



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“Caracterización de la especificidad del sistema de  
resistencia a quinolonas conferido por los *orfs* 35-37  
de pUM505”**

TESIS

Presenta:

p.Q.F.B. Martha Alicia Méndez Camarillo

Para obtener el grado de:

Químico Farmacobiólogo

Asesora:

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz  
Doctora en Ciencias en Biología Experimental

Coasesora:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental  
M. C. Martha Patricia Chávez Moctezuma

Morelia, Michoacán. Febrero, 2016

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO  
DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA  
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DE LA DC. MARTHA  
ISELA RAMÍREZ DÍAZ Y LA MC. MARTHA PATRICIA  
CHAVEZ MOCTEZUMA.**

**EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE  
CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA  
CORRDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

# INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1 Las quinolonas.....	3
1.1 Historia.....	3
1.2 Estructura.....	7
1.3 Clasificación.....	9
1.3.1 Primera generación.....	10
1.3.2 Segunda generación.....	10
1.3.3 Tercera generación.....	12
1.3.4 Cuarta generación.....	12
1.3.5 Quinolonas no fluoradas.....	13
1.3.6 Mecanismo de acción.....	13
1.4 Sistemas de resistencia a las quinolonas.....	19
1.4.1 Mutaciones cromosómicas.....	21
1.4.2 Mutaciones en los genes codificantes de las moléculas blanco de las quinolonas.....	21
1.4.3 Cambios estructurales y disminución de expresión de las porinas.....	22
1.4.4 Sistemas de expulsión.....	23
1.5 Mecanismos Plasmídicos de resistencia.....	25
1.5.1 Proteínas Qnr.....	27
1.5.2 Modificación a la estructura molecular de las quinolonas.....	28
1.5.3 Sistemas de expulsión.....	29
<b>II ANTECEDENTES</b> .....	31
<b>III JUSTIFICACIÓN</b> .....	38
<b>IV HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>V OBJETIVOS</b> .....	38

5. 1 Objetivo general.....	38
5. 2 Objetivos específicos.....	38
<b>VI ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>39</b>
<b>VII MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
7.1 Medios de cultivo.....	40
7.2 Cepas.....	40
7.3 Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	41
7.4 Restricción con endonucleasas.....	42
7.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	42
7.6 Pruebas de susceptibilidad a quinolonas.....	43
7.7 Pruebas de susceptibilidad a otros compuestos.....	43
<b>VIII RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
8.1 Caracterización de los plásmidos recombinantes.....	44
8.2. Participación de los <i>orfs</i> 35-37 en la susceptibilidad a ciprofloxacina y levofloxacina en medio de cultivo mínimo.....	44
8.3 Participación de los <i>orfs</i> 35-37 en la susceptibilidad a cristal violeta y SDS.....	47
<b>IX DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>X CONCLUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>XI BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura base de las quinolonas y propiedades que brindan los sustituyentes.....	6
<b>Figura 2.</b> Quinolonas de la primera, segunda y tercera generación.....	11
<b>Figura 3.</b> Quinolonas de la cuarta generación y quinolonas no	

fluoradas.....	14
<b>Figura 4.</b> Dominios de la estructura de las topoisomerasas tipo II.....	16
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de las quinolonas sobre la DNA girasa y la topoisomerasa IV.....	18
<b>Figura 6.</b> Sistemas de expulsión de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas relacionados con resistencia a quinolonas.....	26
<b>Figura 7</b> Curva de susceptibilidad a ciprofloxacina de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUM505).....	32
<b>Figura 8</b> Mapa genético del plásmido pUM505. ....	34
<b>Figura 9.</b> Susceptibilidad a ciprofloxacina de <i>E. coli</i> J53-2 (pUC_orf's 35-37).....	36
<b>Figura 10.</b> Probable mecanismo de resistencia a quinolonas codificado por los <i>orfs</i> 35, 36 y 37 del plásmido pUM505.....	37
<b>Figura 11.</b> Caracterización de los plásmidos recombinantes.....	45
<b>Figura 12.</b> Susceptibilidad a ciprofloxacina de la cepa J53-2 (pUC_orf's 35-37).....	46
<b>Figura 13.</b> Susceptibilidad a levofloxacina de la cepa J53-2 (pUC_orf's 35-37).....	48
<b>Figura 14.</b> Susceptibilidad a cristal violeta de la cepa J53-2 (pUC_orf's 35-37).....	49
<b>Figura 15.</b> Susceptibilidad a SDS de la cepa J53-2 (pUC_orf's 35-37).....	51

## RESUMEN

El plásmido conjugativo pUM505 se aisló de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, tiene un tamaño aproximado de 123 kilobases (kb), posee una isla de patogenicidad que contiene genes probablemente relacionados con la transferencia y la replicación. La transferencia del plásmido pUM505 a la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 confirió resistencia a ciprofloxacina con respecto a la cepa PAO1 sin el plásmido. La secuencia de nucleótidos del plásmido pUM505 no mostró la presencia de genes relacionados con la resistencia a ciprofloxacina. Sin embargo, se identificaron 64 genes que codifican para proteínas hipotéticas, de los cuales los *orfs* 35, 36 y 37 al ser clonados y transferidos a *Escherichia coli* J53-2 confirmaron resistencia a las quinolonas ciprofloxacina y levofloxacina, cuando se cultivó dicha cepa en un medio de cultivo rico. Las proteínas, codificadas por los *orfs* 35 y 37, se predijo se localizan en el periplasma mientras que el producto del *orf* 36 tiene localización en la membrana interna, sugiriendo que estos genes codifican un probable sistema de expulsión de quinolonas. El objetivo de éste trabajo fue determinar si el sistema de resistencia a quinolonas codificado por los *orfs* 35-37 de pUM505 confiere resistencia a quinolonas en bacterias crecidas en un medio de cultivo mínimo además de resistencia a otros compuestos tóxicos. Los resultados mostraron que las transformantes de *E. coli* J53-2 con los *orfs* 35-37 confieren resistencia a ciprofloxacina y levofloxacina con respecto a *E. coli* J53-2 sin los genes, además de que se mejoró la resistencia cuando las transformantes se crecieron en un medio de cultivo mínimo, en comparación a la resistencia reportada cuando se crecieron en un medio rico. Adicionalmente se determinó que el sistema de resistencia codificado por los *orfs* 35-37 no es específico para quinolonas ya que las transformantes también fueron resistentes a cristal violeta. Con los resultados obtenidos se concluye que las proteínas codificadas por los *orfs* 35, 36 y 37 del plásmido pUM505 codifican un sistema de resistencia a quinolonas y cristal violeta en una cepa de *E. coli* posiblemente mediante un mecanismo de expulsión.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, pUM505, resistencia, quinolonas, sistemas de expulsión.

## Abstract

The conjugative plasmid pUM505 was isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* and has a length of 123 kilobases (kb); it has a pathogenicity island containing genes probably related with transference and DNA replication. The transfer of pUM505 into the standard strain *P. aeruginosa* PAO1 conferred resistance to ciprofloxacin with respect to the strain without the plasmid. But the nucleotide sequence of plasmid pUM505 did not show the presence of genes related to ciprofloxacin resistance. However, there were identified 64 genes that encode hypothetical proteins, and the *orfs* 35, 36 and 37 were selected, and transferred into *Escherichia coli* J53-2. They conferred resistance to the quinolones ciprofloxacin and levofloxacin, when it is grown in a rich culture broth. The proteins encoded by *orfs* 35 y 37 it was predicted that they are localized in the periplasm, while the product of *orf* 36 is localized in the inner membrane. It is suggested that these genes encode a probable quinolone efflux pump. The aim of this study was to determine if the quinolone resistance system encoded by *orfs* 35-37 of pUM505 conferred resistance to quinolone in bacterial minimal culture broth, besides the resistance to other toxic compounds. The results showed that the transformant of *E. coli* J53-2 with the *orfs* 35-37 conferred resistance to ciprofloxacin and levofloxacin as compared to *E. coli* without the genes, besides the resistance get better when the transformant was grown in a minimal culture, compared to reported resistance when grown in a rich medium. Additionally, it was determined that the resistance system encoded by *orfs* 35-37 it is not specific to quinolones, because the transformant showed resistance to crystal violet too. With the results obtained it can be concluded that the proteins encoded by *orfs* 35, 36 and 37 of plasmid pUM505 encodes for a resistance system to quinolone and crystal violet in a strain of *E. coli*, possibly through an efflux pump.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, pUM505, resistance, quinolone, efflux pump.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Las quinolonas

### 1.1. Historia

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). El hallazgo de la actividad antibacteriana de derivados de la 1,8-naftiridina en el contexto del desarrollo de agentes antimaláricos, permitió la síntesis del ácido nalidíxico (1-etilo-1,4 dihidro-7-metilo-4-oxo-1,8-naftiridina-3-ácido carboxílico), molécula derivada de la cloroquina, en el año de 1962. La actividad de este compuesto ha sido demostrada contra una gran variedad de microorganismos causantes de enfermedades en hombres y animales (Leshner y col., 1962). Siendo la actividad *in vivo* del ácido nalidíxico mayor para bacterias Gram-negativas, que contra las bacterias Gram-positivas que presentan generalmente más resistencia. Así, ya en el año de 1964 el ácido nalidíxico se utilizaba para infecciones del tracto urinario ocasionadas por bacterias Gram-negativas (Mella y col., 2000). Sin embargo, dado que este compuesto presentaba una baja penetración intracelular tras la administración oral y el limitado espectro de actividad, fue restringido principalmente a enterobacterias (Tillotson, 1996).

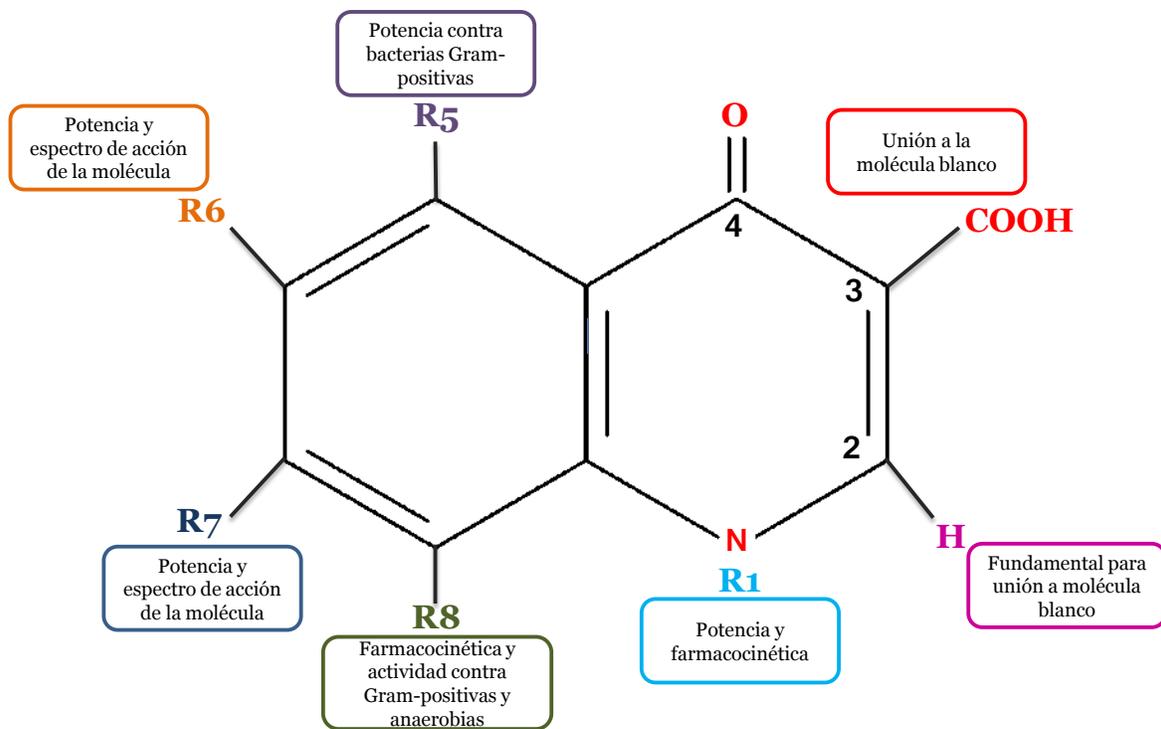
Sobre la estructura base (**Figura 1**) de esta molécula original se intentaron numerosas modificaciones buscando antibióticos con mayor espectro, actividad y

propiedades farmacocinéticas superiores (Ito y col., 1980), por lo que más tarde, a mediados de los años 70's, se realizaron modificaciones a su estructura produciendo compuestos tales como: ácido oxolínico, el ácido pipemídico y la cinoxacina, los cuales presentan a las quinolonas de la primera generación que, aún superaban sólo algunas de las limitaciones del ácido nalidíxico (Leyva y Leyva, 2007). El gran descubrimiento correspondió a la síntesis de compuestos que presentaban los sustituyentes 6-fluoro, 7-piperazinil (norfloxacina, ciprofloxacina y perfloxacina); éstos dieron origen al grupo que genéricamente se ha denominado fluoroquinolonas, 4-quinolonas o simplemente quinolonas (Mella y col., 2000). Con el descubrimiento de las fluoroquinolonas, se dio paso a la segunda generación de quinolonas. La primer fluoroquinolona fue la norfloxacina, sintetizada en 1978, disponible para el uso clínico hasta 1986 (Fábrega y col., 2009).

Por otra parte al transcurrir dos décadas para producir mejoras significativas en la biodisponibilidad y el espectro de acción, con respecto a los primeros compuestos, entre los años 1979 y 1982 numerosas fluoroquinolonas fueron patentadas (Emmerson y Jones, 2003); en 1981 se patentó la ciprofloxacina que presentó un importante avance en el espectro de acción y las propiedades farmacocinéticas, debido a que mostró un aumento significativo en la distribución en plasma y tejidos, así como un efecto sobre bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias productoras de beta-lactamasas introduciéndose en el mercado en 1987 (Fábrega y col., 2009).

Sin embargo, ésta segunda generación de quinolonas tuvieron una actividad limitada contra bacterias Gram-positivas y aerobias clínicamente relevantes. A principios de la década de los 90's aparecieron nuevas moléculas, como la sparfloxacin y temafloxacin (Andersson y MacGowan, 2003). Posteriormente fueron descubiertas fluoroquinolonas con mayor potencia, como las levofloxacin, gatifloxacin y moxifloxacin, las cuales mostraron mayor actividad bactericida contra bacterias Gram-positivas. Además, otras generaciones de quinolonas, como la gemifloxacin, muestran actividad contra anaerobias (Fábrega y col., 2009).

Recientemente, se está desarrollando un nuevo grupo de quinolonas que se caracterizan por la ausencia del átomo flúor, característico de las fluoroquinolonas. Estas nuevas moléculas son conocidas con el nombre quinolonas no fluoradas (QFN), siendo la garenoxacin el primer representante de este grupo y que presenta un amplio espectro de acción contra Gram-positivas, Gram-negativas, anaerobias y sobre la mayoría de los microorganismos intracelulares (*Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Borrelia burgdorferi* (Gutierrez-Zufiaurre, 2004). Dentro de este grupo se han desarrollado compuestos, como el PGE-9262932 (Jones y col., 2002) o el T-3912 (Yamakawa y col., 2002).



**Figura 1. Estructura base de las quinolonas y propiedades que brindan los sustituyentes.** Se marcan con grupos **R** las posiciones más comúnmente sustituidas. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones de cada posición (Modificada de Anderson y MacGowan, 2003).

## 1.2. Estructura

Las quinolonas son uno de los compuestos más investigados en el campo de la medicina; desde el informe original de Lesher, han existido aproximadamente 10000 análogos del ácido nalidíxico o de fluoroquinolonas que han sido sintetizados (Tillotson, 1996). Esto debido a que ofrecen gran cantidad de atributos del antibiótico ideal, como potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, alto volumen de distribución y bajos efectos secundarios (Andersson y MacGowan, 2003). Al ser agentes obtenidos sintéticamente, se ha podido obtener un amplio conocimiento sobre su estructura, sus sustituyentes y las propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y tóxicas que poseen (Mella y col., 2000) **(Figura 1)**. La estructura molecular de las quinolonas ha sido adaptada a través del tiempo con respecto a las necesidades clínicas. El núcleo naftiridona del ácido nalidíxico se convirtió en la base de una serie de más componentes activos (Ball, 2000).

Sin embargo existen tres posiciones, 2, 3 y 4, que no pueden ser cambiadas sin una significativa disminución de actividad biológica (Peterson, 2001); en la posición 2, un átomo de hidrógeno es lo más apropiado, ya que la sustitución con un grupo más grande puede crear impedimento estérico con las posiciones 3 y 4, donde se encuentra un grupo carboxilo y un grupo ceto, respectivamente, que son indispensables para que la molécula presente actividad antibacteriana, debido a que son esenciales para la unión a las moléculas blanco (Tillotson, 1996).

En el carbono 1 parece ser que un grupo ciclopropil es óptimo para este sitio, el cual forma parte de la unión al sitio blanco (Peterson, 2001), confiriéndole actividad contra bacterias Gram-negativas. A su vez, los grupos 2,4-difluorofenil incrementan la actividad contra anaerobios (Tillotson, 1996).

En la posición 5, un gran número de modificaciones se han intentado para mejorar la actividad contra Gram-positivas; uno de los primeros sustituyentes utilizados fue el grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), como en la esparfloxacin (Andersson y MacGowan, 2003). Otro cambio en este nivel es la presencia de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ), como en la grepafloxacin, que se caracteriza por propiedades farmacocinéticas favorables y mayor espectro de acción sobre *Streptococcus pneumoniae* (Mella y col., 2000).

La adición de una molécula de flúor en la posición 6 fue uno de los primeros cambios a la estructura, ésta sola alteración provee más de 10 veces la inhibición de la DNA girasa (Andersson y MacGowan, 2003). La presencia de este sustituyente aumentó la unión al complejo topoisomerasa-DNA (2-17 veces) así como la penetración intracelular (1-70 veces) en relación con otros derivados no fluorados (Mella y col., 2000). Los grupos de hidrógeno y amino han sido investigados como sustituyentes útiles en ésta posición, remplazando el Flúor de las fluoroquinolonas (Peterson, 2001) **(Figura 1)**.

La posición 7, es considerada una de las que interactúan directamente con la DNA girasa o la topoisomerasa IV (Peterson, 2001). Por tanto, uno de los puntos más influyentes en la molécula y, casi sin excepción alguna, las que posean heterociclos de Nitrógeno, de cinco o seis miembros, en esta posición han

mejorado la actividad de la molécula y su perfil farmacocinético (Tillotson, 1996). En general las quinolonas con grupos lineales o pequeños poseen una menor potencia antibacteriana (Mella y col., 2000). Los heterociclos mayormente empleados en ésta posición son pirrolidinas y piperazinas que mejoran la actividad contra Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente (Tillotson, 1996). Diversas investigaciones sugieren que un anillo de piperazina podría jugar un papel en los mecanismos de expulsión, mejorando de este modo la potencia de la droga (Andersson y MacGowan, 2003).

Varios sustituyentes, en la posición 8, mejora la actividad particularmente contra bacterias anaerobias (Andersson y MacGowan, 2003); por lo que la presencia de halógenos es muy utilizada además de mejorar la absorción por vía oral (Mella y col., 2000).

El conocimiento actual de la relación estructura-actividad ha ganado con el tiempo el desarrollo de un gran número de componentes dentro del grupo de las quinolonas (Peterson, 2001).

### **1.3. Clasificación**

La actividad microbiológica de las fluoroquinolonas y las naftiridinas ha crecido dramáticamente con cada generación de las quinolonas que ha sido descubierta (Ball, 2000).

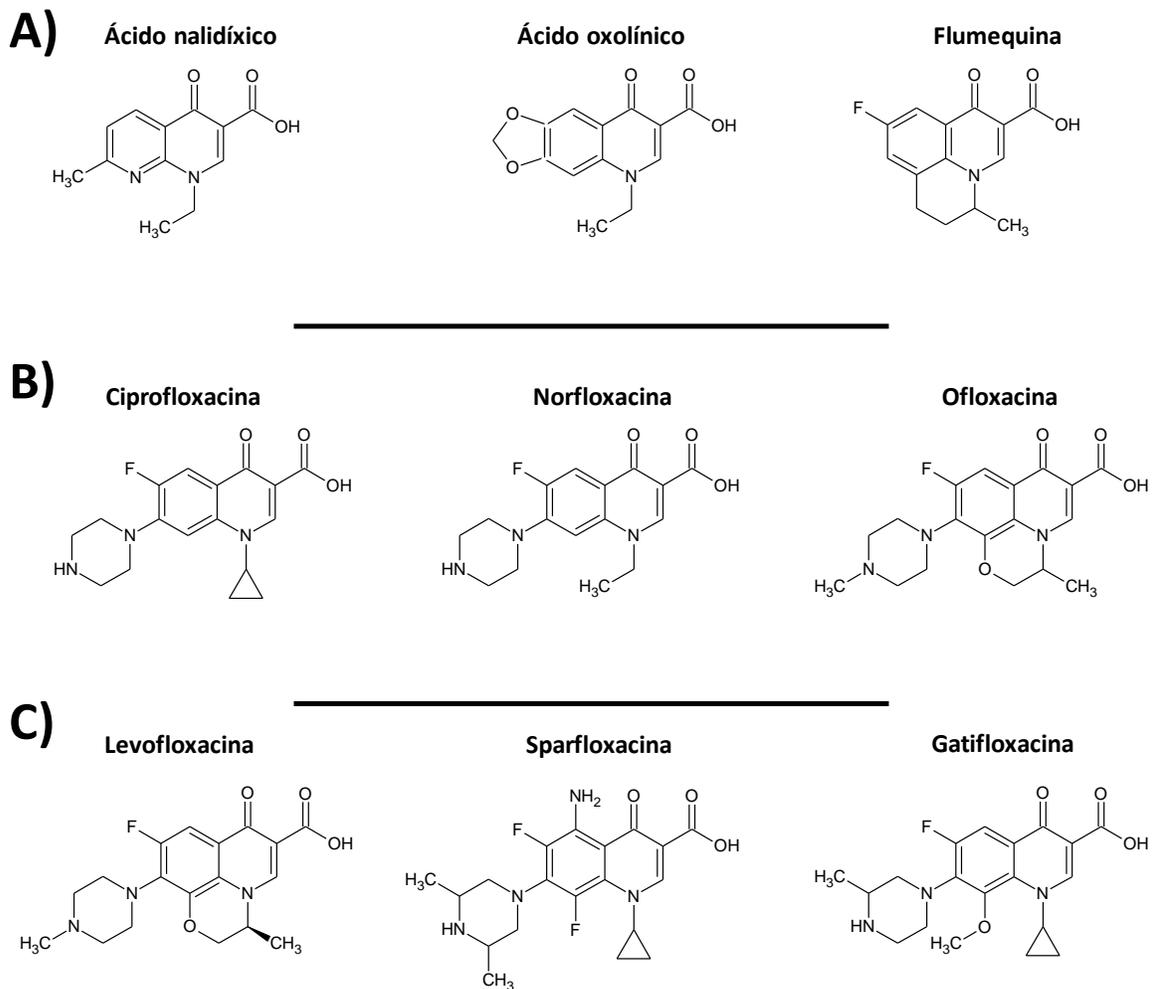
Las podemos clasificar en cuatro generaciones en función a la actividad antimicrobiana que poseen (Oliphant, 2002).

### **1.3.1. Primera generación**

De primera generación serían las moléculas históricamente más antiguas y que definen los núcleos químicos básicos de estos antimicrobianos, donde encontramos el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacina, ácido piromídico, ácido pipemídico y la flumequina (Mella y col., 2000). Presentan actividad contra enterobacterias y algunas bacterias Gram-negativas; sin embargo, alcanzan concentraciones bajas en suero, su distribución sistémica es baja y sólo pueden usarse para tratamiento de algunas infecciones urinarias (Alós, 2003) **(Figura 2A)**.

### **1.3.2. Segunda generación**

La segunda generación de las quinolonas ha estado disponible desde mediados de 1980 y han sido responsables de un enorme cambio en el tratamiento clínico en importantes infecciones. Con el invento de la ciprofloxacina, casi en los primeros años, infecciones causadas por Gram-negativos así como infecciones respiratorias causadas por *P. aeruginosa* en niños con fibrosis quística pudieron ser tratadas con gran efectividad (Ball, 2000). Otros miembros de esta generación son la norfloxacina, enoxacina, orfloxacina, entre otros; todas caracterizadas por la



**Figura 2. Quinolonas de la primera, segunda y tercera generación. A)** Se muestran estructuras de las quinolonas de primera generación, **B)** quinolonas de segunda generación y **C)** quinolonas de la tercera generación (Modificado de Mella y col., 2000).

presencia del flúor en la posición 6 y de piperazina en la posición 7 (Mella y col., 2000) **(Figura 2B)**.

### **1.3.3. Tercera generación**

La tercera generación de quinolonas se caracterizó por la presencia de grupos cíclicos aminados en el C-7, junto con la presencia, cada vez más frecuente, de sustituciones en los radicales C-5 y C-8 (Mella y col., 2000). Mantienen actividad contra Gram-negativos así como patógenos intracelulares atípicos, teniendo una mejora hacia bacterias Gram- positivas (Oliphant, 2002). Representan una importante alternativa sobre *S. pneumoniae*, incluyendo cepas resistentes a penicilina; la sparfloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin son algunas de las quinolonas que pertenecen a este grupo (Mella y col., 2000). Sin embargo, la levofloxacin, incluida entre las de tercera generación, es más activa que otras de su grupo frente a Gram-positivos y su pico sérico es lo suficientemente alto como para obtener un buen índice terapéutico frente a estos microorganismos (Alós, 2003) **(Figura 2C)**.

### **1.3.4. Cuarta generación**

Se caracterizan por presentar grupos cíclicos en la posición 1 y 7 que tienen uno o más átomos de flúor (Ambrose y col., 1997). Estos agentes ampliaron su cobertura contra bacterias Gram-positivas, mantienen su acción contra Gram-negativas y

poseen actividad sobre anaerobios (Oliphant, 2002). Dentro de este grupo se encuentran la trovafloxacin, la clinafloxacin, la gemifloxacin y moxifloxacin (Mella y col., 2000) **(Figura 3A)**.

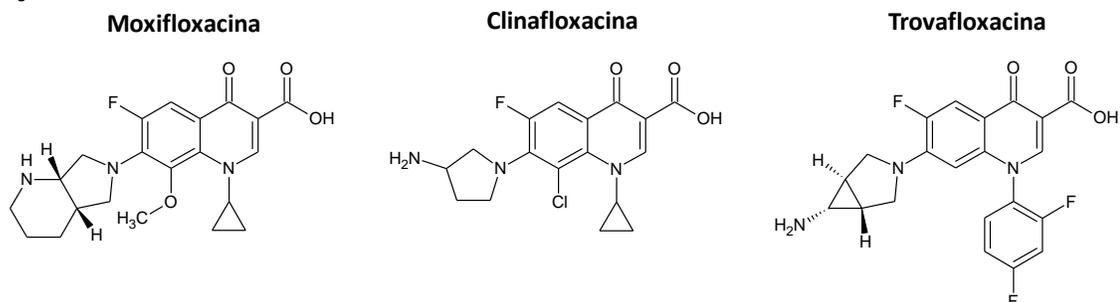
### **1.3.5. Quinolonas no fluoradas**

Son quinolonas de reciente aparici3n que se caracterizan por la ausencia del grupo flúor en la posici3n 6. Tienen espectro de acci3n sobre Gram-negativas, Gram-positivas y bacterias anaerobias. Como representantes de este grupo se encuentran la geranoxacin (Morosini y col., 2003), PGE 9262932 y PGE 9509924 (Jones y col., 2002) **(Figura 3B)**.

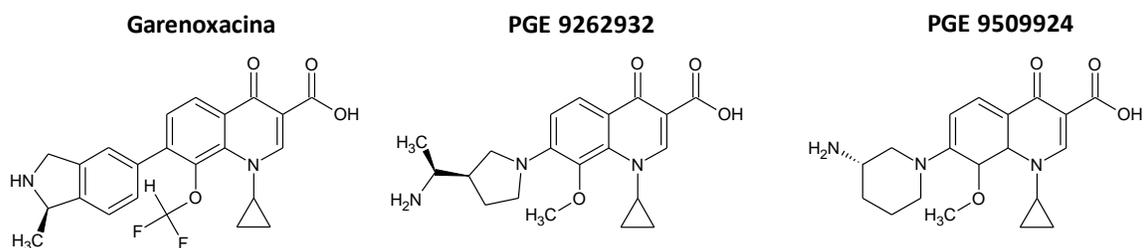
### **1.3.6 Mecanismo de acci3n**

Las quinolonas penetran al interior de la c3lula de las bacterias por un sistema de difusi3n pasiva, atravesando la membrana a trav3s de las porinas (Morrissey y col., 1996). Su mecanismo de acci3n es complejo, actúan en el DNA cromos3mico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas tipo IIA e inhibiendo su acci3n (Al3s, 2003). Interviniendo así sobre la DNA girasa principalmente en organismos Gram-negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram-positivos (Leyva y Leyva, 2007). Aunque algunas bacterias son capaces de funcionar s3lo con la DNA girasa, la mayoría de ellas poseen ambas enzimas (Jacoby, 2005). Estas topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de s3ntesis del DNA,

**A)**



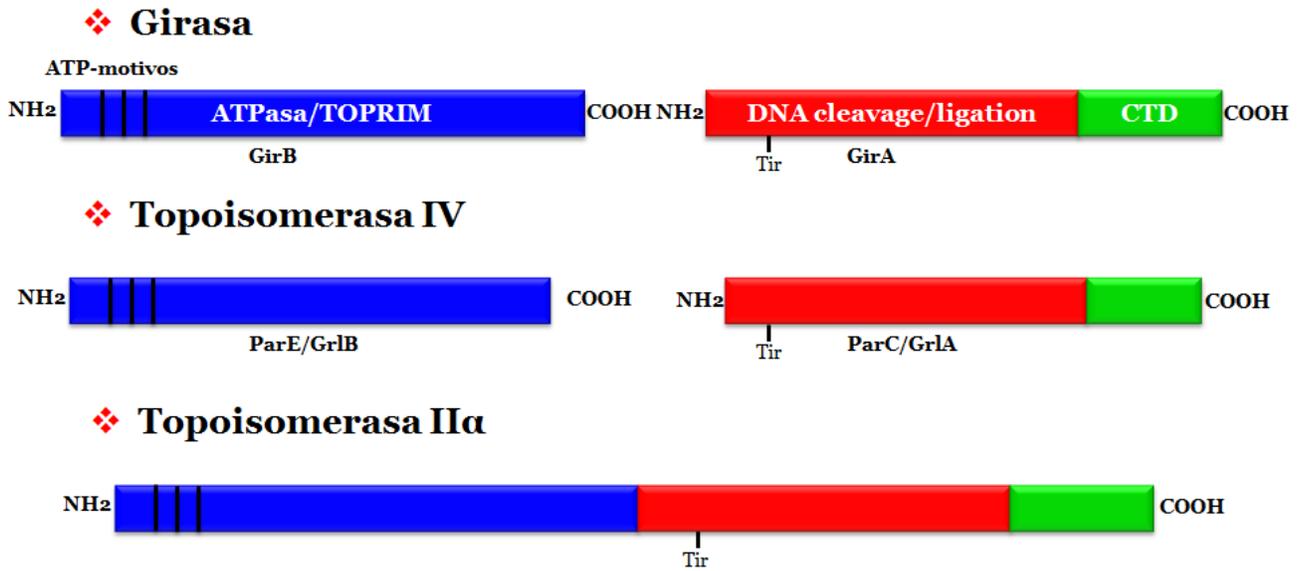
**B)**



**Figura 3. Quinolonas de la cuarta generación y quinolonas no fluoradas. A)** Se muestran estructuras de las quinolonas de cuarta generación y **B)** quinolonas no fluoradas (no presentan el átomo flúor en la posición 6) (Modificado de Mella y col., 2000; Jones y col., 2002).

mediante desenrollamiento y enrollamientos del DNA cromosómico (Alós, 2003). Éstas trabajan de manera conjunta en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA (Jacoby, 2005). Sin embargo, aunque ambas enzimas muestran un alto grado de similitud en sus estructuras y funciones, su función específica difiere durante la replicación del DNA (Fábrega y col., 2009). La DNA girasa es un tetrámero de dos subunidades A de 97 kilodaltons (kDa) y dos subunidades B de 90 kDa, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente (Hawkey, 2003) **(Figura 4)**. Ésta enzima es dependiente de la hidrólisis de ATP para introducir superenrollamientos negativos en el DNA (Fábrega y col., 2009), liberando la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción (Leyva y Leyva, 2007). También participa en el catenamiento y decatenamiento de las hebras de DNA que permite la acción de las DNA polimerasas (Jacoby, 2005). Éste superenrollamiento unidireccional del DNA es causado por un dominio especializado de la enzima, la cual avanza antes que la horquilla de replicación (Fábrega y col., 2009). En la girasa las quinolonas interaccionan con aminoácidos de las alfa hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del DNA (Alós, 2003) **(Figura 4)**. La topoisomerasa IV es un homólogo de la DNA girasa, compuesto por 4 subunidades, dos de la subunidad C (75 kDa) y dos de la E (70 kDa), codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente (Hawkey, 2003) **(Figura 4)**.

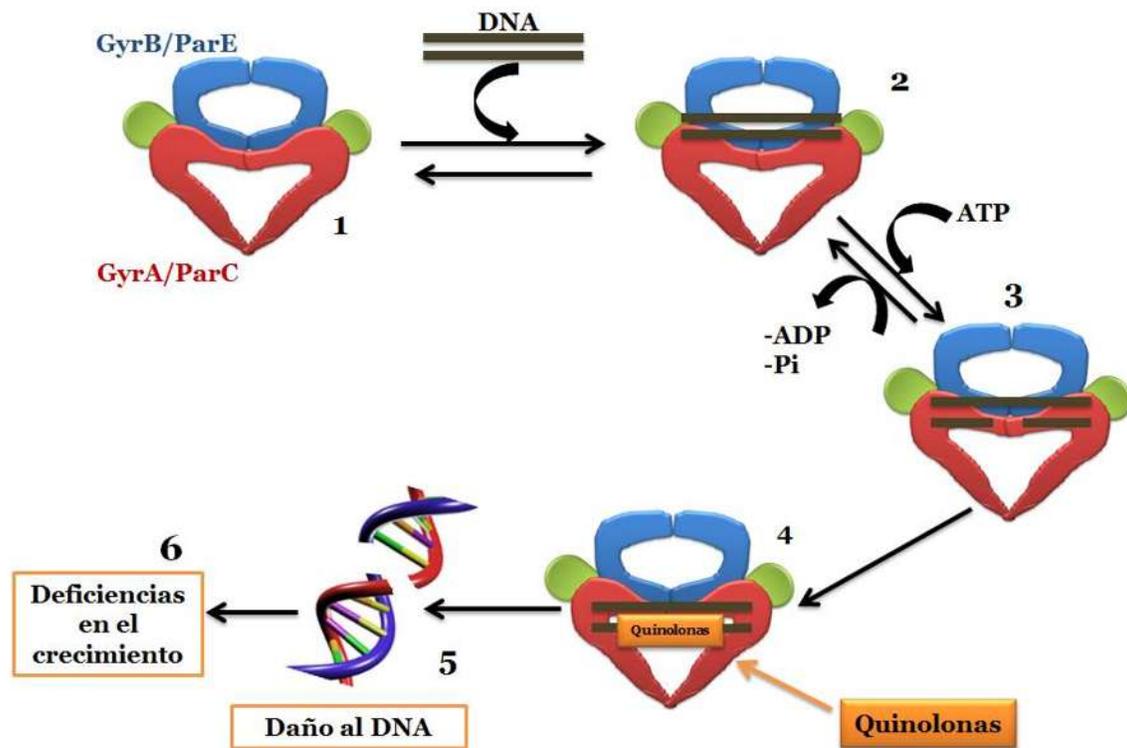
La topoisomerasa IV tiene dos funciones en la célula, en primer lugar esta enzima está involucrada en la decatenación de los cromosomas hijos después de la



**Figura 4. Dominios de la estructura de las topoisomerasas tipo II.** Se muestra la representación gráfica de las topoisomerasas tipo II. La subunidad A (rojo con verde) de GirA, ParC y GrlA, (en la Girasa, la Topoisomerasa IV y topoisomerasa II $\alpha$ , respectivamente) contiene el sitio activo del residuo de tirosina (Tyr) que se une de manera covalente al DNA en el extremo 5' terminal. El dominio C terminal (CTD, en verde) de la subunidad A es variable y permite a la girasa introducir superenrollamientos negativos en el DNA. La subunidad B (azul) de GyrB, ParE y GrlB (en la girasa, la topoisomerasa IV y II $\alpha$ , respectivamente) contiene los dominios ATPasa y TOPRIM (une los iones catalíticos esenciales para la actividad enzimática) (Modificado de Aldred y col., 2014).

replicación, es requerida en las últimas etapas de la replicación para desligar nuevos cromosomas hijos. Estos enlaces deben ser removidos para segregar los cromosomas y los plásmidos dentro de las células hijas, así la división puede ser completada (Fábrega y col., 2009); en segundo lugar participa en la separación de las hebras de DNA tras cada replicación; también tienen actividad relajante sobre la cadena de DNA (Alós, 2003), permitiendo la separación del DNA recién sintetizado del utilizado como molde por las DNA polimerasas durante la replicación (Jacoby, 2005). ParC es la subunidad responsable de la unión al DNA, de la escisión y religación, mientras que ParE es la responsable de la unión e hidrólisis del ATP (Fábrega y col., 2009) **(Figura 4)**.

Normalmente, la girasa y la topoisomerasa IV generan cortes en la cadena sencilla de DNA y se unen de esta manera mediante enlaces covalentes con el extremo 5', formándose el complejo DNA-topoisomerasa (Aldred y col., 2014). Sin embargo, las quinolonas se unen reversiblemente de una manera no covalente al complejo enzima-DNA, tomando ventaja de la habilidad de las topoisomerasas IIA de fragmentar el DNA (Aldred y col., 2014), poco después de la unión de las quinolonas se induce un cambio conformacional en la enzima, la cual queda atrapada en el DNA (Hawkey, 2003), formándose entonces un complejo quinolona-enzima-DNA y causando diversos tipos de daños no reversibles (Drlica y col., 2009) **(Figura 5)**. Cuando se forma el complejo quinolona-girasa-DNA rápidamente inhibe la replicación y es consistente con la girasa actuando por delante de la horquilla de replicación. Sin embargo, la inhibición de la replicación por el complejo quinolona-topoisomerasa IV-DNA ocurre lentamente, consistente



**Figura 5. Mecanismo de acción de las quinolonas sobre la ADN girasa y la topoisomerasa IV. 1)** Se muestran las subunidades GyrB/ParE y GyrA/ParC (azul y rojo, respectivamente). **2)** Se forma el complejo topoisomerasa DNA. **3)** La enzima corta el ADN. **4)** Se forma el complejo DNA-quinolona-topoisomerasa, que impide la religación del DNA generando un daño en éste, ocasionando deficiencias en el crecimiento **5)** o la muerte celular **6)** (Modificado de Hawkey, 2003).

por detrás de la horquilla de replicación. Se requieren altas concentraciones de quinolona para la muerte celular y no sólo para inhibir su crecimiento (Hawkey, 2003). Se piensa que la acción letal de la droga, es la fragmentación del cromosoma teniendo como resultado la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, debido a la naturaleza reversible de los complejos éstos no son letales por sí mismos (Drlica y col., 2009).

#### **1.4 Sistemas de resistencia a las quinolonas**

Desde la introducción del ácido nalidíxico en los años 60's, el uso de las quinolonas ha ido creciendo, seguido por un aumento en la resistencia de las bacterias (Tran y col., 2001). Debido a las mejoras tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas, aportadas por modificaciones en la estructura del ácido nalidíxico, las quinolonas de segunda generación (ciprofloxacina, ofloxacina, etc.) se convirtieron en fármacos de primera línea frente a numerosas infecciones. Sin embargo, su amplio espectro, gran actividad y buena tolerabilidad propiciaron una amplia difusión de su uso, originándose la aparición de resistencia tanto en microorganismos Gram-negativos, especialmente en *P. aeruginosa* o *E. coli*, y en microorganismos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* (Leyva y Leyva, 2007). El rango de resistencia a ciprofloxacina es aún mayor en bacterias como *P. aeruginosa* y bacterias Gram-negativas no entéricas (Jacoby, 2005). Al ser antibióticos sintéticos, se creyó que las mutaciones en las células blanco sería el único mecanismo de resistencia que

podieran adquirir, debido a que no podría haber genes de resistencia a quinolonas en la naturaleza. Contrario a esta predicción, una variedad de elementos desde sistemas de expulsión, proteínas de protección, incluso modificaciones enzimáticas de quinolonas, han mostrado contribuir a la resistencia. El hallazgo de algunos de estos mecanismos en plásmidos, indica que fue transferido de una bacteria a otra (Hernández y col., 2011).

Por lo que, existen dos mecanismos principales relacionados con el desarrollo de la resistencia a antibióticos, mutaciones y adquisición de resistencia por genes de transferencia horizontal (HGT). La resistencia a antibióticos es considerado entonces un proceso evolutivo, impulsado por la presión selectiva de antibióticos (Martínez y col., 2009). Así pues, la obtención de resistencia a las quinolonas puede ser atribuida a: i) mutaciones cromosómicas en los genes que codifican las proteínas blanco, mutaciones que causan una reducción de la concentración de la droga, ya sea por una disminución en la captación de la misma o un aumento en los sistemas de expulsión, y finalmente ii) genes localizados en plásmidos asociados a la resistencia a quinolonas (Fábrega y col., 2009). Las alteraciones celulares asociadas en cada mecanismo no son exclusivas, ya que se pueden acumular y crear cepas que muestran un alto grado de resistencia (Aldred y col., 2014). El hecho de que mutaciones específicas en la DNA girasa y la topoisomerasa IV cause la resistencia, sugiere que la interacción entre droga-proteína tiene un papel importante en la estabilidad de los complejos (Aldred y col., 2014)

### **1.4.1 Mutaciones cromosómicas**

### **1.4.2 Mutaciones en los genes codificantes de las moléculas blanco de las quinolonas**

El mecanismo más importante de resistencia es la alteración de su diana (Alós y col., 2003), asociada a mutaciones específicas en la girasa y la topoisomerasa IV (Aldred y col., 2014). Esta resistencia sucede primero en el gen *gyrA* en bacterias Gram-negativas, y en *parC* en Gram-positivas. Se ha reportado que la razón de esto es debido a que en Gram-negativas, la topoisomerasa IV es menos sensible a las quinolonas que la girasa, lo opuesto ocurre para microorganismos Gram-positivos, donde en estas especies de bacterias la topoisomerasa IV es el primer blanco de las quinolonas y como consecuencia las mutaciones suceden primero en esta región (Hernández y col., 2011). Lo que ocurre es una sustitución de aminoácidos en las regiones de las subunidades GirA o ParC denominadas “regiones determinantes de resistencia a quinolonas” (QRDR). Esta región se encuentra en la superficie de unión al DNA de la enzima (Jacoby y col., 2005) y que en GyrA está entre los aminoácidos 67 y 106 (Alós, 2003). Los cambios en los aminoácidos en ésta región alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas y consecuentemente hay una disminución de la afinidad por el complejo girasa-DNA (Alós, 2003), por lo que varía la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Fábrega y col., 2009). De este modo, serán necesarias mayores concentraciones de fármaco para conseguir un mismo efecto sobre la bacteria (Leyva y Leyva, 2007). Se han descrito numerosas investigaciones con diferente repercusión en la disminución de la sensibilidad a las quinolonas, existen dos

mutaciones básicas: serina 83 por triptófano y ácido aspártico 87 por asparagina en *E. coli*, o en las mismas posiciones en otros microorganismos. En cepas con alto grado de resistencia se ha observado que se tienen mutaciones en otros puntos de GyrA, adicionales a las mutaciones iniciales. Las mutaciones en las subunidades B aparecen con frecuencia relativamente bajas en cepas clínicas, originando además incrementos de resistencia moderados (Leyva y Leyva, 2007). Adicionalmente, la estructura química de las quinolonas puede tener un efecto en la preferencia del blanco. El primer blanco de la ciprofloxacina en *S. pneumoniae* es la topoisomerasa IV, pero para la clinafoxacina su primer blanco es la girasa (Hawkey, 2003).

#### **1.4.3 Cambios estructurales y disminución en la expresión de las porinas**

Para llegar a las células blanco, las quinolonas deben atravesar la pared celular y la membrana citoplásmica en bacterias Gram-positivas; y una membrana interna adicional en las bacterias Gram-negativas (Jacoby, 2005). Estudios anteriores muestran que el bajo nivel de resistencia se relaciona con la entrada a la célula bacteriana y se caracteriza por cambios en las porinas (Hawkey, 2003), que son proteínas de la membrana externa que forman canales de difusión pasiva (Fábrega y col., 2009), especialmente cambios estructurales en OmpF y cambios por mutaciones en los genes que regulan su expresión (*marA*, *xoxS*, *robA*) (Hawkey, 2003). En bacterias Gram-negativas se han descrito resistencias de bajo nivel por alteraciones en las porinas que hay en la membrana externa (Alós,

2003). En general, cambios en la difusión causa un ligero aumento en la resistencia a quinolonas, que no parece causar un problema clínico mayor. Sin embargo, la disminución de la concentración celular de la droga, crea un ambiente favorable para el desarrollo de otras formas de resistencia adicionales (Aldred y col., 2014).

#### **1.4.4 Sistemas de expulsión**

La disminución de la acumulación de quinolona puede asociarse con una superregulación de ciertas proteínas de envoltura de la célula, que puede facilitar la expulsión de estos agentes, dichos sistemas de expulsión dependiente de energía pueden ser específicos a una droga o puede tener amplia especificidad, llamados transportadores de multidrogas (Fábrega y col., 2009). Se ha constatado que la sobreexpresión de bombas de expulsión activa, puede llevar a la resistencia a quinolonas tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos (Alós, 2003). Los transportadores activos han sido clasificados en cinco superfamilias: la superfamilia facilitador mayor (MFS), la familia de casete de unión a ATP (ABC), la familia de resistencia-nodulación-división (RND), la familia pequeña de resistencia a múltiples fármacos (SMR) y la familia de proteínas de expulsión de multidrogas y compuestos tóxicos (Fábrega y col., 2009).

En las bacterias Gram-positivas, se han estudiado transportadores pertenecientes a la familia MFS, algunas a SMR y la familia ABC (Fábrega y col., 2009), formados por una proteína de membrana que transporta quinolonas del citoplasma al

exterior celular (Hooper, 2005). En *S. aureus*, se caracterizó el sistema de expulsión NorA, perteneciente a una cepa clínica resistente a norfloxacin (Fábrega y col., 2009) **(Figura 6A)**. La caracterización de sistemas de flujo de multidrogas (MDR), que están codificadas en el núcleo del genoma de casi todas las especies bacterianas, ha abierto un nuevo campo de estudio para el entendimiento de mecanismos relacionados con la resistencia a quinolonas. Se ha estudiado en cepas mutantes que tenían una sobreexpresión de estos sistemas de expulsión, codificados en el cromosoma, las cuales eran menos susceptibles a la acción de estos agentes que en las cepas control (Hernández y col., 2011).

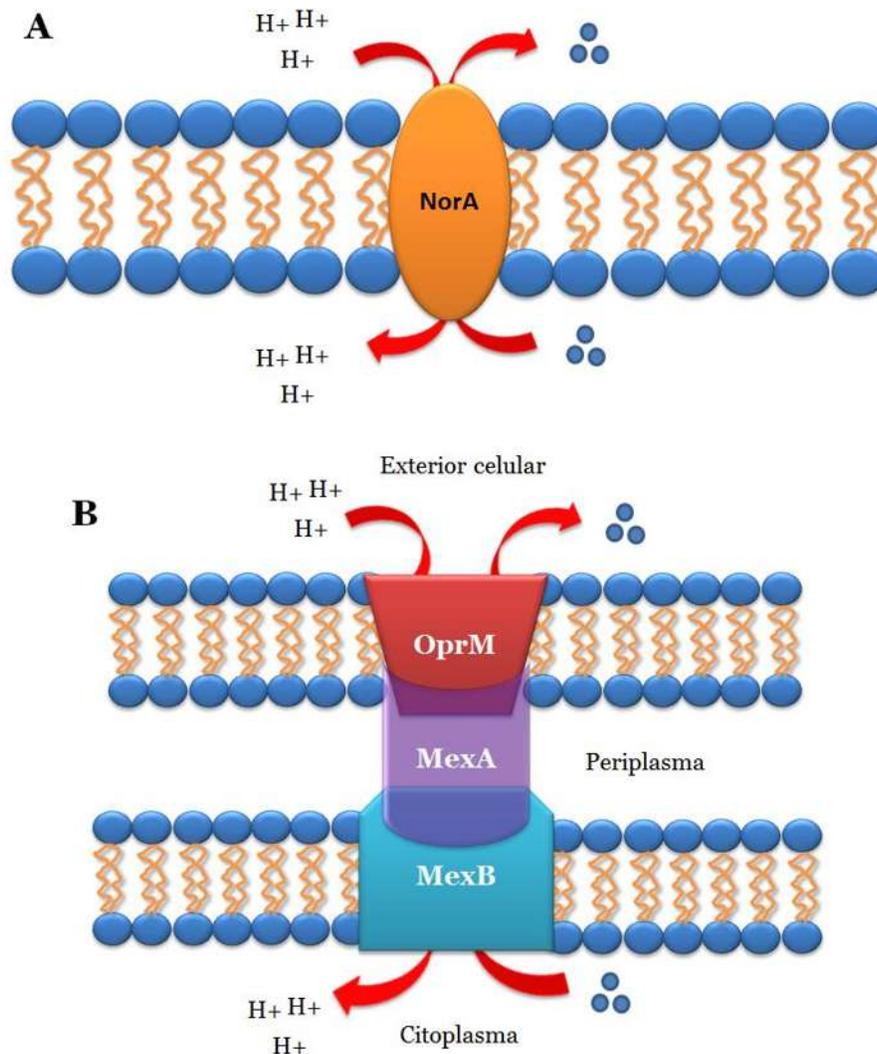
Existen diversos genes que se cree codifican una proteína transportadora de drogas en enterobacterias, ya que la secuencia es similar en sus marcos de lectura abiertos (ORFs). En bacterias Gram-negativas se han reportado sistemas de expulsión que confieren resistencia a quinolonas conformados por tres proteínas; una proteína de membrana interna, una proteína de periplasma y una proteína de membrana externa (porina), a los que se les denomina sistemas tripartitas **(Figura 6B)** (Sánchez-Díaz, 2003). Se ha demostrado, en bacterias Gram-negativas como *E. coli*, que la sobreexpresión de sistemas como AcrAB/TolC, que pertenecen a la familia RND, juega un papel importante como sistemas de transporte implicado en la expulsión de quinolonas. Estos sistemas de expulsión está conformado por tres sistemas: las proteínas AcrA, proteína de fusión a la membrana, AcrB, proteína de transporte dependiente de energía anclado a la membrana interna y TolC, la proteína de membrana externa,

mutaciones en ellos incrementa la sobreexpresión y por consiguiente su actividad de expulsión (Fábrega y col., 2009).

Otros sistemas tripartitas que se han estudiado es en *P. aeruginosa*. Cada sistema consta de un componente de la membrana citoplasmática de la familia RND, que se cree funciona como un transportador, un componente de la membrana externa que forma canales y una proteína de fusión de la membrana, que supone vincular las proteínas de la dos membranas (**Figura6 B**). El sistema de eflujo MexA-MexB-OprM contribuye tanto a la resistencia intrínseca y adquirida, mientras que el MexC-MexD-OprJ y los sistemas MexE-MexF-OprN contribuyen a la resistencia adquirida en esta bacteria. Sin embargo, MexA-MexB-OprM es el principal sistema de expulsión en cepas silvestres (**Figura 6B**). Donde su sobreexpresión contribuye al desarrollo de resistencia en múltiples antibióticos (Li y Zhang, 1998). El sistema MexAB-OprM, actúa sobre un rango de antibióticos incluyendo a tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, macrolidos y b-lactámicos (Li y Zhang, 1998).

### **1.5 Mecanismos Plasmídicos de resistencia**

Debido al origen sintético de las quinolonas en un inicio se creyó que mutaciones en los genes que codifican las proteínas blanco, la disminución de porinas y la sobreexpresión de sistemas de expulsión serían las únicas alternativas de resistencia (Hernández y col., 2011). Sin embargo, recientemente, plásmidos que poseen genes de resistencia a quinolonas han sido identificados representando un problema clínico, aunque generalmente causa niveles bajos de resistencia (Aldred



**Figura 6. Sistemas de expulsión de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas relacionados con resistencia a quinolonas. A)** Sistema NorA de *S. aureus* compuesto por una proteína. **B)** Sistema tripartita MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. MexB; proteína de membrana interna, MexA; proteína de periplasma y OprM; porinas (Modificado de Poole, 2005).

y col., 2014) conlleva dos amenazas a la eficacia de estos agentes: primero, que los plásmidos pueden transmitir a otras bacterias la resistencia a múltiples antimicrobianos y segundo, que los plásmidos pueden introducir dicha resistencia en una frecuencia aún mayor que la que ocurre durante una mutación espontánea (Drlica y col., 2009). Además, estos plásmidos generalmente poseen genes adicionales, que causan resistencia a otra clase de drogas (Aldred y col., 2014).

### **1.5.1 Proteínas Qnr**

Con la frecuencia del aumento de resistencia a las quinolonas, y debido a que el conocimiento de su desarrollo por efecto de mutaciones, no era del todo satisfactorio para explicar este constante fenómeno, se pensó que probablemente se debía a una transferencia horizontal de genes la cual podría ayudar a la reducción de susceptibilidad a quinolonas. En 1998 se descubrió el gen *qnr*, perteneciente a un plásmido que media la transferencia horizontal de genes de resistencia (Strahilevitz y col., 2009). El gen *qnr* fue clonado y se observó que producía una proteína de 219 aminoácidos, perteneciente a la familia de pentapéptidos repetidos, miembros que participan en las interacciones proteína-proteína (Jacoby, 2005), la cual fue denominada Qnr por ser resistente a quinolonas (Robicsek y col., 2006). Estas proteínas, podrían transferir dicha resistencia por diversos mecanismos diferentes, reduciendo la unión de la girasa y la topoisomerasa IV al DNA, y por lo tanto, protegen las células de las quinolonas, disminuyendo el número de células enzimas en el cromosoma. También se unen a

las moléculas blanco e inhiben la entrada de las quinolonas a los complejos que forman las enzimas con el DNA, durante la replicación (Aldred y col., 2014). Se han descrito 5 familias qnr: qnrA, qnrB, qnrC, y qnrD descritas en plásmidos en diferentes bacterias patógenas (Hernández y col., 2011). Se han identificado estos péptidos en diferentes especies, como, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* sp, *Klepsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* (Yamane y col., 2007). A su vez, en *K. oxytoca*, se ha reportado una variante de *qnrA*, difiriendo del gen original por cuatro aminoácidos. A esta variante se le denominó *qnrA2* (Strahilevitz y col., 2009).

### **1.5.2 Modificación a la estructura molecular de las quinolonas.**

Posterior al descubrimiento de QnrA, al investigar la desigualdad en el nivel de resistencia a quinolonas transferida por diferentes plásmidos *qnr*, observaron que cepas clínicas de *E. coli* poseían niveles cuatro veces más altos de resistencia a ciprofloxacina, que lo reportado anteriormente por genes *qnr*. Sin embargo, este aumento de nivel no era causado por *qnrA*, como en otros plásmidos. Mediante mutagénesis por transposición del DNA plasmídico se encontró el gen responsable *aac-(6')-I*, el cual posee dos cambios en los codones Trp102Arg y Asp179Tyr, los cuales son relevantes y suficientes para otorgar el fenómeno de resistencia (Strahilevitz y col., 2009). La enzima AAC-(6')-Ib-cr, denominada así por la resistencia a ciprofloxacina, es una variante de una aminoglucósido-acetiltransferasa (Aldred y col., 2014). Dicha proteína inactiva compuestos como la

ciprofloxacina y la norfloxacina, situando un grupo acetil en el nitrógeno no sustituido del C-7 del anillo de piperazina; sin embargo, no tiene efecto en algunas quinolonas como la levofloxacina y gemifloxacina, entre otras (Drlica y col., 2009).

### **1.5.3 Sistemas de expulsión**

Los sistemas de expulsión pueden actuar en uno o diferentes agentes y pueden estar tanto en cromosoma como en plásmidos. Numerosos mecanismos ya han sido descritos, además de ser reconocidos como determinantes importantes de la resistencia ante las bacterias. Se han encontrado, hasta ahora, dos transportadores de quinolona mediados por plásmido: QepA y OqxAB (Strahilevitz y col., 2009).

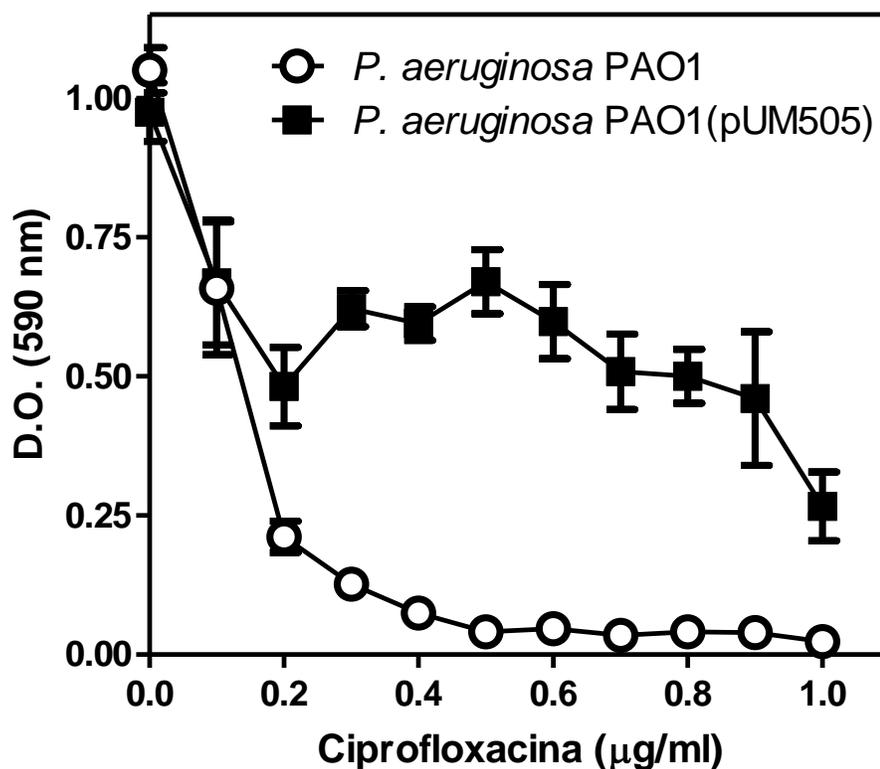
El sistema de expulsión de QepA, codificado por el plásmido pHPA, fue descubierto en una cepa de *E. coli* en Japón (Drlica y col., 2009). Éste plásmido proporciona resistencia a diferentes antibióticos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas y amplio espectro contra  $\beta$ -lactamasas. QepA codifica una proteína de 511 aminoácidos, la cual también otorga resistencia a fluoroquinolonas denominada QepA, es un transportador de 14 segmentos transmembranales (Strahilevitz y col., 2009). Yamane y colaboradores descubrieron que QepA clonado en pSTV28, incrementa la concentración mínima inhibitoria para ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina, en *E. coli*, aumentando 2, 32 y 64 veces respectivamente. Anteriormente se descubrió una variante de QepA, denominada QepA2, que confiere un fenotipo similar (Strahilevitz y col., 2009).

Por otra parte, el plásmido conjugativo pOLA52, que confiere resistencia al antibiótico olaquinox (OQX) utilizado en agricultura y veterinaria como promotor del crecimiento, fue encontrado en cepas de *E. coli* aisladas de estiércol de cerdo (Strahilevitz y col., 2009). Éste sistema denominado OqxAB es codificado por los genes *oqxA* y *oqxB* (Kim y col., 2009). Los genes codifican a 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. Se ha reportado que la resistencia de dicho plásmido es conferida por un sistema de expulsión, perteneciente a la familia RND (Hansen y col., 2004). Se cree que una causa de esta, es consecuencia del uso de OQX como un promotor de crecimiento (Hansen y col., 2004). Asimismo, este sistema confiere resistencia a otros agentes como el cloranfenicol (Strahilevitz y col., 2009). En más investigaciones del espectro de resistencia otorgado por el sistema OqxAB, reveló que un amplio rango de antibióticos son susceptibles a dicho sistema.

## II ANTECEDENTES

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo agua y suelo, así como en asociación con diversos organismos vivos (Battle y col., 2008), es la mayor causa de infecciones hospitalarias y es el patógeno más comúnmente asociado con la mortalidad de pacientes con fibrosis quística. Las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, son antimicrobianos de amplio espectro, y son clínicamente usadas en el tratamiento de infecciones crónicas por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. El uso masivo de estos agentes ha provocado un incremento en el aumento de resistencia en esta bacteria (Breidenstein y col., 2008), conferida principalmente por mutaciones en la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Hancock y Speert, 2000) y por sistemas de expulsión codificados en el cromosoma (Hsu y col., 2005), pero también por la adquisición de plásmidos con resistencia a antibióticos (Martínez y col., 2010).

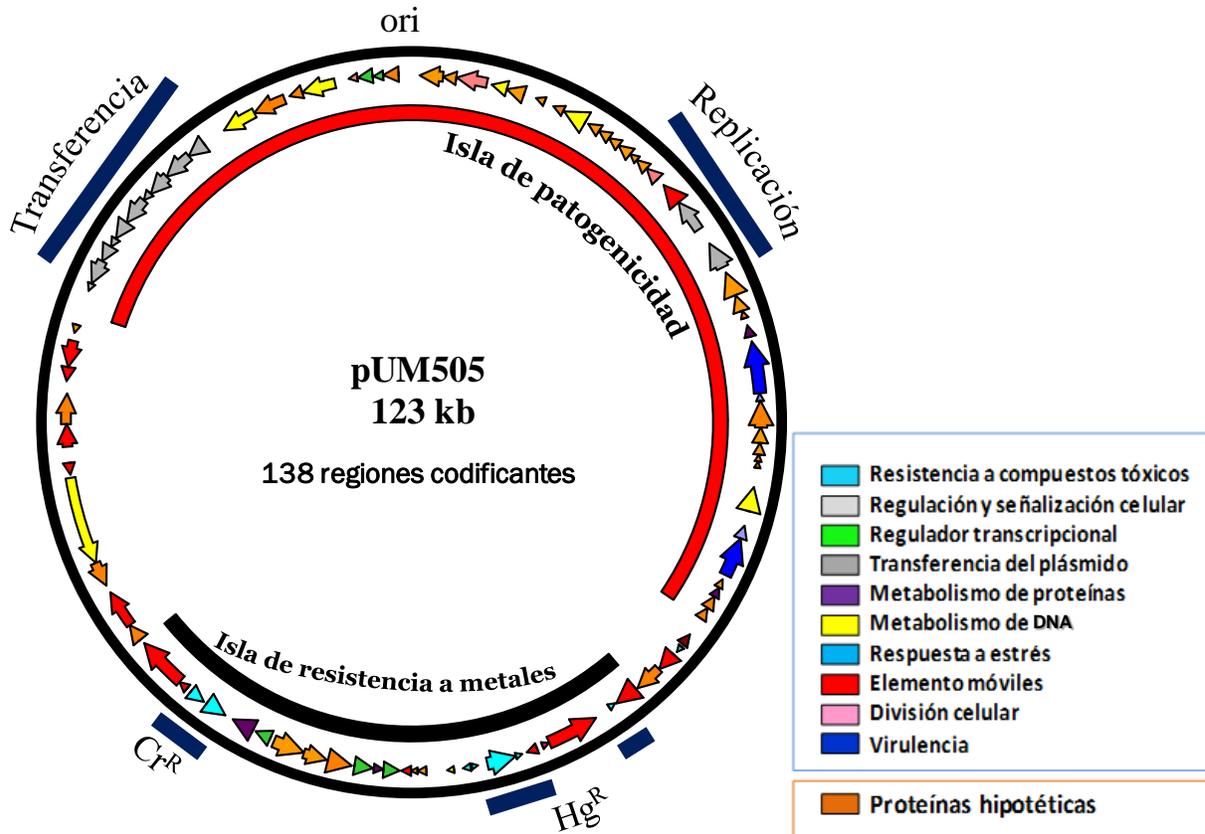
Se ha determinado que el plásmido conjugativo pUM505, aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986; Cervantes y Ohtake., 1988), al ser transferido a las cepas de referencia *P. aeruginosa* PU21 y PAO1 confiere mayor resistencia a quinolonas con respecto a la cepas sin el plásmido (**Figura 7**) (Ramírez-Díaz y col., 2011, Díaz-Magaña, 2011). El plásmido pUM505 fue secuenciado y se realizó el análisis *in silico* donde se identificaron 138 regiones codificantes (Ramírez-Díaz y col., 2011). El plásmido 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



**Figura 7. Curva de susceptibilidad a ciprofloxacina de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505).** Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C y agitación constante. Posteriormente se midió el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (■) y *P. aeruginosa* PAO1 (□). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3 (duplicado) (Díaz-Magaña, 2011).

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 para proteínas hipotéticas distribuidas en diferentes regiones del plásmido.

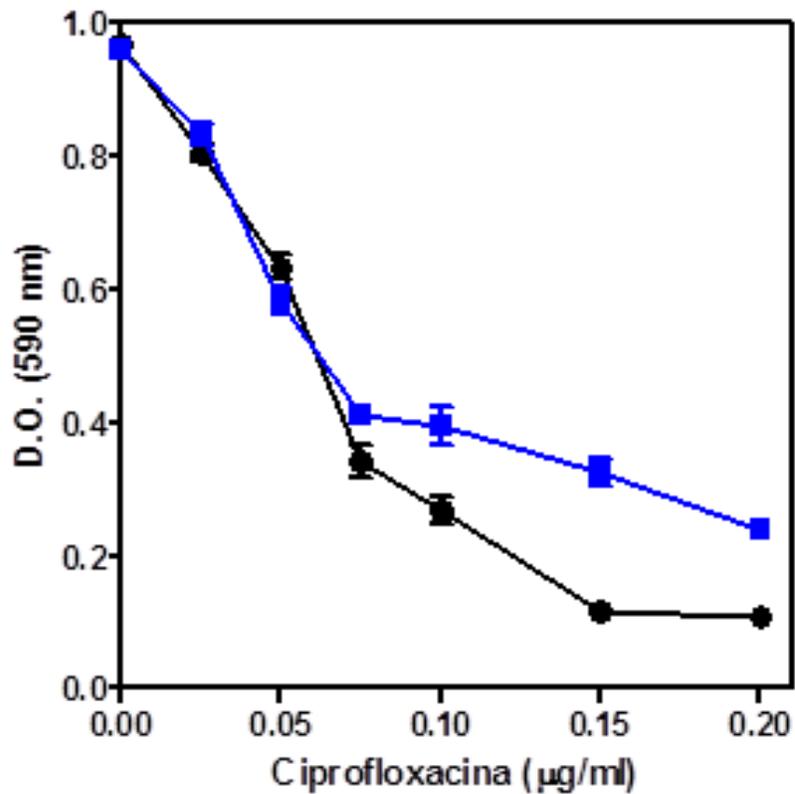
La resistencia adquirida en las cepas de referencia de *P. aeruginosa*, por la transferencia de pUM505, sugirió que genes codificados en dicho plásmido confieren resistencia a quinolonas por un mecanismo novedoso. Uno de los mecanismos de resistencia a quinolonas más distribuidos, codificados tanto en plásmidos como en cromosomas de *P. aeruginosa* corresponden a sistemas de expulsión conformados por una proteína de membrana interna, una proteína de periplasma y una proteína de membrana externa (porina), a los que se les denomina sistemas tripartitas (Sánchez-Díaz, 2003). Debido a esto se realizó el análisis *in silico* de las proteínas hipotéticas codificadas por el plásmido pUM505, que tuvieran una localización predicha en la membrana y el periplasma. Finalmente, se seleccionaron los marcos de lectura abiertos (*orf*) 35, 36 y 37 que forman parte de un posible operón de 11 genes; adicionalmente se determinó que las proteínas codificadas por los *orfs* 35 y 37 poseen una localización en el periplasma y la del *orf* 36 en la membrana interna (Rojas-Rojas, 2012). Para determinar su participación en la resistencia a ciprofloxacina estos genes fueron



**Figura 8. Mapa genético del plásmido pUM505.** Se señalan las regiones codificantes con flechas o puntas de flecha indicando la dirección de la transcripción. Las probables funciones de las proteínas codificadas se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha. Se indican las proteínas hipotéticas. Se muestran dos regiones del plásmido: la isla de patogenicidad 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).

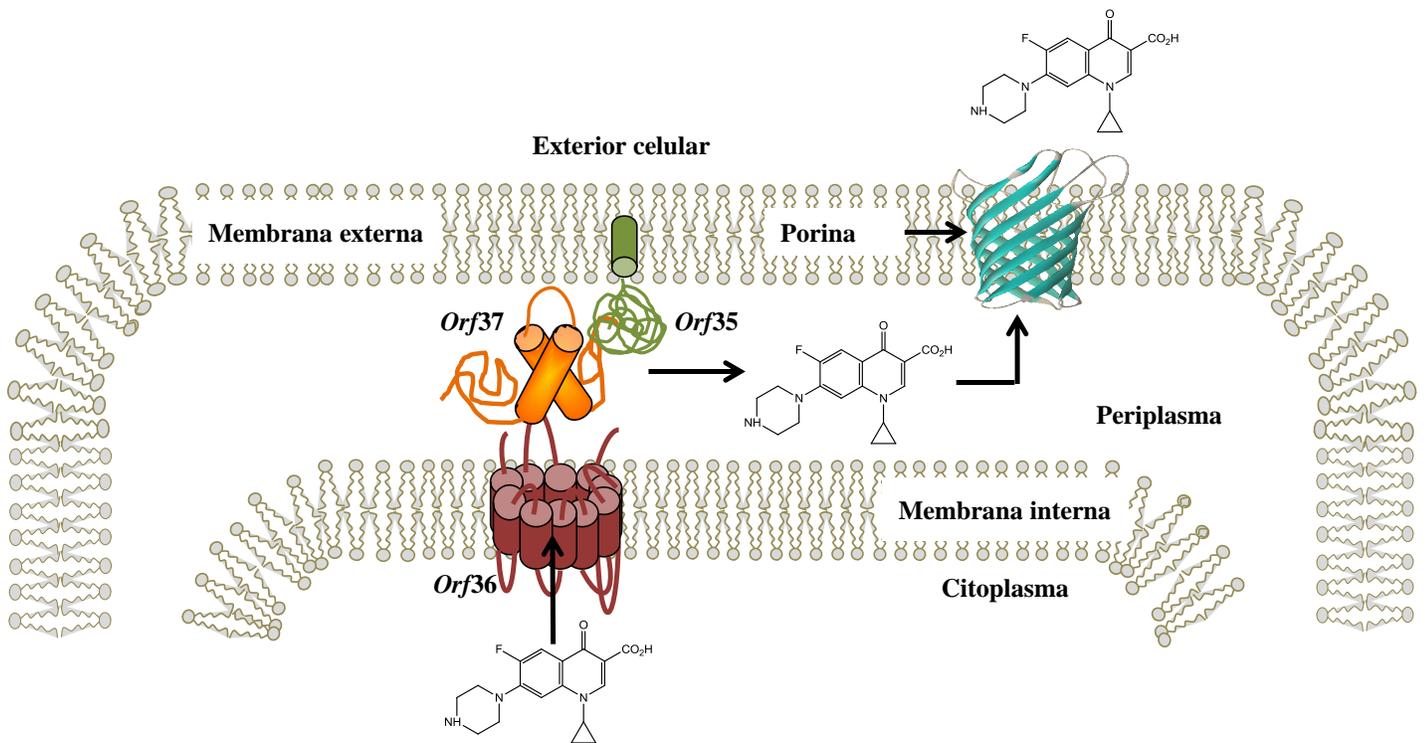
clonados en conjunto en el vector binario pUCP20 y transferidos a la cepa de *E. coli* J53-2, donde confirieron un aumento en la resistencia a ciprofloxacina en comparación con la cepa J53-2 con el vector vacío (**Figura 9**). Esto sugirió que los *orfs* 35-37 codifican a un sistema de resistencia a ciprofloxacina y dado a la localización de las proteínas que estas constituyen un sistema tripartita de expulsión que lleva a las moléculas de las quinolonas hacia el medio extracelular (Rojas-Rojas, 2012). Se ha descrito que el sistema de expulsión OqxAB de *P. aeruginosa* además de conferir resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico confiere resistencia a otros compuestos tóxicos como bromuro de etidio (Hansen y col., 2004), comportándose como los sistemas tripartitas de expulsión de la familia RND, sistemas de resistencia a diversos sustratos como antibióticos, colorantes y detergentes (Hansen y col., 2004).

Las proteínas codificadas por los *orfs* 35 y 37 de pUM505 poseen una localización periplásmica, mientras que la proteína codificada por el *orf* 36 presenta una localización en la membrana interna; por lo que se propuso que estas tres proteínas podrían interactúan entre ellas formando un sistema de transporte que lleva a las moléculas de quinolonas al periplasma y, una vez ahí, porinas podrían participar en el transporte de dichas moléculas hacia el medio extracelular (**Figura 10**). El modelo propuesto del sistema codificado por los *orfs* 35, 36 y 37 tiene similitud con los sistemas de tripartitas de expulsión Mex de *P. aeruginosa*, los cuales confieren resistencia a quinolonas mediante la interacción de proteínas de membrana interna, periplasma y membrana externa que en conjunto expulsan las moléculas de antibiótico del citoplasma al medio extracelular (Poole, 2001).



**Figura 9. Susceptibilidad a ciprofloxacina de *E. coli* J53-2(pUC\_orfs35-37).**

Los cultivos se crecieron en Caldo Nutritivo durante 18 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se midió la Densidad óptica (D.O.) a 590 nm. *E. coli* 53-2(pUC\_orfs 35-37) (●) y *E. coli* J53-2(pUCP20) (■). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3 por duplicado (Rojas-Rojas, 2012).



**Figura 10. Probable mecanismo de resistencia a quinolonas codificado por los orfs 35, 36 y 37 del plásmido pUM505.** Se muestran las proteínas codificadas por dichos orfs y localización celular. Se indica con flechas la probable ruta de transporte de las moléculas de quinolona desde el citoplasma hacia el periplasma y su posterior expulsión mediante porinas al exterior de la célula (Tomada de Rojas-Rojas, 2012).

### III JUSTIFICACIÓN

Los *orfs* 35, 36 y 37 del plásmido pUM505 confieren resistencia a quinolonas cuando son transferidos en conjunto a la cepa J53-2 de *E. coli*. El análisis *in silico* de las proteínas codificadas por los *orfs* 35-37, sugiere que estas constituyen un sistema de expulsión parecido a los sistemas tripartitas de resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos descritos en *Pseudomonas*. Por tal razón es de interés determinar si los *orfs* 35-37, además de la resistencia a quinolonas, tienen la capacidad de conferir resistencia a otros compuestos.

### IV HIPÓTESIS

Las proteínas codificadas por los *orfs* 35-37 del plásmido pUM505 codifican a un sistema de resistencia a diversos compuestos tóxicos.

### V OBJETIVOS

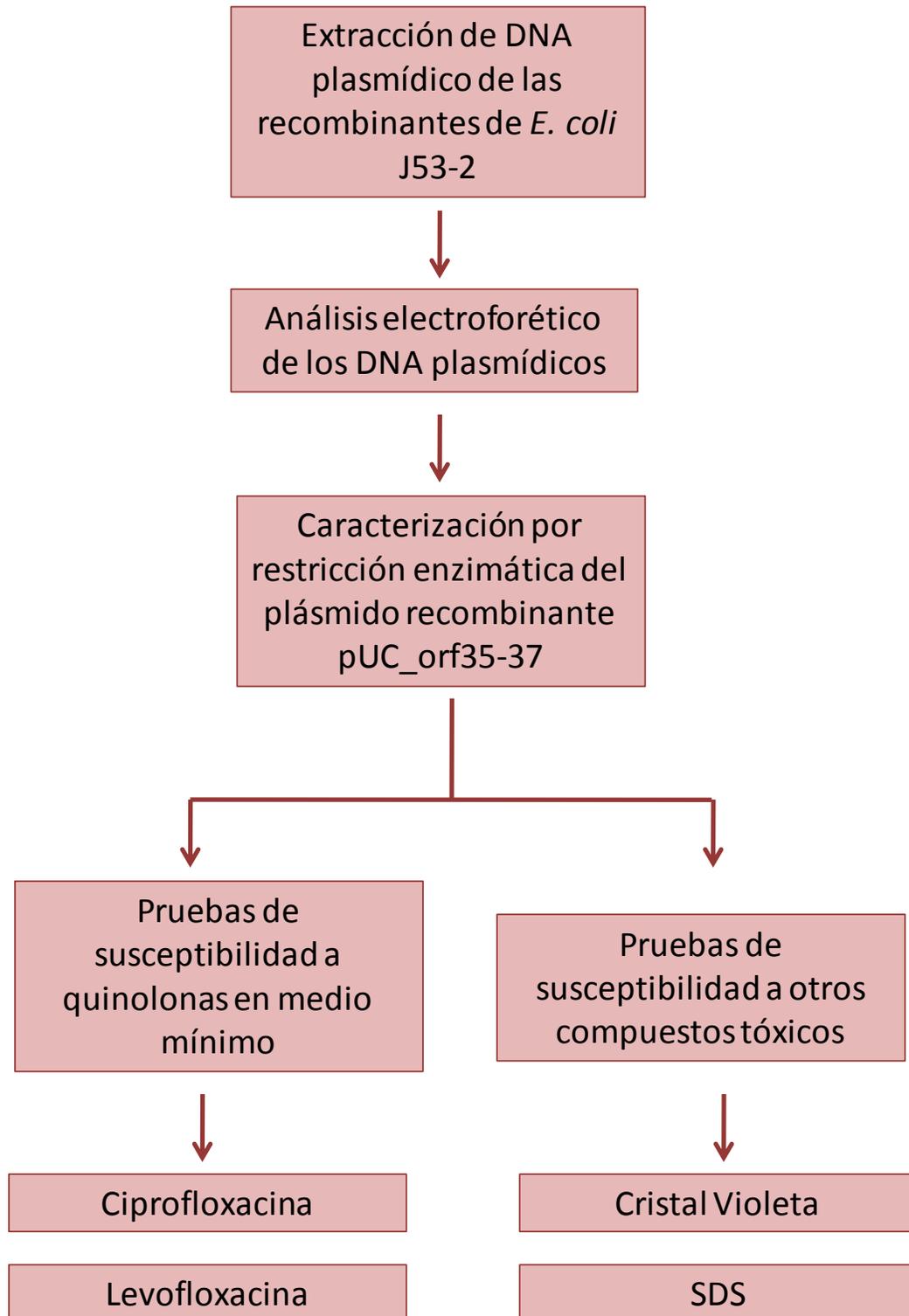
#### 5.1 Objetivo general

Determinar si el sistema de resistencia a quinolonas codificado por los *orfs* 35-37 de pUM505 confiere resistencia a otros compuestos tóxicos.

#### 5.2 Objetivos específicos

- 1 Determinar si la condición del cultivo bacteriano afecta la función de los *orfs* 35-37 en la resistencia a quinolonas.
- 2 Determinar la participación de los *orfs* 35-37 en la resistencia a compuestos tóxicos como cristal violeta y SDS.

## VI ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VII MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Medios de cultivo

- Caldo Luria Bertani (CL). El cual 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). Composición: Se agregó 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon) al CL.
- Medio mínimo M9: sales minerales M9 al 1% (Sigma), glucosa 20 mM (Bioxon),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 mM (J. T. Baker) y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mM (Reactivo analítico) (Sambrook y col., 1989). A éste medio se le adicionó 0.1% de peptona de caseína (Bioxon).

### 7.2. Cepas

- *E. coli* J53-2 [ $\text{F}^-$ ,  $\text{met}^-$ ,  $\text{pro}^-$ ,  $\text{Nal}^R$ ,  $\text{Rif}^R$ ] (Coetzee y col., 1972). Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes y en pruebas de susceptibilidad.
- *Escherichia coli* J53-2(pUCP20). cepa de *E. coli* J53-2 transformada con el vector pUCP20. Se utilizó como cepa control negativo en curvas de susceptibilidad.
- *E. coli* J53-2(pUC\_orfs 35-37). Cepa que contiene los *orfs* 35, 36 y 37 clonados en el vector pUCP20, empleada para el análisis de la participación de los genes en la resistencia a los diferentes compuestos.

### **7.3. 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:

Se inoculó un tubo con 4 ml de CL con las cepas de interés, el cual se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 300 rpm, posteriormente se centrifugó el cultivo durante 2 min a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 100 µl de STE (Sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM a pH 8), después se le agregó 20 µl de lisozima 20 mg/ml, se mezcló suavemente y se incubó 5 min a 37 °C, posteriormente se le agregó 250 µl de solución lítica (50 µl de NaOH 2 N, 100 µl de SDS 10% y 850 µl de agua), se incubó en hielo durante 5 min. Después se le adicionó 300 µl de una solución de acetato de potasio 3 M a pH de 4.8. Se mezcló y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se le agregó 500 µl de una mezcla fenol-cloroformo (24:24), se mezcló y se centrifugó a 12000 durante 10 min. Después se transfirió la fase superior a otro tubo y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto, se mezcló y se incubó 20 min a – 80 °C, se centrifugó a 12000 durante 10 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó 2 veces con 1 ml de etanol al 70%, centrifugando a 12000 durante 5 min por lavado. Se secó la pastilla al vacío y se resuspendió en 50 µl de agua HPLC, adicionando 5 µl de RNAsa (10mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 min, posteriormente se inactivó la RNAsa incubando a 65 °C durante 15 min y la muestra se analizó en un gel de agarosa 1%.

#### **7.4. Restricción con endonucleasas**

El DNA purificado se digirió utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por cada  $\mu\text{g}$  de DNA, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  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.

#### **7.5. Electroforesis en gel de agarosa**

El análisis y separación del DNA plasmídico se realizó en geles de agarosa al 0.7%, 1% o 1.5% (p/v) dependiendo el tamaño del DNA, en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M pH 8 y EDTA 0.001 M pH 8). Al preparar el gel de agarosa se le adiciona 1  $\mu\text{l}$  del colorante Red Gel<sup>TM</sup> a 50 ml de agarosa 1% para la tinción. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal con el amortiguador (Buffer). Las muestras de DNA se mezclaron con el amortiguador de carga (Azul de bromofenol 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5% y sacarosa 40%) y se colocaron en los orificios del gel. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 150 voltios durante 40-60 min. Los fragmentos de DNA teñidos se observaron por medio de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-VioletProducts Inc.). Como marcador de tamaño molecular de DNA se utilizó el DNA fago lambda digerido con endonucleasa *Hind*III y el marcador de escalera de 1 Kb plus (Invitrogen).

## **7.6. Pruebas de susceptibilidad a quinolonas**

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés en medio mínimo M9 con 0.1% de peptona de caseína durante toda la noche a 37°C con agitación constante (300 rpm) para inocular tubos con 4 ml de medio mínimo M9 con 0.1% de peptona de caseína con concentraciones crecientes de las quinolonas ciprofloxacina o levofloxacina. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C con agitación constante. Posteriormente, la susceptibilidad al antibiótico se determinó en función de la turbidez al medir la Densidad óptica (D.O.) a 590nm (D.O.<sub>590 nm</sub>) en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

## **7.7. Pruebas de susceptibilidad a otros compuestos**

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés en caldo nutritivo durante toda la noche a 37°C con agitación constante (300 rpm) para inocular tubos con 4 ml de caldo nutritivo con concentraciones crecientes del colorante Cristal Violeta y el detergente Dodecil sulfato de Sodio (SDS). Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se determinó el crecimiento de los cultivos mediante la determinación de la D.O.<sub>590 nm</sub> en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

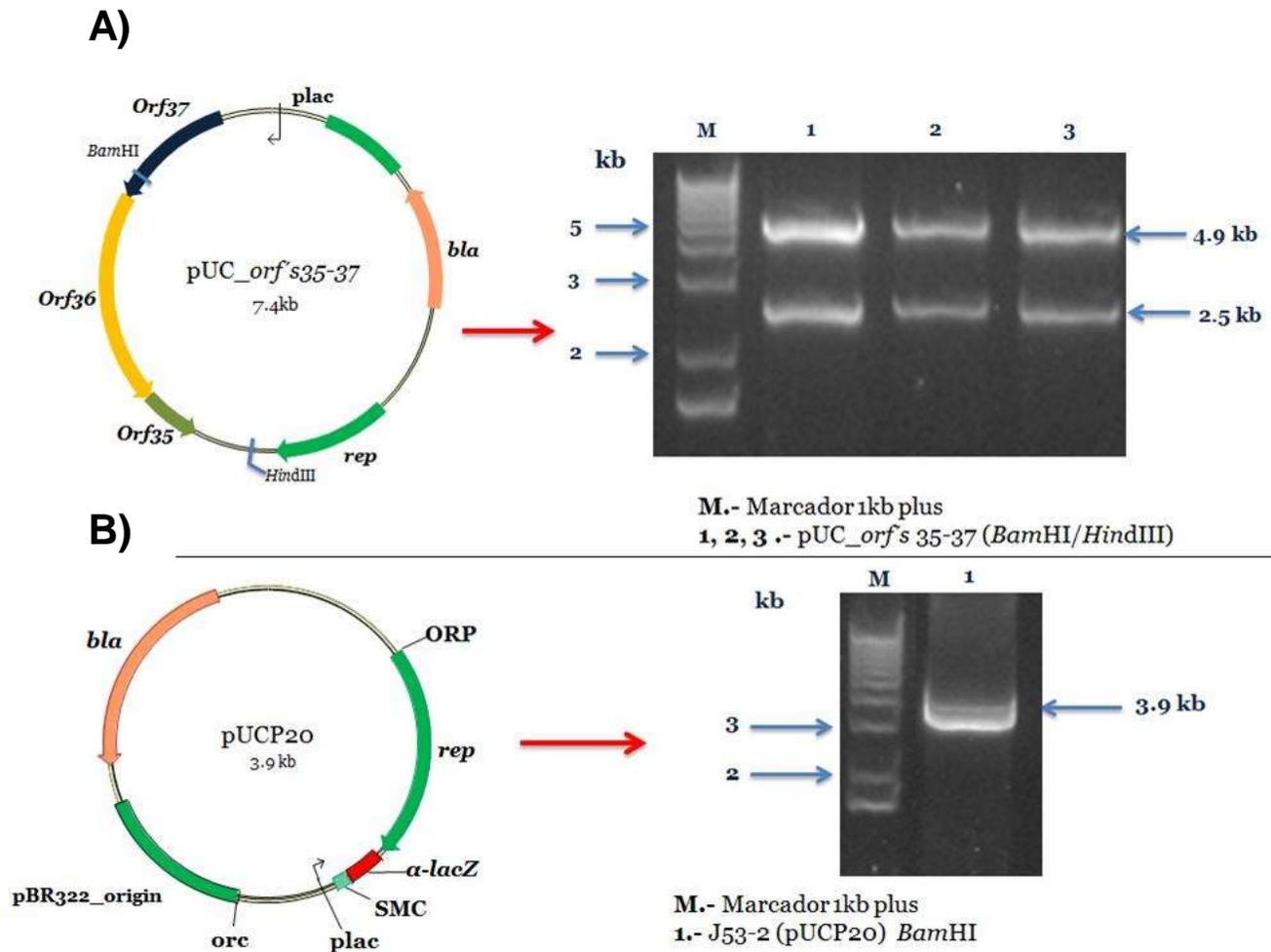
## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Caracterización de los plásmidos recombinantes

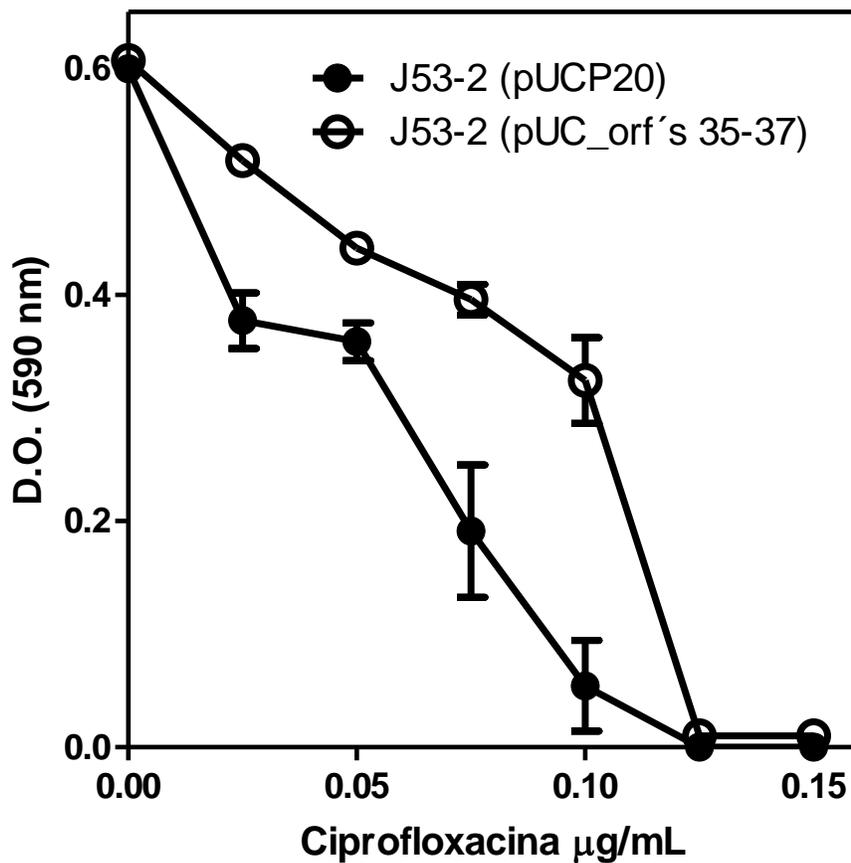
Para comprobar que la construcción de las cepas a utilizar estuviera correcta se procedió a su caracterización mediante el aislamiento de DNA por lisis alcalina, como se describió en materiales y métodos y por restricción enzimática usando las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Se obtuvieron los fragmentos esperados de acuerdo al tamaño del plásmido recombinante J53-2(pUC\_orfs35-37) (**Figura 11A**). Se realizó de igual manera el aislamiento del DNA plasmídico mediante lisis alcalina y se caracterizó con la enzima *Bam*HI la cepa control J53-2(pUCP20) (**Figura 11B**).

### 8.2. Participación de los *orfs* 35-37 en la susceptibilidad a ciprofloxacina y levofloxacina en medio de cultivo mínimo

Para determinar si los *orfs* 35-37 además de conferir resistencia a quinolonas en medio rico son capaces de conferir resistencia a *E. coli* cuando esta es cultivada en un medio mínimo se realizaron pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina (quinolona de cuarta generación) en medio de cultivo líquido M9, como se describe en materiales y métodos. Como control sensible se empleó la cepa J53-2 de *E. coli* transformada con el vector pUCP20. Los resultados obtenidos de la cepa *E. coli* J53-2 transformada con los *orfs* 35-37 mostraron que estos son capaces de incrementar la resistencia a ciprofloxacina en comparación a las transformantes que contienen el vector vacío (**Figura 12**). Esto indica que el



**Figura 11. Caracterización de los plásmidos recombinantes.** Se muestran las bandas correspondientes a los tamaños de los plásmidos transformantes. En el panel **A** se muestra de manera esquemática las características del plásmido recombinante (lado izquierdo) con los genes de interés y a la derecha se muestra el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% del DNA plasmídico después de la digestión enzimática. En el panel **B** se muestra el vector pUCP20 y sus características (lado izquierdo) y a la derecha la electroforesis del DNA correspondiente a la restricción enzimática.



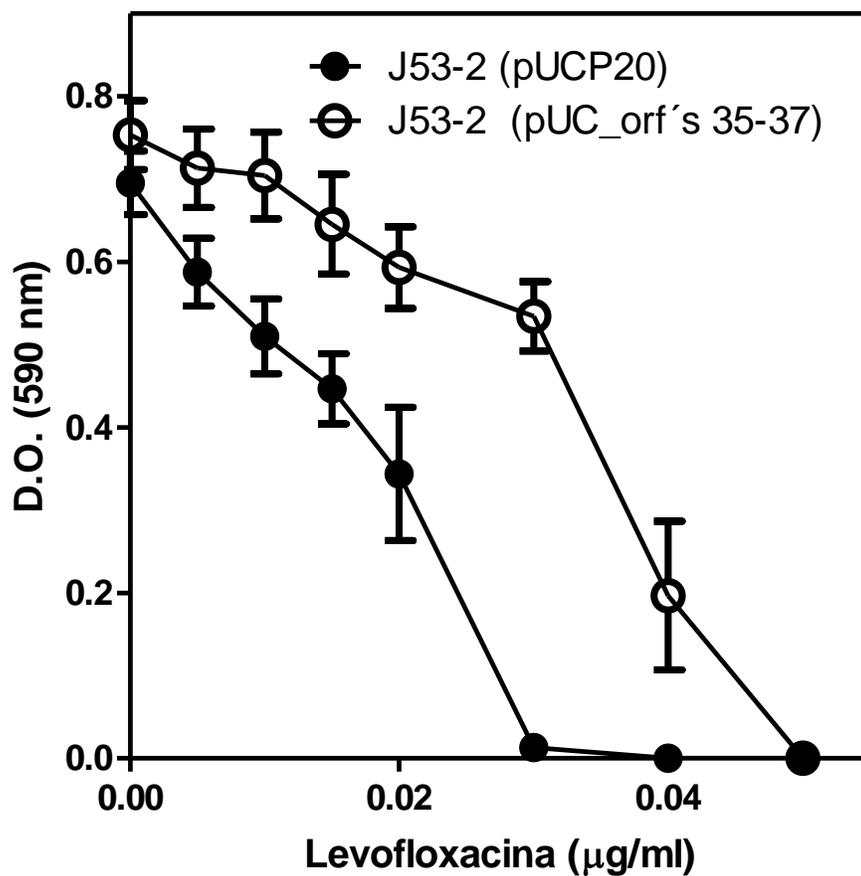
**Figura 12. Susceptibilidad a ciprofloxacin de la cepa J53-2(pUC\_orfs 35-37).**

Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 con 0.1% de peptona de caseína durante 24 h a 37°C con agitación constante. Se utilizó como control sensible a *E. coli* J53-2(pUCP20). Posteriormente se midió la D.O.<sub>590 nm</sub>. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=6.

sistema de resistencia a ciprofloxacina codificado por los *orfs* 35-37 es funcional a pesar de que la bacteria se encuentra creciendo en un medio con limitación de nutrientes, en comparación con un medio rico. Para determinar si los *orfs* 35-37 confieren resistencia a otras quinolonas, bajo esta condición de crecimiento, se realizaron ensayos de susceptibilidad a Levofloxacina (una quilonona de tercera generación) en medio de cultivo M9. Los resultados mostraron que las transformantes con los *orfs* 35-37 presentan mayor crecimiento en medio con el antibiótico en comparación a las transformantes que solo contienen el vector pUCP20 (**Figura 13**). Este resultado indica que los *orfs* 35-37 confieren resistencia a este antibiótico en bacterias crecidas con limitación de nutrientes y sugiere que este sistema es capaz de conferir resistencia a un conjunto más amplio de quinolonas.

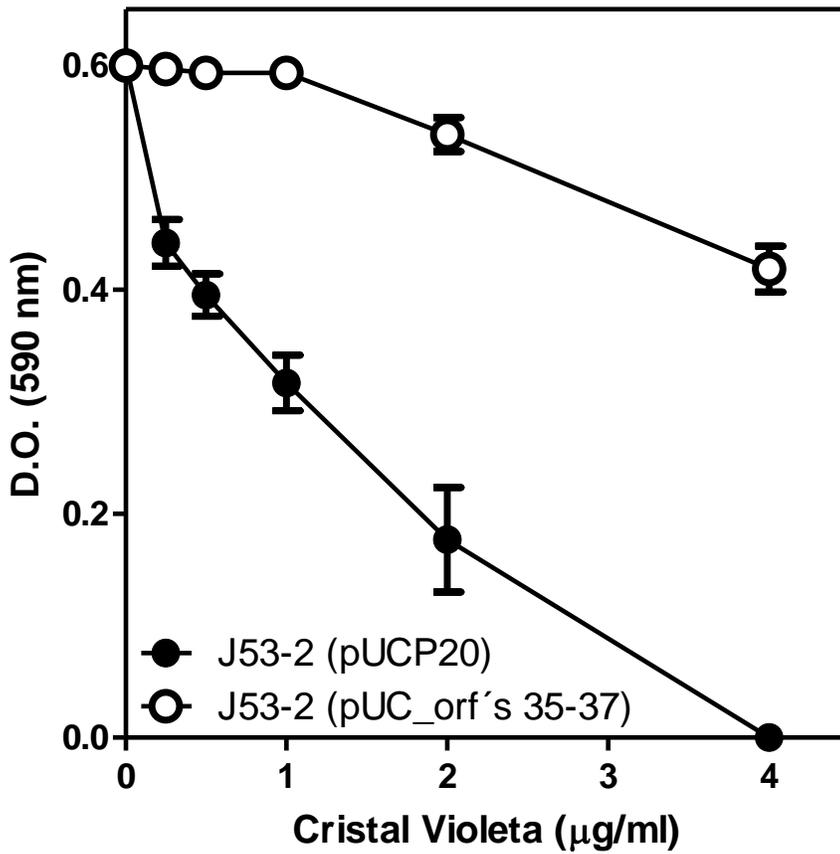
### **8.3. Participación de los *orfs* 35-37 en la susceptibilidad a cristal violeta y SDS**

Con el propósito de determinar si el sistema de resistencia a quinolonas es capaz de conferir resistencia a otros compuestos tóxicos se realizaron ensayos de susceptibilidad a colorante cristal violeta y al detergente SDS. Los resultados mostraron que las transformantes con los *orfs* 35-37 no muestran inhibición del crecimiento en presencia del colorante Cristal violeta en comparación con las transformantes que solo contienen el vector (**Figura 14**). Indicando que el mecanismo de resistencia codificado por estos genes no es un mecanismo específico de resistencia a quinolonas.



**Figura 13. Susceptibilidad a levofloxacin de la cepa J53-2(pUC\_orfs 35-37).**

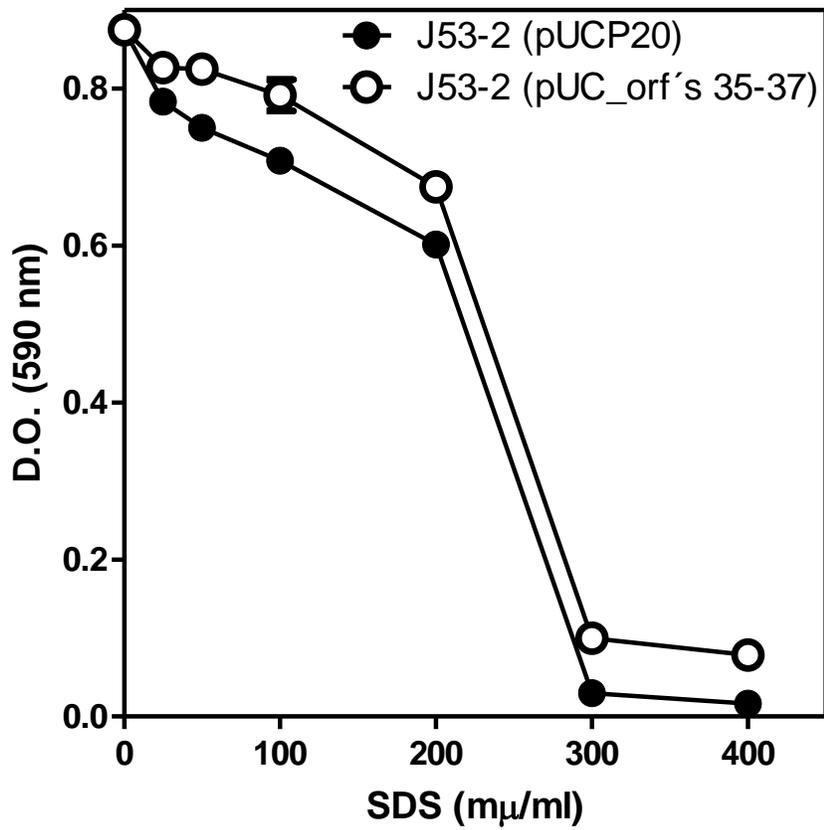
Los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 con 0.1% de peptona de caseína durante 24 h a 37°C con agitación constante. Se utilizó como control sensible a *E. coli* J53-2(pUCP20). Posteriormente se midió la D.O.<sub>590 nm</sub>. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=9.



**Figura 14. Susceptibilidad a Cristal violeta de la cepa J53-2(pUC\_orfs 35-37).**

Los cultivos se crecieron en CN durante 24 h a 37°C con agitación constante. Se utilizó como control sensible a *E. coli* J53-2(pUCP20). Posteriormente se midió la D.O.<sub>590 nm</sub>. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=6.

Contrario a lo observado con cristal violeta las transformantes que contienen los *orfs* 35-37 no mostraron crecimiento al ser incubadas en medio adicionado con el detergente SDS, estas transformantes fueron igual de sensibles al detergente que las transformantes que solo contienen el vector (**Figura 15**). Lo que indica que si bien el sistema de resistencia no es específico para quinolonas este es un sistema de resistencia a sustratos específicos.



**Figura 15. Susceptibilidad al detergente SDS de la cepa J53-2(pUC\_orfs 35-37).** Los cultivos se crecieron en CN durante 24 h a 37°C con agitación constante. Se utilizó como control sensible a *E. coli* J53-2(pUCP20). Posteriormente se midió la D.O.<sub>590 nm</sub>. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=6.

## IX DISCUSIÓN

Las quinolonas han sido el centro de interés tanto científico como clínico debido a que poseen las características de un antibiótico ideal al combinar una elevada potencia, amplio espectro de acción, propiedades farmacocinéticas positivas, buena absorción y una baja incidencia de efectos secundarios (Andersson y MacGowan, 2003). Del grupo de las quinolonas la ciprofloxacina es de las 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.

En general las quinolonas interfieren en la replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano mediante la inhibición de las enzimas topoisomerasa II (ADN girasa) y topoisomerasa IV (Drlica y Zhao, 1997) (**Figura 5**). Modificaciones en la estructura de las quinolonas contribuyeron a que éstas presentaran un amplio espectro, mayor actividad y buena tolerancia, propiciando una amplia difusión en el área clínica lo que a su vez ocasionó la selección de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas resistentes, las cuales poseen mecanismos de resistencia codificados en cromosoma y/o plásmidos (Leyva y Leyva, 2007).

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 que son la ADN girasa y la topoisomerasa IV; la regulación en la expresión de porinas, que impiden el ingreso del fármaco a la célula; los sistemas de transporte, que son

capaces de expulsar quinolonas, como son NorA de *S. aureus* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa*; y los sistemas codificados en genes plasmídicos como los sistemas de transporte QepA y OqxAB; las proteínas Qnr que son capaces de bloquear la acción de las quinolonas y un sistema de resistencia específico contra dos quinolonas, norfloxacin y ciprofloxacina, la enzima aminoglucósido acetiltransferasa [Aac(6')-Ib-Cr], que acetila el nitrógeno libre del grupo piperazil de las quinolonas antes mencionadas.

Se han identificado mecanismos de resistencia en la mayoría de las bacterias contra las que se emplean las quinolonas, sobresaliendo el patógeno oportunista *P. aeruginosa* que en los últimos años ha incrementado de manera importante su resistencia a los antibióticos usados en el tratamiento de las infecciones que provoca (Vojtová y col., 2011). *P. aeruginosa* es uno de los patógenos relacionados con mayor frecuencia en la etiología de infecciones nosocomiales graves (Vojtová y col., 2011). Dichas infecciones son difíciles de erradicar debido a la limitada acción que presentan contra esta bacteria los antibióticos de uso común (Vojtová 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 es transferido a la cepa estándar de laboratorio *P. aeruginosa* PAO1 confiere resistencia a ciprofloxacina (**Figura 7**), 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 quinolonas.

Mediante el análisis *in silico* de las proteínas codificadas por los genes del plásmido pUM505 se identificaron 64 *orfs* que codifican a proteínas hipotéticas distribuidas en diferentes regiones del plásmido. Los mecanismos de resistencia a quinolonas que se han reportado a la fecha en *P. aeruginosa* pertenecen a sistemas membranales de transporte como son las porinas y los sistemas tripartitas de expulsión multidrogas (Hsu y col., 2005). Con el propósito de identificar los genes del plásmido pUM505 que participan en la resistencia a quinolonas, Rojas-Rojas en 2012 realizó un análisis *in silico* de las proteínas hipotéticas codificadas por el plásmido pUM505, con el propósito de identificar y caracterizar posibles proteínas de membrana que confirieran resistencia a quinolonas, probablemente por un mecanismo de expulsión. Del análisis, se seleccionaron los *orfs* 35,36 y 37 ya que estos forman parte de un probable operón (Rojas-Rojas, 2012). Los genes de *P. aeruginosa* que codifican proteínas membranales y periplásmicas que participan en la resistencia a quinolonas reportados, por ejemplo los sistemas Mex, se encuentran agrupados en operones (Wong y Kassen, 2011). Aunado a esto se determinó que las proteínas codificadas por los *orfs* 35 y 37 poseen una localización en periplasma y el *orf* 36 codifica a una proteína de membrana interna (**Figura 10**), por lo que sugirió que estas proteínas podían formar un sistema de expulsión de quinolonas (Rojas-Rojas, 2012). La clonación y transferencia de los *orfs* 35-37 a *E. coli* J53-2 en el vector binario pUCP20 mostro que estos confieren resistencia a ciprofloxacina (**Figura 9**).

En el presente trabajo, primeramente se planteó determinar si el sistema de resistencia a quinolonas codificado por los *orfs* 35-37 tienen la capacidad de conferir resistencia en *E. coli* J53-2 a algunos antibióticos del grupo de las quinolonas cuando se crece en un medio mínimo. Los resultados mostraron que las transformantes de *E. coli* J53-2 con los *orfs* 35-37 presentan resistencia tanto a ciprofloxacina (**Figura 12**) como a levofloxacina (**Figura 13**) en medio de cultivo mínimo M9. Estos resultados aunados con lo reportado por Rojas-Rojas (2012), indican que los *orfs* 35-37 codifican un sistema de resistencia a quinolonas que es funcional en condiciones de crecimiento con alta o baja concentración de nutrientes (**Figuras 9, 12 y 13**). Se ha descrito que la presencia de una alta concentración de nutrientes en el medio de cultivo resulta en una alta concentración intracelular de nucleótidos trifosfato, sugiriendo que la calidad del medio de cultivo determina la velocidad de crecimiento bacteriano (Tao y col., 1999). Adicionalmente cambios en la velocidad de crecimiento bacteriano se deben a cambios a nivel de la expresión de genes lo que tiene como consecuencia cambios en los niveles de síntesis de proteínas (Grunberg-Manago y col., 1996). El sistema tripartita de expulsión AcrAB-TolC de *E. coli* confiere resistencia a un amplio rango de antibióticos, colorantes y biocidas, ha sido identificado en muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Fernandes y col., 2003). Este sistema ha sido ampliamente estudiado tanto en medio rico como Luria-Bertani o Caldo nutritivo así como en medio mínimo, mostrando que los genes que codifican para este sistema aumentan su expresión cuando se crece la bacteria en un medio mínimo (Tao y col., 1999). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que con base al fenotipo de resistencia de las transformantes los *orfs* 35-

37 se expresan en ambas condiciones de cultivo; sin embargo, esto no indica que ocurran cambios en los niveles de expresión de los genes, por lo que sería recomendable realizar un análisis de expresión de los mismos.

La resistencia a antibióticos ocurre por medio de cuatro mecanismos generales que incluyen la alteración de blanco celular, la inactivación del antibiótico, la disminución en la permeabilidad y la expulsión de drogas a través de las bombas de expulsión (Sun y col., 2014). La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* son significativamente más resistentes a muchos antibióticos, incluyendo beta-lactamasas, tetraciclina, cloranfenicol y quinolonas. Este amplio rango de resistencia ha sido atribuido principalmente a la baja permeabilidad de su membrana externa. Sin embargo, se ha descrito que la resistencia de *P. aeruginosa* a múltiples drogas se debe a un resultado de la sinergia entre la baja permeabilidad de la membrana y la participación de las bombas de expulsión (Poole, 2001). Las bombas de expulsión son prominentes en términos de conferir una alta eficiencia de expulsión de drogas y a la amplia especificidad de sustratos, resaltando su participación en la resistencia a múltiples drogas (Sun y col., 2014).

Con el propósito de determinar si el sistema de resistencia a quinolonas codificado por los *orfs* 35-37 de pUM505 también confiere resistencia a otros compuestos tóxicos se realizaron pruebas de susceptibilidad a Cristal violeta y al detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). El cristal violeta es un colorante básico que reacciona con los ácidos nucleicos, por lo que actúa como un compuesto bacteriostático potente (impide su reproducción; la bacteria envejece y muere sin dejar descendencia), especialmente contra microorganismos gram positivos

(Green y Sambrook, 2012). El SDS es un detergente tensoactivo que actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa (Green y Sambrook, 2012). Los resultados mostraron que las transformantes que contienen el plásmido con los *orfs* 35-37 fueron claramente resistentes al efecto tóxico del cristal violeta en comparación con las transformantes que solo contiene el vector vacío (**Figura 14**). Esto indica que el sistema de resistencia codificado por los *orfs* 35-37 no es específico para antibióticos del grupo de las quinolonas ya que también confiere resistencia al colorante cristal violeta. En bacterias, la primera evidencia de que los sistemas de expulsión a múltiples drogas confieren resistencia a otros compuestos se observó en aislados de *Staphylococcus*, en los cuales el sistema de expulsión en estudio mostro dar resistencia a compuestos de amonio cuaternario. Dicha resistencia es conferida por la proteína QacA, una proteína de membrana, que posteriormente se encontró también transporta activamente al bromuro de etidio, un inhibidor del crecimiento celular, entre otras drogas (Tennent y col., 1989).

Adicionalmente los resultados mostraron que el sistema codificado por los *orfs* 35-37 no fue capaz de conferir resistencia a SDS (**Figura 15**), si bien las transformantes con los *orfs* 35-37 mostraron un crecimiento ligeramente mayor que las transformantes con el vector vacío, esta diferencia no fue significativa. En *P. aeruginosa* los operones *mexCD-oprJ* y *mexAB-oprM* codifican a dos sistemas de expulsión a multidroga. El sistema MexCD-OprJ incrementa la resistencia a quinolonas, cloranfenicol, eritromicina, SDS y cristal violeta, mientras que el

sistema MexAB-OprM además de conferir resistencia a los compuestos previamente descritos también confiere resistencia a novobiocina y a varias beta-lactamasas, sugiriendo que si bien estos sistemas confieren resistencia a una diversidad sustratos, los sistemas de expulsión mantienen un alto grado de especificidad (Srikumar y col., 1998).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el sistema de resistencia codificado por los *orfs* 35-37 confiere resistencia a una diversidad de compuestos (quinolonas y colorantes); sin embargo, este sistema mantiene una especificidad por ciertos sustratos. Aunado a esto, los resultados de este trabajo sugieren fuertemente que la resistencia es a través de un sistema de expulsión.

## **IX. CONCLUSIÓN**

Las proteínas codificadas por los *orfs* 35, 36 y 37 del plásmido pUM505 codifican a un sistema de resistencia a quinolonas y cristal violeta en una cepa de *E. coli* posiblemente mediante un mecanismo de expulsión.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alós, J. I. (2003). Quinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 5: 261-268.
2. Aldred, K. J., Kerns R. J. y Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 53: 1565-1574.
3. Ambrose, P. G., Owens, R. C. Jr., Quintilani, R. y Nightingale, C. H. (1997). New generations of quinolones: with particular attention to levofloxacin. *Conn. Med.* 61: 269-272.
4. Andersson, M. I. y MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1-11.
5. Ball, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J. Antimicrob. Chemother.* 46 Suppl T1: 17-24.
6. 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.
7. Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513–1523.
8. Breidenstein, E. B. M., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage J. y Hancock, E. W. (2008). Complex ciprofloxacin resistance revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob. J. Agents Chemother.* 52: 4486-4491.

9. Cervantes, C, Chávez, J., Córdova, N. A., de la Mora, P. y Velasco, J. A. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48: 159- 163.
10. Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173-176.
11. Drlica, K. y Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 377-392.
12. Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A. y Zhao, X. (2009). Quinolones: Action and resistance Update. *Current Topics in Medical Chemistry.* 9: 981-998.
13. Emmerson, A. M. y Jones, A. M. (2003). The Quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 13-20.
14. Fábrega, A., Mandurga, S., Giralt, E. y Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology.* 2: 40-61
15. Fernandes, P., B. S. Ferreira, J. M Cabral. (2003). Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22:211-216
16. Green M.R. & Sambrook J. (2012). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory
17. Grunberg-Manago M. (1996) Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. In: Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C. ASM Press. pp. 1432–1457.

18. Gutierrez-Zufiaurre, N. (2004). Relation between structure, activity and adverse effects of quinolones. *Rev. Esp. Quimioter.* 17: 232-243.
19. Hancock R. E. y Speert D. P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Update* 3: 247-255.
20. 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.
21. Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 29-35.
22. Hernández, A., Sánchez, M. B. y Martínez J. L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front. Microbiol.* 2: 1-6.
23. Hooper, D. C. (2005). Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1811-1817.
24. Hsu, D. I., Okamoto, M. P., Murthy, R. y Wong-Beringer, A. (2005). Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact outcomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 535-541.
25. Ish-Horowics, D. y Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.
26. Ito, A., Hirai, K., Inoue, M. (1980). In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 103-108.
27. Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41 *Suppl.* 2: 120-126.

28. Jones, M. E., Critchley, I. A., Karlowsky, J. A., Blosser-Middleton, R. S., Schmitz, F. J., Thornsberry, C. y Sahm, D. F. (2002). *In vitro* activities of novel non fluorinated quinolones PGE 9262932 and PGE 9509924 against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with defined mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1651-1657.
29. 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.
30. 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.
31. Leyva, S. y Leyva, E. (2007). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 2: 1- 13.
32. Li, X. Z., Zhang, L. y Poole, K. (1998) Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* 180: 2987-2991.
33. Martínez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, 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.
34. Mella, M. S., Acuña, L. G., Muñoz, Q. M., Pérez, C. C., Labarca, L. J., González, R. G., Bello, T. H., Domínguez, Y. M. y Zemelman, Z. R. (2000). Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev. Chil. Infect.* 17: 53-66.

35. Morosini, M. I., Loza, E., Campo, R., Almaraz, F., Baquero, F. y Cantón, R. (2003). Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Spain: Activities of Garenoxacin against Clinical Isolates Including Strains with Altered Topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (8): 2692-2695.
36. Morrissey, I., Hoshino, K., Sato, K. Yoshida, A., Hayakawa, I., Bures, M. G. y Shen, L. L. (1996). Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1775-1784.
37. Oliphant, C. M. y Pharm, D. (2002). Quinolones: A comprehensive review. *Amer. Fam. Physic.* 3:65.
38. 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.
39. Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 255-264.
40. Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 20-51
41. Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-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.
42. 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.

43. Rojas-Rojas, F. U. (2012). Identificación de genes del plásmido pUM505 involucrados en la resistencia a quinolonas. Tesis de licenciatura. QFB-UMSNH.
44. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
45. Sánchez-Díaz, P. (2003). Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. Rev. Esp. Quimioterap. 16: 172-187.
46. Segev, S., Yaniv, I., Haverstock, D. y Reinhart, H. (1999). Safety of long-term therapy with ciprofloxacin: data analysis of controlled clinical trials and review.
47. Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N. y Poole, K. (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multisensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 65-71.
48. Strahilevitz, J., Jacoby, A., Hooper, D. C. y Robicsek A. (2009) Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 664-689.
49. Sun J, Deng Z, Yan A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 17:254-267.
50. Tao H, Bausch C, Richmond C, Blattner FR, Conway T. (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol.* 181:6425-6440.
51. Tennent, J.M.; Lyon, B.R.; Midgley, M.; Jones, I.G.; Purewal, A.S.; Skurray, R.A. (1989) Physical and biochemical characterization of the qacA gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 135:1-10.

52. Tillotson, G. S. (1996.) Quinolones; structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.* 44: 320-324.
53. Tran, J. H., Jacoby, G. A. y Hooper, D. C. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3050–3052.
54. Vojtová, V., Kolár, M., Hricová, K., Uvízl, R., Neiser, J., Blahut, L. y Urbánek, K. (2011). Antibiotic utilization and *Pseudomonas aeruginosa* resistance in intensive care units. *New Microbiol.* 34: 291-298.
55. Wong, A. y Kassen, R. (2011). Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157: 937-944.
56. Yamakawa, T., Mitsuyama, J. y Hayashi, K. (2002). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 455-465.
57. 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.