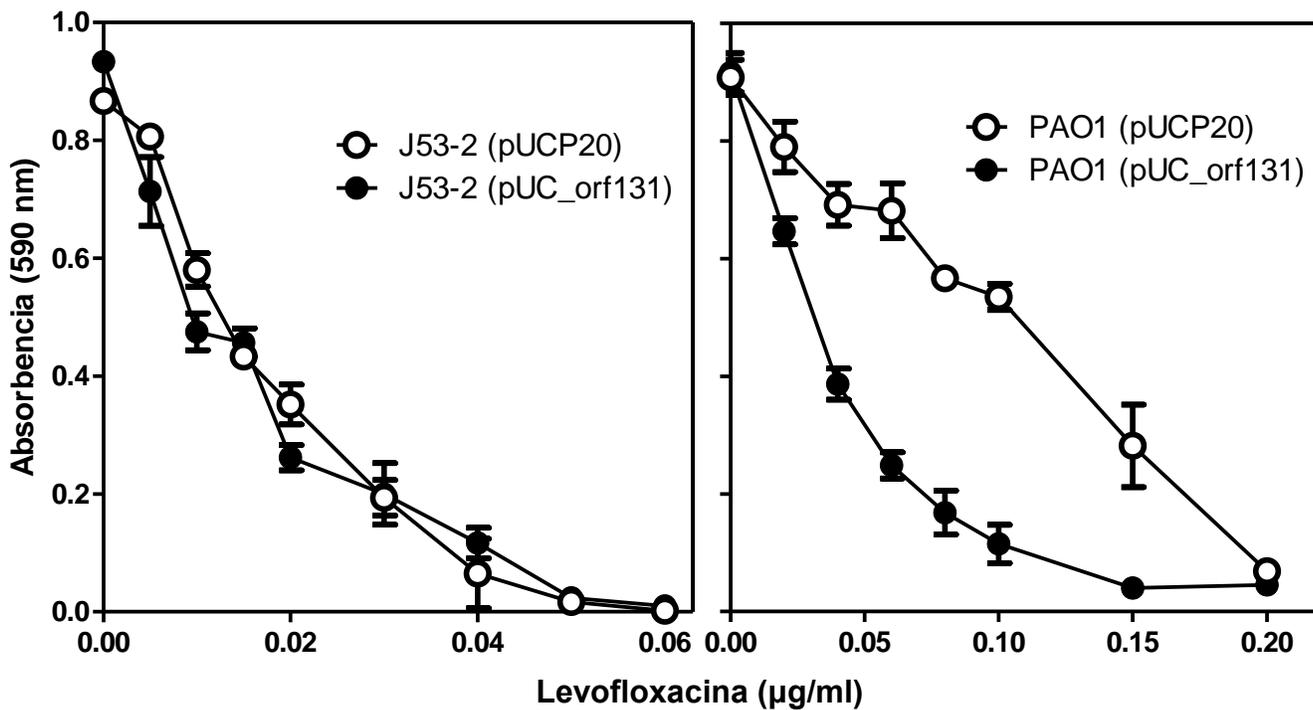


Figura 25. Susceptibilidad a ciprofloxacina de las transformantes con el plásmido pUC\_orf131. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de ciprofloxacina indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media. A, n=8; B, n=3; C, n=6.

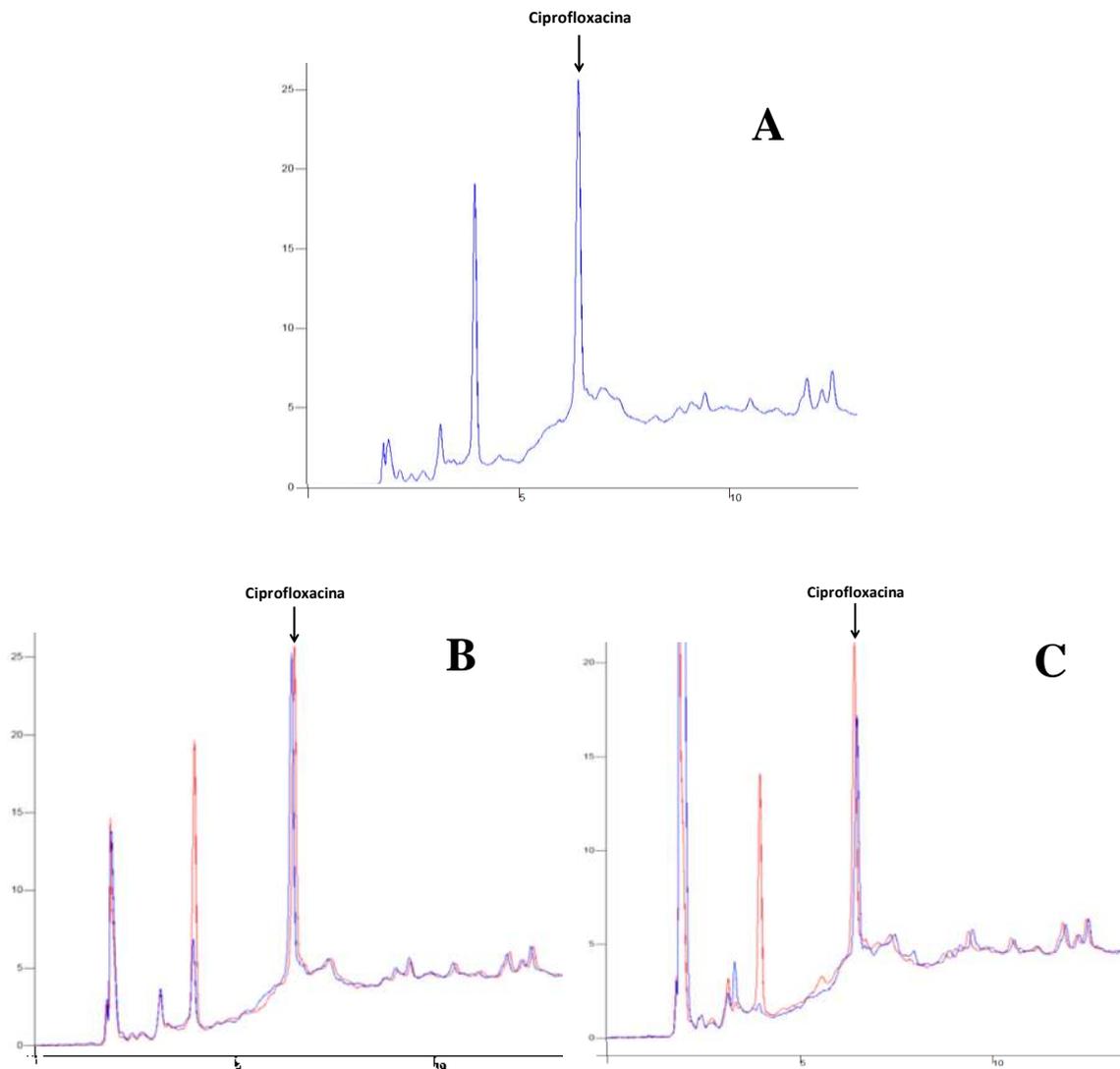


**Figura 26. Susceptibilidad a levofloxacin de las transformantes con el plásmido pUC\_orf131.**

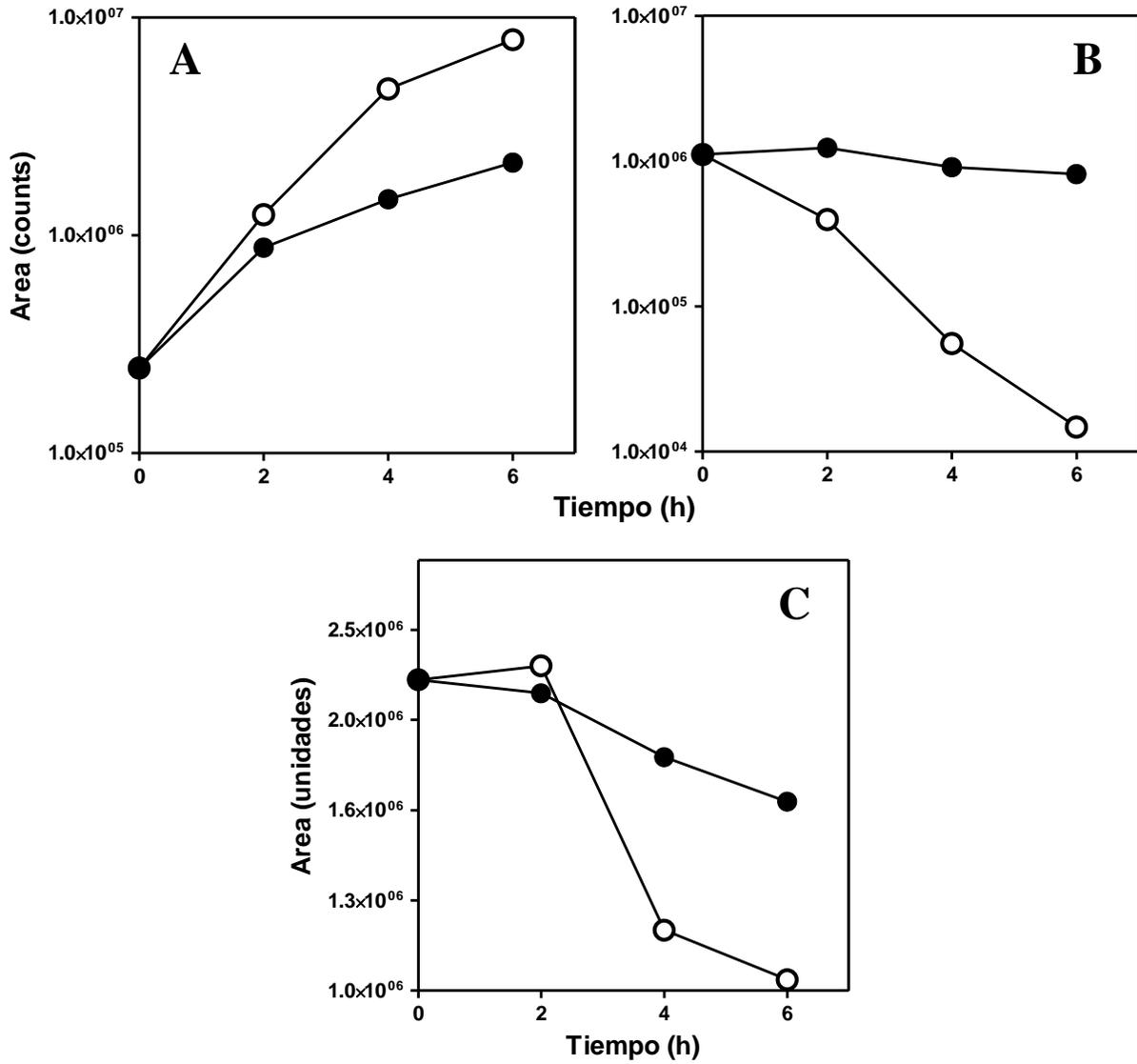
Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de levofloxacin indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 6.

horas el pico correspondiente al antibiótico disminuye en la cepa transformada con el plásmido pUC\_orf131 con respecto del control (**Figura 27C**).

Debido a que las diferencias en los cromatogramas pueden resultar difíciles de apreciar (especialmente en el pico de 6.5 min que corresponde a Cp), se realizó el cálculo del área bajo la curva de los picos de interés que son el que aparece a los 2 min, el de 4.5 min y el de 6.5 min que corresponde a Cp y se gráfico a los diferentes tiempos a los cuales se realizaron los extractos (**Figura 28**). Se observa que existen diferencias en los tres picos de interés; el pico con tiempo de retención de 2 min tiene una área bajo la curva mayor desde las 2 horas si se compara contra el control (**Figura 28A**), el pico de 4.5 min comienza a disminuir desde las 2 horas y a las 6 horas se observa una diferencia con respecto del control (**Figura 28B**), finalmente el pico correspondiente a Cp presentó una disminución mayor que en el caso del control (**Figura 28C**). El extracto de la cepa J53-2 (pUC\_orf131) presentó una disminución en la concentración del antibiótico, además los cromatogramas presentan diferencias en otros dos picos los cuales no han sido identificados.



**Figura 27. Cromatogramas de la HPLC de extractos de las cepas de *E. coli* J53-2 (pUC\_orf131) y J53-2 (pUCP20).** Se muestran los cromatogramas de (A) ciprofloxacina (0.075  $\mu\text{g/ml}$ ) disuelta en medio M9, donde se identificó a ciprofloxacina con un tiempo de retención de 6.5 min. y (B) los extractos a las 2 y (C) 6 horas. Con azul se muestra J53-2 (pUC\_orf131) y con rojo J53-2 (pUCP20).



**Figura 28. Área bajo la curva.** Se muestran los cálculos del área bajo la curva de los picos que corresponde a los tiempos: (A) 2 min, (B) 4.5 min y (C) 6.5min. Los cálculos se realizaron a partir de los cromatogramas de los extractos de las cepas: J53-2 (pUCP20) (●) y J53-2 (pUC\_orf131) (○).

## IX. DISCUSIÓN

Las quinolonas han sido el centro de un considerable interés tanto científico como clínico desde la síntesis del primer fármaco de este grupo, el ácido nalidíxico (**Figura 1**) (Leshner y col., 1962). Hoy en día ciprofloxacina es una de las quinolonas más empleadas en el tratamiento contra bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa* (Emmerson y Jones, 2003), a pesar de que tiene más de tres décadas en uso y del surgimiento de distintos sistemas de resistencia bacterianos.

Los sistemas de resistencia bacteriana a quinolonas, pueden dividirse en dos grupos, los codificados por genes cromosómicos como son: mutaciones en los genes que codifican para las enzimas blanco de las quinolonas (**Figura 7**), ADN girasa y topoisomerasa IV, la regulación en la expresión de porinas (**Figura 7**), que impiden el ingreso del fármaco a la célula, los sistemas de transporte (**Figura 7**), que son capaces de expulsar quinolonas, como son NorA de *S. aureus* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa*; y los codificados en genes plasmídicos como los sistemas de transporte QepA y OqxAB (**Figura 7**); las proteínas Qnr (**Figura 7**) que son capaces de bloquear la acción de las quinolonas y un sistema de resistencia específico contra dos quinolonas, norfloxacina y ciprofloxacina, la enzima aminoglucósido acetiltransferasa [Aac(6')-Ib-Cr] (**Figura 7**), que acetila el nitrógeno libre del grupo piperazil de las quinolonas antes mencionadas.

Con el surgimiento de las primeras bacterias resistentes a quinolonas, las cuales contenían mutaciones en los genes que codifican para las proteínas blanco (Cambau y col., 1995), se pensó que la resistencia conferida por plásmidos no sería un problema, ya que el origen de estos genes son los organismos productores de antibióticos (Hernández y col., 2011); no obstante, contrario a lo que se estipulaba acerca de la resistencia a quinolonas conferida por

plásmidos, los sistemas de resistencia de este tipo son comunes, siendo las proteínas Qnr las que tienen una distribución más amplia (Xiong y col., 2011).

En nuestro grupo de trabajo se aisló el plásmido pUM505 de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986; Cervantes y Ohtake., 1988) y se determinó que cuando se transfiere a la cepa estándar de laboratorio *P. aeruginosa* PAO1 confiere resistencia a ciprofloxacina (**Figura 9**); sin embargo, cuando el plásmido fue secuenciado y su secuencia analizada (**Figura 8**), no se identificó ninguno de los genes de resistencia a quinolonas reportados hasta el momento (Ramírez-Díaz y col., 2011), por lo que resultó de interés identificar los genes responsables de la resistencia a quinolonas.

Para la identificación de los genes responsables de la resistencia a quinolonas conferida por el plásmido pUM505, se planteó la generación de un banco de mutantes por transposición al azar de la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505), por lo que fue necesario realizar la transferencia del plásmido pUM505 de la cepa PAO1 a la PAO1SR.

Se transfirió el plásmido pUM505 a la cepa PAO1SR y para comprobar la transferencia, se realizó la amplificación mediante PCR de dos genes presentes en el plásmido, *chrA* y *merA*, y curvas de susceptibilidad a ciprofloxacina y a cromato. Como resultado del PCR se obtuvieron las bandas de amplificación correspondientes con el tamaño esperado (**Figura 14**) y debido a que los genes amplificados solo se encuentran en el plásmido esto aseguró que la transferencia fue exitosa. Adicionalmente, la transferencia del plásmido confirió resistencia a cromato y a ciprofloxacina (**Figura 15**) lo cual corresponde con lo reportado anteriormente para exconjugantes de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (Díaz-Magaña, 2011, Tesis de Doctorado en proceso).

Se generaron 12,000 mutantes por transposición al azar de la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505) y todas fueron analizadas para seleccionar mutantes sensibles a ciprofloxacina; además, se realizaron pruebas para determinar que las mutantes poseen el fenotipo esperado: resistencia a gentamicina, estreptomicina y mercurio. Se seleccionaron 12 mutantes Cp<sup>S</sup> y a cada mutante se le amplificó mediante PCR el transposón *Himar1::Gm<sup>R</sup>* (**Figura 17**). La aparición de las bandas de amplificación indicó que el transposón está presente en todas las mutantes y que el fenotipo de susceptibilidad observado se debe a la inserción del transposon en un gen relacionado con el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina, ya que la cepa PAO1SR (pUM505) no contiene el transposon (**Figura 17**) y es resistente a ciprofloxacina (**Figura 15**). Además, se realizaron pruebas de susceptibilidad a la quinolona en medio líquido (**Figura 16**). Las mutantes fueron divididas en dos grupos por su comportamiento con respecto del control sensible (PAO1SR): i) mutantes sensibles, las cuales se comportan de manera similar al control y ii) mutantes hipersensibles en donde el crecimiento fue aún menor que el control sensible. De acuerdo al comportamiento observado, todas las mutantes son sensibles a ciprofloxacina con respecto del control resistente, la cepa PAO1SR (pUM505); sin embargo, el comportamiento diferencial con respecto del control sensible sugiere a que existe diversidad en los genes interrumpidos en cada mutante. Una posibilidad es que las mutantes sensibles tengan un tipo de gen interrumpido, mientras que las mutantes hipersensibles pueden tener interrumpido un gen diferente.

Se realizó la identificación del gen interrumpido por el transposón en seis mutantes Cp<sup>S</sup> y se encontró que cuatro de las mutantes clasificadas como sensibles tienen interrumpido alguno de los genes que se encuentran formando parte de un probable operón integrado por

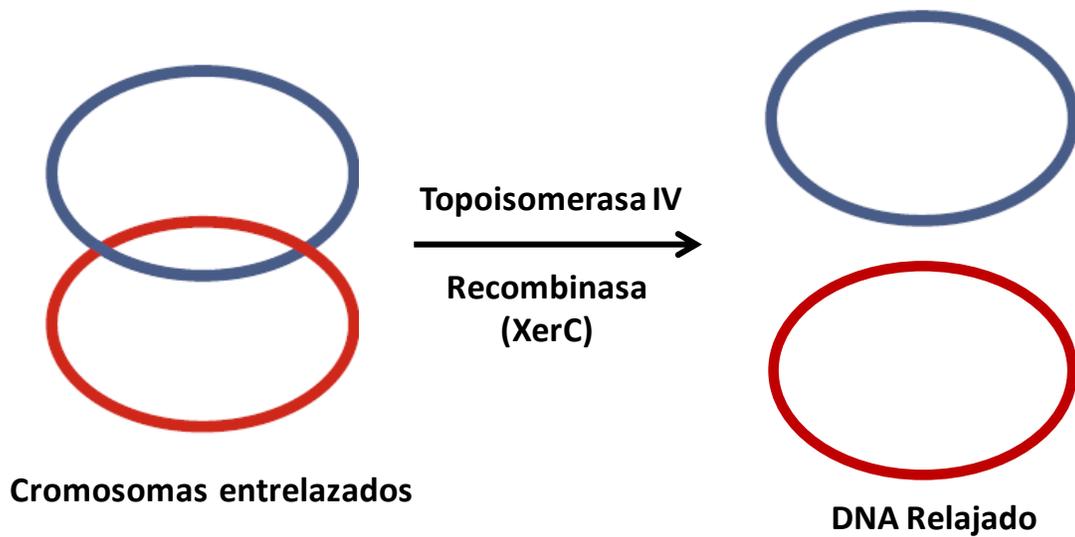
los *orf57*, *orf58* y *orf59* del plásmido pUM505. Los genes interrumpidos fueron localizados en la isla de resistencia a metales de pUM505 y al analizar el contexto genómico se identificó que éstos forman parte de un probable operón, además, se encontró que los tres genes codifican probables integrasas/recombinasas. Para el caso de las mutantes hipersensibles se identificó que el gen interrumpido en dos mutantes Cp<sup>S</sup> es el *orf87* del plásmido pUM505. El gen se encuentra formando parte de un probable operón con los *orf86* y *orf85* y aunque estos no se encontraron interrumpidos en las mutantes Cp<sup>S</sup> también se incluyeron en el análisis *in silico*. Se encontró que los genes codifican probables proteínas de membrana y debido a que las proteínas de membrana han sido relacionadas con el transporte de fármacos, esto sugiere que los productos de los *orfs* 85, 86 y 87 podrían conferir resistencia a ciprofloxacina transportando fuera de la célula al fármaco y de esta manera reducir la concentración intracelular de éste.

La participación de las recombinasas/integrasas codificadas en plásmidos no ha sido reportado anteriormente en la resistencia a quinolonas (Aldred y col., 2014), por lo que nos dimos a la tarea de complementar a la mutante interrumpida en el *orf57*, debido a que es el gen que posee el probable promotor. Se realizó la clonación y la transformación de la mutante Cp<sup>S</sup>13-23 afectada en el *orf57* la cual denominamos *xerC*<sup>-</sup>. Se observó en la curva de susceptibilidad a ciprofloxacina (**Figura 21**) que la mutante complementada tiene un crecimiento mayor que la mutante *xerC*<sup>-</sup> lo que confirma que el gen *xerC* participa en la resistencia a ciprofloxacina. Sin embargo, el crecimiento de la cepa complementada con respecto de la cepa empleada como control resistente, PAO1SR (pUM505), es similar y solo difieren en las dos concentraciones superiores, donde la mutante complementada disminuyó su crecimiento; esto puede deberse a que se necesitan los tres genes que

conforman el operón para dar un fenotipo de resistencia similar al que tiene la cepa empleada como control resistente.

La participación de las recombinasas en el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina podría deberse a que las recombinasas y la topoisomerasa IV tienen funciones similares, es decir, ambas pueden fundamentalmente romper y unir, moléculas de DNA (Yang, 2010); además, las recombinasas y las topoisomerasas pertenecen a la misma familia de enzimas, las isomerasas. Se ha reportado que *Helicobacter pylori* no posee topoisomerasa IV, sin embargo, posee el gen *xerH* que codifica una recombinasa (Debowski y col., 2012). Debido a que la topoisomerasa IV encargada de separar los cromosomas unidos que surgen al final de la replicación del DNA circular (Champoux, 2001), un fallo en esta enzima resulta letal para la célula debido a que ocurriría un fallo mitótico al no separarse los cromosomas; sin embargo, en *H. pylori* esta función se suple por la acción de una recombinasa (Debowski y col., 2012). En nuestro modelo de estudio, *P. aeruginosa*, la topoisomerasa IV es inhibida por la acción de la ciprofloxacina, sin embargo, al transferir el plásmido pUM505, que codifica a la recombinasa XerC, aquel confiere resistencia probablemente al suplir la función de la topoisomerasa IV (**Figura 29**).

Debido a que las bases de datos se actualizan día con día, se realizó un nuevo análisis de la secuencia del plásmido pUM505 con la intención de encontrar algún cambio en los reportes que se habían dado anteriormente para los genes que codifican proteínas hipotéticas. Se encontró que el *orf131* muestra similitud con una probable aminoglucósido fosfotransferasa que podría estar relacionada con el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina observado al transferir el plásmido pUM505 a la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (Díaz-Magaña, 2011. Tesis de Doctorado en Proceso) ya que ha sido reportada una enzima aminoglucósido



**Figura 29. Probable mecanismo de acción de la recombinasa XerC codificada por el plásmido pUM505.** Se muestra en el esquema el mecanismo de acción de la topoisomerasa IV en la separación de cromosomas entrelazados y se muestra que la recombinasa XerC de pUM505 podría suplir su función.

acetiltransferasa capaz de modificar quinolonas mediante la acetilación en el nitrógeno del grupo piperazil (Robicsek y col., 2006).

Se realizó el análisis tipo Blast de la proteína codificada en el *orf131* del plásmido pUM505 y se encontró un porcentaje de identidad de 40% con la aminoglucósido fosfotransferasa de *Mycobacterium smegmatis*. Sin embargo, la proteína de *M. smegmatis* es de 225 aminoácidos (aa), mientras que la codificada por el *orf131* es de 65 aa, esta diferencia provocó que el análisis Blast tuviera una cobertura del 61%. Debido a lo anterior, se buscaron enzimas de este tipo de menor tamaño y se encontró que han sido reportadas proteínas de esta familia con tamaños pequeños, similares a los de Orf131, como la enzima aminoglucósido fosfotransferasa de *P. aeruginosa* M18 de 79 aa que confiere resistencia a los aminoglucósidos kanamicina, gentamicina y estreptomycin (Wu y col., 2011). Se realizó el alineamiento de las secuencias de ambas proteínas y se obtuvo un porcentaje de identidad del 18% y una similitud de 26%. Los porcentajes son relativamente bajos, sin embargo, se ha reportado que para miembros de esta familia de proteínas, los porcentajes de identidad son de 20-40% (Smith y Baker, 2002), por lo que un porcentaje de identidad de 18%. Se han identificado residuos de aminoácidos que se encuentran conservados y que se relacionan con la función catalítica de esta familia de enzimas. Entre ellos el dominio HGDxxxxN, y el dominio G (F/V/L/I) IDxG(R/D), ambos relacionados con la actividad de cinasa (Smith y Baker, 2002). Se identificaron los dos dominios conservados en la proteína APH-IIb de *P. aeruginosa* M18, sin embargo, en la proteína Orf131 solamente se identificó un aminoácido conservado de cada dominio. La variación de los residuos catalíticos que se han encontrado conservados en otras proteínas de esta familia, si bien podría indicar que la proteína Orf131 no es funcional o posee una función distinta, también puede indicar que

ésta ha adquirido la capacidad de reconocer otro sustrato para llevar a cabo su papel de cinasa, como en el caso de la proteína Aac(6<sup>7</sup>)-Ib-cr, donde la variación en dos residuos le ha dado la capacidad de conferir resistencia no sólo a aminoglucósidos, sino también a algunas quinolonas (Robicsek y col., 2006).

La aparición de resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos no se esperaba que apareciera tan rápido y menos aun que estuviera tan distribuida; sin embargo, desde el primer reporte de los genes *qnr* (Martínez y col., 1988) y la posterior aparición de sistemas de expulsión codificados por genes plasmídicos, QepA (Yamane y col., 2007) y OqxAB (Hansen y col., 2004), se continuó con la premisa de que la resistencia mediada por enzimas, capaces de modificar químicamente quinolonas, no sería posible. Debido a que la resistencia a cualquier antibiótico mediante modificación enzimática es específica para una sola clase de fármaco o para un grupo selecto de fármacos de la misma familia, ya que aparentemente existe una co-evolución entre las enzimas y los agentes antimicrobianos en los que actúan (Robicsek y col., 2006); sin embargo, con el reporte de una enzima aminoglucósido acetiltransferasa capaz de conferir resistencia a aminoglucósidos y a quinolonas (Robicsek y col., 2006), se abre una brecha en cuanto a la especificidad de esta familia de enzimas.

Debido a lo anterior se decidió realizar la clonación del *orf131* del plásmido pUM505 en el vector pJET 1.2/blunt y posterior subclonación en el vector de expresión binario pUCP20 obteniendo el plásmido pUC\_orf131 el cual fue transferido a las cepas de *E.coli* J53 y J53-2 y a *P. aeruginosa* PAO1 para realizar pruebas de susceptibilidad a quinolonas.

La razón por la que se emplearon las cepas de *E. coli* se debe a que J53-2 es resistente a quinolonas en comparación con la cepa J53, además, los sistemas de resistencia a quinolonas no son mutuamente excluyentes, es decir, una cepa puede acumular estos sistemas para exhibir un alto nivel de resistencia (Aldred y col., 2014). De esta manera, si el sistema que transferimos confiere un nivel de resistencia bajo, al estar acompañado de otro sistema, como el que ya posee la cepa J53-2, sería más fácil de detectar en una curva de susceptibilidad en medio líquido.

De los resultados de las pruebas de susceptibilidad a Cp para el caso de la cepa J53-2 (**Figura 25A**) se observó un fenotipo de resistencia al antibiótico comparado con su respectivo control. El cambio en el fenotipo con respecto a los controles en las curvas de susceptibilidad nos permite afirmar que el *orf131* del plásmido pUM505 participa en la resistencia a ciprofloxacina. Sin embargo, en el resultado de la prueba de susceptibilidad para la cepa J53 (**Figura 25A**) se observa un fenotipo de susceptibilidad.

Una manera de explicar los resultados obtenidos en las curvas de susceptibilidad para el caso de las cepas de *E. coli* es que, la cepa J53-2 contiene una mutación en el gen *gyrA* que codifica una subunidad de la DNA girasa que la vuelve resistente a quinolonas, en comparación con la cepa J53 que no tiene la mutación. La resistencia se debe a la disminución de la afinidad de las quinolonas por su sitio blanco. Si la proteína codificada por el *orf131* del plásmido pUM505 modifica a Cp mediante una fosforilación, al ejercer la quinolona su mecanismo de acción en la cepa J53-2 ésta sería aún menos afín a la unión con la DNA girasa, debido a la mutación que posee y a la probable modificación del antibiótico, lo cual se ve reflejado en el incremento de la resistencia de la cepa transformada con el plásmido pUC\_orf131 (**Figura 25A**), sin embargo para la cepa J53 que

no posee ninguna mutación en los genes de la DNA girasa, la probable modificación del fármaco provoca un incremento en la afinidad de éste por su sitio blanco lo cual se observa en el incremento de la susceptibilidad de la cepa transformada con el plásmido pUC\_orf131 (**Figura 25B**).

El resultado de las pruebas de susceptibilidad a Cp de la cepa PAO1 (**Figura 25C**) fue similar al observado en la cepa J53 (**Figura 25B**), en ambos casos se observa que la transferencia del plásmido pUC\_orf131 provoca un incremento en la susceptibilidad a ciprofloxacina comparando con sus respectivos controles. En la cepa PAO1 podría ocurrir el mismo fenómeno que se cree ocurre en la cepa J53, donde la probable fosforilación de ciprofloxacina incrementa la afinidad del fármaco por su sitio blanco; sin embargo, no se cuenta con una mutante en *gyrA* para reforzar esta hipótesis.

Debido a los resultados de las pruebas de susceptibilidad a Cp y a la información obtenida del análisis *in silico*, en este trabajo se propone que la proteína codificada por el *orf131* del plásmido pUM505 es capaz de modificar a Cp mediante la transferencia de un grupo fosfato; sin embargo, se desconoce en qué posición del antibiótico podría llevarse a cabo esta modificación. La acetilación introducida por la enzima AAC(6')-Ib-Cr se lleva a cabo en el nitrógeno libre del grupo piperazil, que tienen libre las quinolonas ciprofloxacina y norfloxacina (Robicsek y col., 2006); para el caso de la proteína Orf131, la fosforilación podría ocurrir en dos posiciones, el nitrógeno libre del grupo piperazil o el grupo carboxilo que poseen todas las quinolonas en la posición 3 (**Figura 2**). Se decidió realizar pruebas de susceptibilidad a levofloxacina (Lv), debido a que esta quinolona tiene bloqueado el nitrógeno del grupo piperazil con un metilo (**Figura 4**). Los resultados de las pruebas de susceptibilidad mostraron un fenotipo de susceptibilidad para la cepa PAO1 (pUC\_orf131)

similar al observado anteriormente para ciprofloxacina (**Figura 26B**), lo que indica que la probable modificación de las quinolonas ocurre en el grupo carboxilo y no en el grupo piperazil, debido a que Lv lo tiene bloqueado. Para el caso de la cepa J53-2 (pUC\_orf131) no se observó diferencia en el fenotipo comparando con el control J53-2 (pUCP20) (**Figura 26A**), que puede deberse a que Lv es una quinolona que además de tener bloqueado el grupo piperazil, cuenta con sustituyentes diferentes a los de Cp y el efecto observado puede deberse a que la modificación no es suficiente para desestabilizar la unión del fármaco con su sitio blanco y debido a esto no se observa ninguna diferencia con respecto del control.

Se decidió buscar si ciprofloxacina es modificada por la proteína Orf131 y para esto se decidió realizar ensayos de HPLC, donde se esperaba encontrar alguna modificación en el pico que se identificó como Cp con un tiempo de retención de 6.5 min aproximadamente (**Figura 27A**).

En los cromatogramas correspondientes a las dos cepas, J53-2 (pUC\_orf131) y J53-2 (pUCP20), a las 2 h de exposición a ciprofloxacina (**Figura 27B**) no se observaron diferencias en el pico identificado como Cp; sin embargo, sí se observó la aparición de un nuevo pico en ambas cepas con tiempo de retención de 2 min aproximadamente, el cual podría ser un producto de degradación o modificación. Además, se observó que en el cromatograma de la cepa transformada con el plásmido pUC\_orf131 comienza a disminuir un pico con tiempo de retención de 4.5 min aproximadamente, mientras que en la cepa control no se observó diferencia en este pico si se compara con el cromatograma de ciprofloxacina disuelta en medio M9 (**Figura 27A**). Para el cromatograma de los extractos a las 6 horas de exposición al antibiótico (**Figura 27C**), se observó una disminución en el pico que corresponde a ciprofloxacina en la cepa J53-2 (pUC\_orf131) comparada con la

cepa control. También se observó la desaparición casi por completo del pico con tiempo de retención de 4.5 min, mientras que el de 2 min se incrementó en ambas cepas. Los resultados observados fueron confirmados al graficar las áreas bajo la curva de los tres picos de interés (**Figura 28**), donde se observó que existen diferencias para los tres casos.

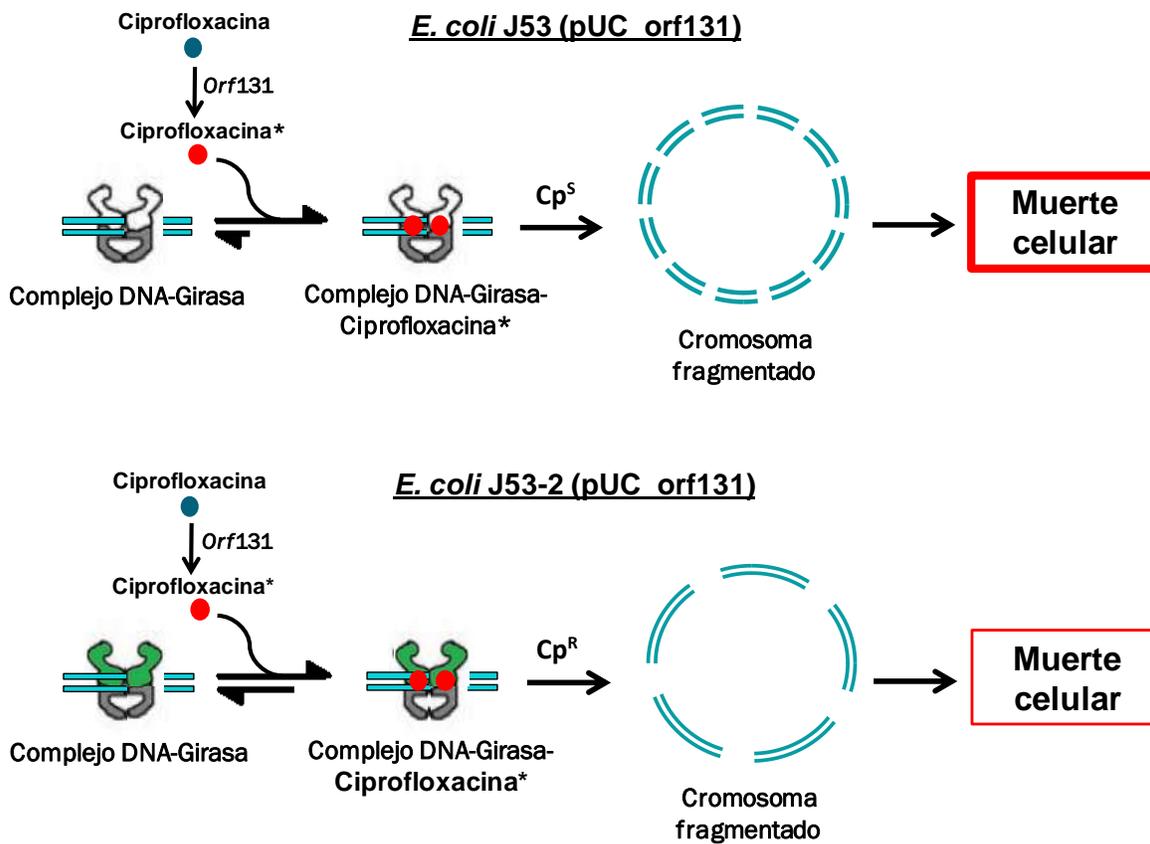
El pico que se identificó como ciprofloxacina con tiempo de retención de 6.5 min presentó una disminución en la cepa J53-2 (pUC\_orf131) comparada con la cepa control, lo cual podría deberse a que el antibiótico sufrió una modificación por parte de Orf131. Con este resultado únicamente es posible considerar que hay una disminución en la concentración de ciprofloxacina en el medio de cultivo; sin embargo, no es posible determinar con certeza lo que está pasando con el antibiótico. Para la cepa J53-2 (pUCP20) existe una disminución de este pico, sin embargo, no se compara con la disminución que se presenta en el cromatograma de la otra cepa. Esta disminución podría deberse a que el antibiótico se degrade debido al tiempo y a la temperatura a la cual se incubó, no obstante esto es sólo una posibilidad.

Una probable explicación del incremento del pico con tiempo de retención de 2 min es que sea un producto del metabolismo de las cepas, debido a que se incrementa en ambas y parece tener una relación con el tiempo de incubación previo a la preparación de los extractos.

Con respecto del pico identificado con tiempo de retención de 4.5 min, se observa que en la cepa J53-2 (pUC\_orf131) comienza a disminuir a partir de las 2 h, teniendo una disminución drástica a las 6 h, a diferencia del pico observado en el cromatograma del extracto de la cepa J53-2 (pUCP20) donde se muestra una ligera disminución de este pico a

las 2 h y manteniendo un nivel alto a las 6 h. Estos resultados podrían deberse a que existen ligeras diferencias en el crecimiento, si el pico es un compuesto del medio de cultivo del cual se realizó el extracto, es normal que la cepa que presenta un crecimiento mayor, metabolice este compuesto rápidamente, al grado de que no se detecte mediante HPLC, como pasa con la cepa J53-2 (pUC\_orf131), mientras que la cepa que tiene un crecimiento ligeramente menor presente un disminución en este pico, que aun fue detectable.

Con los resultados obtenidos es posible proponer un modelo hipotético de la probable función del Orf131: Mientras que en la cepa *E. coli* J53 confiere susceptibilidad, debido a que la probable modificación incrementa la afinidad por su proteína blanco (**Figura 30**), en la cepa de *E. coli* J53-2 confiere resistencia a ciprofloxacina debido a que modifica el antibiótico y lo vuelve menos afín a su sitio blanco (**Figura 30**),



**Figura 30. Modelo del probable mecanismo de acción del Orf131 en las cepas de *E. coli* J53-2 (pUC\_orf131) y J53 (pUC\_orf131).** La cepa J53-2 (pUC\_orf131) es menos afín a la unión del probable antibiótico modificado por lo tanto la fragmentación del cromosoma que conduce la muerte celular es menor que en la cepa donde la unión del antibiótico es mayor.

## X. CONCLUSIÓN

Se identificaron dos sistemas que confieren resistencia a quinolonas en el plásmido pUM505:

1. Una recombinasa codificada por el *orf57* que probablemente suple la función de la topoisomerasa IV
2. Una enzima codificada por el *orf131* que probablemente modifica al antibiótico.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Agyie-Ohene, T., Lea, J. y Venter, H. (2012). Mutations in MexB that affect the efflux of antibiotics with cytoplasmic targets. *FEMS Microbiol. Lett.* 333: 20-27.
- Aldred, K. J., Kerns R. J. y Osherooff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53: 1565-1574.
- Andersson, M. I. y MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 Suppl 1: 1-11.
- Andriole V. T. (2005). The quinolones: past, present and future. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 2: 113-119
- Ball, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J. Antimicrob. Chemother.* 46 Suppl T1: 17-24.
- 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.
- Bearden D. T. y Danziger, L. H. (2001). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy.* 21: 224-232.
- Beisswenger, C., Honecker, A., Kamyschnikow, A., Bischoff, M., Tschernig T. y Bals R. (2014). Moxifloxacin modulates inflammation during murine pneumonia. *Respir. Res.* 15: 82-92.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523
- Bolon, M. K. (2011). The newer fluoroquinolones, *Med. Clin. North Am.* 95: 793-817.
- Breidenstein, E. B. M., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage J. y Hancock, E. W. (2008). Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4486-4491.
- Cambau, E., Perani, E., Dib, C., Petinon, C., Trias, J. y Jarlier, V. (1995). Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to Imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2248-2252.
- Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C. J. y Nordmann, P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 231-237.

Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173-176.

Cervantes-Vega, C. Chávez, J., Córdova, NA., De la Mora, P. y Velasco, J. A. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48: 159-163

Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 369-413.

Clowes, R. C. y Hayes, W. (1968). Experiments in Microbial Genetics John Wiley & Sons, Inc., New York.

Coetzee, J. N., Datta, N. y Hedges, R. W. (1972). R factor from *Proteus rettgeri*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 543-552.

Davis, J. y Davis, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 417-433.

Debowski, A.W., Carnoy, C., Verbrugge, P., Nilsson, H. O., Gauntlett, J. C., Fulurija, A., Camilleri, T., Berg, D. E., Marshall, B. J. y Benghenzal, M. (2012). Xer recombinase and genome integrity in *Helicobacter pylori*, a pathogen without topoisomerase IV. *PLoS ONE*. 7: 1-15.

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.

Emmerson, A. M. y Jones, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 13-20.

Enderle, P. J. y Farwell, M. A. (1988). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25: 955-958.

Ferrándiz, M. J., Fenoll, A., Liñares, J. y De La Campa, A. (2000). Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolones-resistant clinical isolated of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 840-847.

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.

Heddle, J. G., Blance, S. J., Zamble, D. B., Hollfelder, F., Miller, D. A., Wentzell, L. M., Walsh, C. T. y Maxwell, A. (2001). The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterization of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* 307: 1223-1234.

Heddle, J. y Maxwell, A. (2002). Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1805-1815.

- Hernández, A., Sánchez, M. B. y Martínez J. L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front. Microbiol.* 2: 1-6.
- Hoiby, N. (2011). Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Medicine* 9: 1-7.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. y Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43: 73-102.
- Hooper, D. C. (2005). Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1811-1817.
- Ince, D. y Hooper D. C. (2003). Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J. Bacteriol.* 185: 6883-6892.
- Ish-Horowics, D. y Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.
- Jacoby, G. A., Walsh K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A. y Hopper, D. C. (2006). qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1178-1182.
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 2: 120-126.
- Kampranis, S. C. y Maxwell A. (1998). The DNA gyrase-quinolone complex: ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 273: 22615-22626.
- Khodursky, A. B. y Cozzarelli N. R. (1998). The mechanism of inhibition of Topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* 273: 27668-27677.
- Kim, H. B., Wang, M., Park, C. H., Kim, E. C., Jacoby, G. A. y Hooper, D. C. (2009). *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3582-3584.
- 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.
- 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.

- Malik, M. y Drlica, K. (2006). Moxifloxacin lethality with *Mycobacterium tuberculosis* in the presence and absence of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2842-2844.
- Malik, M., Zhao X. y Drlica, K. (2006). Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol. Microbiol.* 61: 810-825.
- Martínez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernández, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 430-449.
- Martínez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276: 2521-2530.
- Martínez, M. L., Pascual, A. y Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351: 797-799.
- Peterson, L. R. (2001). Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin. Infect. Dis.* 33 Suppl 3: 180- 186.
- Qin, X. y Huang, H. (2014). Review of nemonoxacin with special focus on clinical development. *Drug Des. Devel. Ther.* 8: 765-774.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rojas-Rojas, F. U. (2012). Identificación de genes del plásmido pUM505 involucrados en la resistencia a quinolonas. Tesis de licenciatura. QFB-UMSNH.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Simon, R., Priefer, S. y Puehler. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.

- Smith, A. C. y Baker, N. E. (2002). Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2: 143-160.
- Tran, J. H. y Jacoby G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 5638-5642.
- Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan S. J, y Hooper D. C. (2005). MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187: 2395-2405.
- Truong-Bolduc, Q. C. y Hooper D. C. (2007). The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and  $\beta$ -lactams in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189: 2996-3005.
- Truong-Bolduc, Q. C., Strahilevitz, J, Hopper, D. C. (2006). NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1104-1107.
- 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.
- West, S. E., Schweizer, H. P., Hricová, K., Uvřzl, R., Neiser, J., Blahut, L. y Urbánek, K. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148: 81-86.
- Wetzstein, H. G., Schmeer, N. y Karl, W. (1997). Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*: identification of metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4272-4281.
- Wong, A. y Kassen, R. (2011). Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157: 937-944.
- Wong, S. M. y Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10191-10196.
- Wu, D. Q., Ye, J., Ou, H, Y., Wei, X., Huang, X., He, Y. W. y Xu, Y. (2011). Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC Genomics* 31: 1-17.
- Xiong, X., Bromley, E. H. C., Oelschlaeger, P., Woolfson D. N. y Spencer, J. (2011). Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res.* 39: 3917-3927.

Xu, Y., Moeller, A., Jun, S., Le, M., Yoon, B., Kim, J., Lee, K. y Ha, N. (2012). Assembly and channel opening of outer membrane protein in tripartite drug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 287: 11740-11750.

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 isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 3354-3360.

Yang, W. (2010). Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45: 520-534.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

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.