



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

“Dilucidar el efecto del nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP en la selección de mutaciones que incrementan la resistencia a ciprofloxacina en bacterias”

Tesis para obtener grado de:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:
I.B.T. Joshua Aram Fernández Ramírez

Asesora:
Dra. Martha Isela Ramírez Díaz

Morelia, Michoacán; junio 2026

Dedicatoria

A mi familia, por ser el pilar fundamental de mi vida, por su amor incondicional, su ejemplo de esfuerzo y su constante apoyo en cada etapa de este camino.

A todos los que, de una u otra forma, caminaron conmigo durante este proceso: gracias.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi asesora, Martha Isela Ramírez Díaz, por su guía, paciencia y confianza a lo largo de este proyecto. Su acompañamiento académico y humano fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco sinceramente a Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo brindado a través de su programa de becas, el cual ha sido fundamental para continuar con mi formación académica y desarrollo profesional.

A los miembros del laboratorio de investigación de microbiología y diferenciación celular, por su apoyo técnico, discusiones constructivas y compañerismo.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, por brindarme los recursos, el espacio y la orientación necesaria durante estos años de formación.

A mi familia, por su amor incondicional, por sostenerme en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada pequeño avance.

A mis amigos y colegas, quienes, con su presencia, ánimo y sentido del humor hicieron más llevadero este camino.

Finalmente, agradezco a quienes, aunque no estén nombrados aquí, dejaron una huella en mi proceso académico y personal.

A todos, gracias.

A. Resumen

El aumento de la resistencia bacteriana a fluoroquinolonas representa una amenaza significativa para la salud pública. En este estudio se evaluó el nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina conferido por distintas proteínas CrpP y su efecto en la selección de colonias con resistencia incrementada a fluoroquinolonas. Las proteínas CrpP participan en la modificación enzimática de ciprofloxacina, reduciendo la susceptibilidad bacteriana a este antibiótico. El gen *crpP* fue identificado por primera vez en el plásmido pUM505, proveniente de un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína CrpP de pUM505 es una proteína pequeña de 65 aminoácidos, la cual disminuye la susceptibilidad a ciprofloxacina en *Eschericia coli* J53-3, una cepa con alta sensibilidad a ácido nalidixico, el cual es un antibiótico del grupo de las quinolonas. Mediante un estudio empleando aislados clínicos y transconjugantes de plásmidos provenientes de aislados bacterianos de origen clínico, se determinó que la proteína CrpP se encuentra distribuida en bacterias de origen clínico. Las proteínas CrpP₂₉₈₂ y CrpP₂₄₂₄, homologas a CrpP de pUM505, son proteínas pequeñas las cuales confieren a *E. coli* J53-3 un mayor nivel de resistencia a ciprofloxacina en comparación con CrpP de pUM505. La presencia del gen *crpP* en *E. coli* J53-3, además de disminuir la susceptibilidad a ciprofloxacina, favoreció la selección de colonias con resistencia a ciprofloxacina incrementada, obteniendo 2.9×10^{-6} colonias en comparación con *E. coli* J53-3 sin el gen *crpP*, que genero 9×10^{-7} colonias. Esto sugirió que la presencia del sistema de resistencia a ciprofloxacina conferido por CrpP participa en la selección de

colonias con resistencia aumentada. Asimismo, sugirió que CrpP, al igual que otros mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, incrementa el rango de concentración del antibiótico para la aparición de mutantes. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el papel del nivel de resistencia a ciprofloxacina de las proteínas CrpP₂₄₂₄ y CrpP₂₉₈₂ en el nivel de generación de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina. Las transformantes de *E. coli* J53-3 que expresan a proteínas CrpP₂₄₂₄ y CrpP₂₉₈₂ incrementaron la selección de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina, generando 2.51×10^{-6} ($\pm 5.22 \times 10^{-7}$) colonias y 2.73×10^{-6} ($\pm 2.25 \times 10^{-7}$), respectivamente, en comparación con la transformante de *E. coli* J53-3 que expresa a CrpP ($1.09 \times 10^{-6} \pm 2.25 \times 10^{-7}$) o *E. coli* J53-3 ($2 \times 10^{-7} \pm 3.53 \times 10^{-8}$). Además, se determinó que la expresión de los genes *crpP* amplió el rango de concentración de ciprofloxacina requerida para la selección de colonias resistentes. Algunas de las colonias resistentes a ciprofloxacina fueron seleccionadas para la secuenciación del gen *gyrA*, que codifica a la subunidad GyrA la cual es el blanco de acción de la ciprofloxacina. El análisis de las secuencias mostro una mutación en el nucleótido 241 de guanina por timina, lo que genero el cambio del residuo de Gly81 por Cis, Además, otras colonias mostraron el cambio del nucleótido 260 de adenina por guanina, generando la sustitución del residuo Asp87 por Gly en GyrA. Este trabajo evidencia la importancia de los sistemas de resistencia a antibióticos como CrpP en favorecer la selección de mutantes con fenotipo de resistencia incrementada.

Palabras clave: Fluoroquinolonas, mutación, *gyrA*, resistencia plasmídica, presión selectiva.

B. Abstract

The increase in bacterial resistance to fluoroquinolones represents a significant threat to public health. In this study, the level of susceptibility to ciprofloxacin conferred by different CrpP proteins and their effect on the selection of colonies with increased resistance to fluoroquinolones were evaluated. CrpP proteins participate in the enzymatic modification of ciprofloxacin, reducing bacterial susceptibility to this antibiotic.

The *crpP* gene was first identified in the plasmid pUM505, obtained from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. The CrpP protein from pUM505 is a small protein of 65 amino acids that decreases susceptibility to ciprofloxacin in *Escherichia coli* J53-3, a strain with high sensitivity to nalidixic acid, which is an antibiotic belonging to the quinolone group.

Through a study using clinical isolates and plasmid transconjugants derived from clinical bacterial isolates, it was determined that the CrpP protein is distributed among bacteria of clinical origin. The proteins CrpP₂₉₈₂ and CrpP₂₄₂₄, homologous to CrpP from pUM505, are small proteins that confer a higher level of resistance to ciprofloxacin in *E. coli* J53-3 compared with CrpP from pUM505.

The expression of the *crpP* gene in *E. coli* J53-3, in addition to decreasing susceptibility to ciprofloxacin, promoted the selection of colonies with increased resistance to ciprofloxacin, yielding 2.9×10^{-6} colonies, compared with *E. coli* J53-3 lacking the *crpP* gene, which generated 9×10^{-7} colonies. This suggested that the

expression of the ciprofloxacin resistance system conferred by CrpP participates in the selection of colonies with increased resistance. Likewise, it suggested that CrpP, similar to other plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms, increases the antibiotic concentration range that allows the emergence of mutants.

The aim of the present study was to evaluate the role of the ciprofloxacin resistance level conferred by the proteins CrpP₂₄₂₄ and CrpP₂₉₈₂ in the generation of highly ciprofloxacin-resistant colonies. Transformants of *E. coli* J53-3 expressing CrpP₂₄₂₄ and CrpP₂₉₈₂ proteins increased the selection of highly ciprofloxacin-resistant colonies, generating $2.51 \times 10^{-6} (\pm 5.22 \times 10^{-7})$ colonies and $2.73 \times 10^{-6} (\pm 2.25 \times 10^{-7})$ colonies, respectively, compared with the transformant of *E. coli* J53-3 expressing CrpP ($1.09 \times 10^{-6} \pm 2.25 \times 10^{-7}$) or *E. coli* J53-3 ($2 \times 10^{-7} \pm 3.53 \times 10^{-8}$).

Additionally, it was determined that the expression of *crpP* genes expanded the concentration range of ciprofloxacin for the selection of resistant colonies. Some ciprofloxacin-resistant colonies were selected for sequencing of the *gyrA* gene, which encodes the GyrA subunit of the target of ciprofloxacin. Sequence analysis showed a mutation at nucleotide 241 from guanine to thymine, resulting in the substitution of Gly81 for Cys. Furthermore, other colonies showed a change at nucleotide 260 from adenine to guanine, generating the substitution of Asp87 for Gly in GyrA.

This work highlights the importance of antibiotic resistance systems such as CrpP in promoting the selection of mutants with an increased resistance phenotype.

C. Índice general

A. Resumen.....	I
B. Abstract.....	III
C. Índice general.....	V
D. Índice de figuras.....	VIII
E. Índice de tablas	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Antibióticos y su clasificación	1
1.2 Historia de las quinolonas	2
1.3 Estructura química de las quinolonas	5
1.4 Clasificación de las quinolonas	7
1.4.1 Primera generación.....	8
1.4.2 Segunda generación.....	9
1.4.3 Tercera generación.....	9
1.4.4 Cuarta generación	10
1.5 Mecanismo de acción de las quinolonas.....	14
1.6 Sistemas de resistencia a quinolonas	15
1.6.1 Sistemas de expulsión	17
1.6.2 Modificación de moléculas blanco	19
1.6.3 Proteínas Qnr.....	20
1.6.4 Regulación de porinas	22
1.6.5 Modificación de la ADP-L-glicero-D-manno-heptosa 6-epimerasa ..	23
1.6.6 Modificación enzimática	25
1.7 Mutación	26
2. Antecedentes	28

2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.2	pUM505	29
2.3	Nivel de resistencia conferido por la proteína CrpP de pUM505.....	32
2.4	Prevalencia del gen <i>crpP</i>	32
2.5	Identificación de aminoácidos conservados en proteínas CrpP	34
2.6	Participación del gen <i>crpP</i> en la selección colonias resistentes a quinolonas	35
3.	Justificación.....	37
4.	Hipótesis	38
5.	Objetivos	39
6.	Estrategia experimental.....	40
7.	Materiales y métodos	41
7.1	Medios de cultivo empleados	41
7.2	Cepas bacterianas	41
7.3	Electroforesis en geles de agarosa	43
7.4	Oligonucleótidos.....	43
7.5	Lisis alcalina para el aislamiento de plásmidos.....	44
7.6	Extracción de ADN total	46
7.7	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
7.8	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a ciprofloxacina.....	48
7.9	Inducción y cuantificación de mutantes resistentes a quinolonas	48
7.10	Determinación de la frecuencia de mutación	49
7.11	Caracterización de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina	49
7.12	Secuenciación y análisis del gen <i>gyrA</i>	50
7.13	Concentración de prevención de aparición de mutantes (CPM)	50

8. Resultados	51
8.1 Caracterización molecular de las cepas de estudio	51
8.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	53
8.3 Efecto de los genes <i>crpP</i> homólogos en la selección de colonias con resistencia a ciprofloxacina incrementada	55
8.4 Determinación de la frecuencia de mutación	56
8.5 Caracterización del fenotipo de las colonias con resistencia a ciprofloxacina aumentada	61
8.6 Determinación del nivel de resistencia a ciprofloxacina de las colonias obtenidas	63
8.7 Determinación de la resistencia a levofloxacina y gentamicina de las colonias obtenidas de los bancos	88
8.8 Efecto de la proteína CrpP en el umbral de aparición de mutantes	95
8.9 Secuenciación gen <i>gyrA</i>	97
9. Discusión	100
10. Conclusión	113
11. Referencias	113

D. Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de dos antibióticos quinolónicos	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Estructura química base de las fluoroquinolonas	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Estructuras químicas representativas de cada generación de quinolonas.	¡Error! Marcador no definido.2
Figura 4. Mecanismo de acción de las quinolonas.	¡Error! Marcador no definido.5
Figura 5. Mecanismos de resistencia a las quinolonas	¡Error! Marcador no definido.17
Figura 6. Mapa esquemático del plásmido pUM505	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7. Caracterización de la proteína CrpP del plásmido pUM505	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Aislamiento de ADN plasmídico y análisis por PCR de los genes <i>crpP</i>	¡Error! Marcador no definido.1
Figura 9. Generación de bancos de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina	¡Error! Marcador no definido.7
Figura 10. Número de colonias recuperadas y frecuencia de mutación.	¡Error! Marcador no definido.9
Figura 11. Caracterización fenotípica de las colonias recuperadas	¡Error! Marcador no definido.1
Figura 12. Determinación de la CMI de las colonias obtenidas en los bancos generados	654
Figura 13. Distribución CMI de las colonias de los bancos obtenidos	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Concentración de ciprofloxacina de la ventana de selección de mutantes y de prevención de aparición de mutantes (CPM)....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15. Alineamiento de una región de los genes <i>gyrA</i> de las colonias del banco de <i>E. coli</i> J53-3.	¡Error! Marcador no definido.7

Figura 16. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas GyrA de las colonias del banco de *E. coli* J53-3**¡Error! Marcador no definido.**

E. Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados	45
Tabla 2. CMI a ciprofloxacina obtenido para las cepas de estudio.....	54
Tabla 3. Frecuencia de mutación de las cepas de estudio.....	59
Tabla 4. CMI a ciprofloxacina del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3.	67
Tabla 5. CMI a ciprofloxacina del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20).	68
Tabla 6. CMI a ciprofloxacina del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i>).....	76
Tabla 6. CMI a ciprofloxacina del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₉₈₂).	72
Tabla 7. CMI a ciprofloxacina del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₄₂₄).	79
Tabla 8. Clasificación del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 según valores CMI reportados de acuerdo al CLSI.....	83
Tabla 9. Clasificación del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20) según valores CMI reportados de acuerdo al CLSI.	84
Tabla 10. Clasificación del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i>) según valores CMI reportados de acuerdo al CLSI.....	85
Tabla 11. Clasificación del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₉₈₂) según valores CMI reportados de acuerdo al CLSI.....	86

Tabla 12. Clasificación del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄) según valores CMI reportados de acuerdo al CLSI.....	87
Tabla 13. CMI a levofloxacin obtenido de las cepas control.....	89
Tabla 14. CMI a levofloxacin obtenido del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3.....	90
Tabla 15. CMI a levofloxacin obtenido del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20).	91
Tabla 16. CMI a levofloxacin obtenido del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP)	92
Tabla 17. CMI a levofloxacin obtenido del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₉₈₂)	93
Tabla 18. CMI a levofloxacin obtenido del banco derivado de <i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄)	94

1. Introducción

1.1 Antibióticos y su clasificación

Los antibióticos son sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos); esta es una definición clásica, ya que también existen antibióticos sintéticos como las sulfonamidas y quinolonas, también podría decirse que son una clase de medicamentos utilizados para tratar infecciones bacterianas, ya sea inhibiendo el crecimiento de bacterias (bacteriostáticos) o directamente causando lisis celular y muerte irreversible (bactericidas) (Katzung y col., 2010). Desempeñan un papel fundamental en la medicina moderna al combatir infecciones bacterianas y han reducido significativamente la morbilidad y mortalidad asociadas a dichos padecimientos. El uso inapropiado o excesivo de antibióticos puede provocar resistencia bacteriana, lo que significa que las bacterias pueden volverse menos sensibles o incluso resistentes a los efectos de los antibióticos, lo que dificulta su tratamiento (Etebu y col., 2016). La clasificación de los antibióticos está dada por su estructura química y por el mecanismo de acción de la siguiente manera: 1) inhibidores de la síntesis de peptidoglicano, componente principal de la pared celular bacteriana, llamados también β -lactámicos (ejemplos como las cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos), existen también medicamentos como la vancomicina que también afectan la pared celular pero la naturaleza química y el mecanismo por el que lo realizan es diferente a los β -lactámicos; 2) acción directa sobre la membrana, ejemplos como las polimixinas y daptomicina

(Steenbergen y col., 2005); 3) sustancias bacteriostáticas que afectan las subunidades ribosomales 30S o 50S (ejemplos como tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina); 4) sustancias bactericidas que afectan la subunidad ribosomal 30S llamadas aminoglucósidos, siempre que se afecte alguna subunidad ribosomal también se afectará la síntesis de proteínas; 5) sustancias que afectan la síntesis de ácidos nucleicos, como las rifampicinas que inhiben a la RNA polimerasa dada la afinidad a la subunidad β , en esta clasificación también se encuentran las quinolonas que causan inhibición de las enzimas topoisomerasas; y 6) antimetabolitos, el folato es fundamental para el desarrollo de bacterias, las sulfonamidas interfieren con el metabolismo del precursor de los ácidos nucleicos (Katzung y col., 2018).

1.2 Historia de las quinolonas

En la síntesis de un medicamento antipalúdico llamado cloroquina se encontró y evaluó un compuesto intermediario con actividad antimicrobiana moderada y de espectro reducido, el ácido nalidíxico (**Figura 1 A**), modificaciones sobre de este llevaron a la creación de una nueva clasificación de antibióticos llamados quinolonas (Leshner y col., 1962). Estos antibióticos sintéticos son una de las clases más importantes de agentes antimicrobianos, las quinolonas han sido el centro de múltiples investigaciones científicas y de interés clínico desde su descubrimiento a principios de los años 1960. Esto se debe a que ofrecen potencialmente muchos de los atributos de un antibiótico ideal, que combina alta potencia y un amplio espectro de actividad, buena biodisponibilidad, formulaciones orales e intravenosas, una distribución mejorada en los tejidos y una incidencia potencialmente baja de efectos

secundarios (Andersson y Macgowan, 2003). Su modo de acción fue novedoso en el momento de su descubrimiento. Actúan de manera bactericida al inhibir la enzima

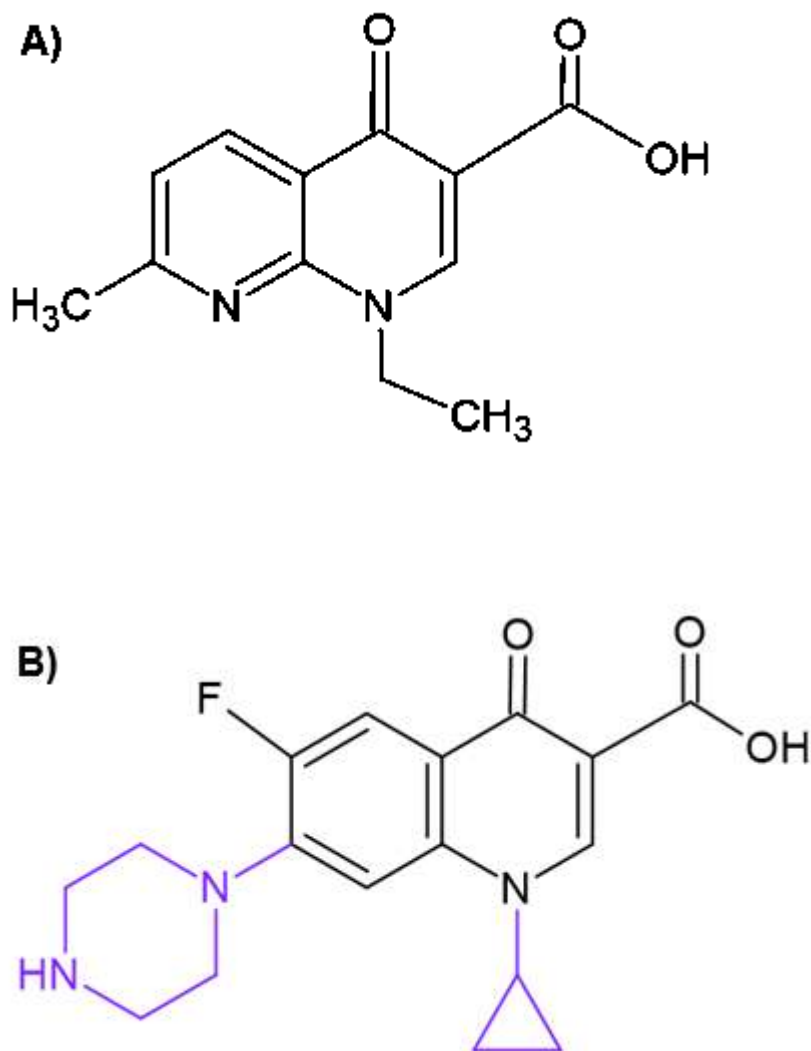


Figura 1. Estructura química de dos antibióticos quinolónicos. A) Ácido nalidíxico, la primera quinolona sintetizada, utilizada principalmente para infecciones del tracto urinario. **B)** Ciprofloxacina, una fluoroquinolona de amplio espectro de segunda generación, con sustituyentes que mejoran su actividad antimicrobiana grupos en morado son elementos que distinguen a ciprofloxacina de otras fluoroquinolonas. Modificado de Chávez-Jacobo (2015).

bacteriana ADN girasa (topoisomerasa II), esta enzima cataliza cambios en la topología del ADN, pudiendo convertir formas relajadas y superenrolladas, así como introducir o eliminar tensión en las cadenas del ADN. Por ello, estas enzimas son esenciales para la supervivencia de todas las bacterias, pero están ausentes en los eucariotas superiores, lo que las convierte en un blanco atractivo para el desarrollo de antibióticos (Collin y col., 2011). Cuando se descubrió la girasa en *Escherichia coli* en 1976 (Gellert y col., 1976), las dos clases más importantes de inhibidores de la girasa ya habían sido descritas. El compuesto sintético ciprofloxacina (**Figura 1 B**) es un antibiótico perteneciente al grupo de las quinolonas, uno de los mejores compuestos del grupo de las fluoroquinolonas, es de amplio espectro (Grohe y Heitzer, 1987) y actualmente es uno de los antibióticos de mayor prescripción en el mundo (Redgrave y col., 2014). Algunos ejemplos de quinolonas además de la ciprofloxacina son levofloxacina y norfloxacina. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso de quinolonas puede tener efectos secundarios y riesgos asociados, que incluyen reacciones gastrointestinales y del sistema nervioso, tendinitis y reacciones musculoesqueléticas adversas (Pham y col., 2019).

Ciprofloxacina se usa principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias y por *Pseudomonas aeruginosa* (Emmerson y Jones, 2003; Hoiby, 2011). En comparación con el ácido nalidíxico, la ciprofloxacina mostró una mayor actividad y un espectro antibacteriano más amplio. De más de 20,000 cepas bacterianas analizadas, el 98.2 % resultó sensible a ciprofloxacina (Mohr, 2016). Diversos estudios han demostrado que el extenso uso de ciprofloxacina ha contribuido significativamente a la emergencia y diseminación de mutantes bacterianos con mayor nivel de resistencia; en conjunto, la evidencia actual indica

que el consumo elevado de ciprofloxacina no solo selecciona variantes preexistentes resistentes, sino que también promueve la aparición de nuevas mutaciones que incrementan el nivel de resistencia y complican el tratamiento de infecciones bacterianas (Teichmann y col., 2025).

1.3 Estructura química de las quinolonas

Las quinolonas son estructuras bicíclicas heteroaromáticas cuya estructura base comprende un núcleo de ácido carboxílico- β -piridona fusionado a un anillo aromático. Existe una relación entre la estructura química y la actividad biológica que ha llevado a sintetizar diferentes compuestos con radicales distintos mediante la introducción de diferentes sustituyentes en el esqueleto quinolónico (Mella y col., 2000). A lo largo del tiempo, se han realizado múltiples modificaciones estructurales en las quinolonas con el objetivo de mejorar la penetración tisular y ampliar el espectro de actividad antibacteriana, entre las cuales destaca la sustitución de un átomo de flúor en la posición C-6, dando origen al grupo de las fluoroquinolonas (Kocsis y col., 2016). Es fundamental comprender la función de cada posición numerada del núcleo quinolónico (**Figura 2**). La posición N-1 participa en la formación del complejo de unión enzima-ADN, mediante interacciones hidrofóbicas con el surco mayor del ADN; la introducción de sustituyentes como el grupo 2,4-difluorofenil en esta posición incrementa la potencia del fármaco frente a organismos anaerobios y bacterias gramnegativas. Las posiciones N-3 y N-4 del núcleo quinolónico se consideran críticas para la unión a la diana del fármaco (topoisomerasas bacterianas), a la fecha no se han reportado

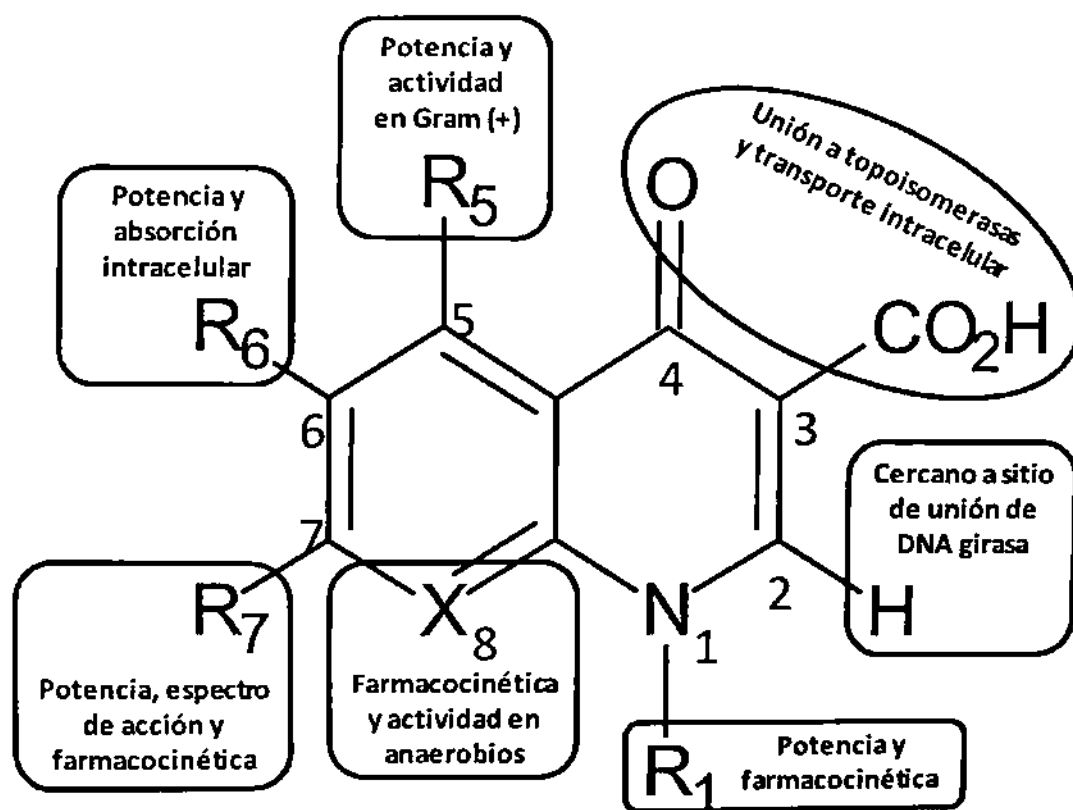


Figura 2. Estructura química base de las fluoroquinolonas. Se describen las funciones de cada sustitución en el átomo correspondiente de la estructura base de las fluoroquinolonas (tomado de Chávez-Jacobo, 2015).

sustituciones útiles (Andersson y MacGowan, 2003). La posición C-5, al introducirse sustituyentes pequeños como amino, hidroxilo o metilo se ve incrementada la actividad contra bacterias grampositivas. La posición C-6 es aquella a la que al introducirse un átomo de flúor incrementó la penetración del antibiótico a través de la membrana bacteriana y aumenta su afinidad por enzimas esenciales como la girasa del ADN y la topoisomerasa IV, esta modificación dio origen al grupo conocido como fluoroquinolonas y permitió ampliar considerablemente su espectro de acción frente a bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas. La posición C-7 al poder albergar una piperazina aumenta la actividad contra bacterias grampositivas, modificación particular de la ciprofloxacina.

1.4 Clasificación de las quinolonas

El desarrollo de las diferentes generaciones de quinolonas ha sido guiado por diversos criterios estructurales, microbiológicos y farmacocinéticos, con el objetivo de mejorar su eficacia y ampliar su espectro de acción. Inicialmente, las quinolonas de primera generación, como el ácido nalidíxico, presentaban actividad limitada contra bacterias gramnegativas entéricas. A lo largo del tiempo, se introdujeron modificaciones químicas, principalmente en las posiciones C-6, C-7 y C-8 del núcleo de la quinolona, que permitieron aumentar su afinidad por las dianas bacterianas (ADN girasa y topoisomerasa IV), así como mejorar su estabilidad y potencia (Andriole y col., 2005). Estos cambios estructurales también contribuyeron a ampliar el espectro antimicrobiano hacia bacterias grampositivas, patógenos intracelulares y anaerobios, como se observa en las quinolonas de tercera y cuarta generación. Otro criterio importante en su evolución fue la mejora de las propiedades

farmacocinéticas, con compuestos que presentan una mayor biodisponibilidad oral, vida media prolongada y mejor penetración tisular (Emmerson y col., 2003). Además, se buscaron diseños que redujeran la aparición de resistencia bacteriana, ya fuera evitando la acción de bombas de eflujo, disminuyendo la susceptibilidad a mutaciones en genes diana como *gyrA* y *parC*, genes que codifican a subunidades de topoisomerasas, reduciendo la resistencia cruzada (Hooper y col., 2016). Finalmente, también se consideró la mejora del perfil de seguridad de los compuestos, disminuyendo efectos adversos como la fototoxicidad, alteraciones neurológicas o toxicidad articular, especialmente en poblaciones vulnerables. Estos criterios en conjunto han permitido el desarrollo progresivo de quinolonas más potentes, seguras y de mayor aplicabilidad clínica (Andriole y col., 2005). Existen múltiples ejemplos de cada generación de antibióticos con estructura química modificada (**Figura 3**).

1.4.1 Primera generación

La primera generación de quinolonas se caracteriza por compuestos no fluorados, entre los que destaca el ácido nalidíxico, descubierto en 1962 como subproducto en la síntesis de cloroquina. Estas moléculas presentan una actividad antibacteriana limitada, enfocada principalmente en bacterias gramnegativas, especialmente en enterobacterias asociadas a infecciones urinarias, debido a su escasa penetración en tejidos y débil actividad contra organismos grampositivos y anaerobios (Hooper, 2016). El mecanismo de acción del ácido nalidíxico involucra la inhibición de la ADN girasa, enzima esencial para la replicación y transcripción bacteriana. Sin embargo, su uso clínico se vio restringido por su rápido desarrollo de resistencia, la necesidad

de administrar dosis frecuentes y la baja biodisponibilidad sistémica. Estas limitaciones impulsaron el desarrollo de nuevas generaciones con mejores propiedades farmacocinéticas, espectro ampliado y mayor estabilidad (Redgrave y col., 2014).

1.4.2 Segunda generación

La segunda generación de quinolonas representó un avance significativo frente a sus predecesoras, marcando el inicio de las llamadas fluoroquinolonas, debido a la introducción de un átomo de flúor en posición C-6 del anillo quinolónico. Este cambio estructural fue clave para mejorar tanto la actividad antibacteriana como las propiedades farmacocinéticas de estos compuestos. Ejemplos emblemáticos de esta generación son ciprofloxacina, norfloxacina, enoxacina y ofloxacina. Estas moléculas presentan un espectro extendido de actividad frente a bacterias gramnegativas, incluyendo *P. aeruginosa*, y un mejor perfil frente a bacterias grampositivas comparado con la primera generación (Redgrave y col., 2014).

1.4.3 Tercera generación

La tercera generación de quinolonas se desarrolló con el objetivo de mejorar el espectro de actividad frente a bacterias grampositivas, especialmente *Streptococcus pneumoniae*, manteniendo una eficacia razonable contra gramnegativos. Estas fluoroquinolonas también son conocidas como respiratorias por su eficacia en infecciones del tracto respiratorio. Entre los representantes más destacados se encuentran la levofloxacina, la gatifloxacina y la sparfloxacina (Emmerson y col., 2003).

Uno de los cambios clave en esta generación fue la modificación en el grupo C-7, lo cual mejoró la afinidad por la topoisomerasa IV, enzima crucial en bacterias grampositivas. Por ello, estas fluoroquinolonas muestran una mejor actividad frente a cepas resistentes a β -lactámicos o macrólidos, particularmente *S. pneumoniae*, y han sido útiles en el tratamiento de neumonía adquirida en la comunidad, bronquitis crónica y sinusitis (Dalhoff & Petersen, 2003).

La levofloxacin, en particular, es el isómero activo de la ofloxacin y presenta una farmacocinética favorable, con buena biodisponibilidad oral, semivida prolongada, y excelente penetración pulmonar. Esto permite esquemas de dosificación simples y efectivos, algo crucial en infecciones respiratorias complicadas (Zhanel y col., 2002). Además, su perfil de seguridad es más favorable en comparación con quinolonas anteriores, aunque no está exento de eventos adversos como fototoxicidad o prolongación del intervalo QT (medida de tiempo entre polarización y despolarización ventricular), especialmente en el caso de sparfloxacin (Goldstein, 2002).

1.4.4 Cuarta generación

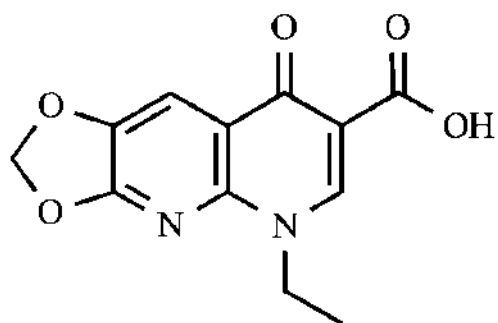
La cuarta generación de quinolonas representa un avance significativo en la evolución de esta clase de antibióticos, con el objetivo de combinar un espectro de acción amplio frente a bacterias grampositivas, gramnegativas y anaerobias, además de mejorar el perfil farmacocinético y la estabilidad frente a mecanismos comunes de resistencia. Representantes destacados de esta generación son la moxifloxacin, trovafloxacin y garenoxacin (Emmerson y col., 2003). Una

característica estructural clave de esta generación es la modificación en el anillo C-8 (por ejemplo, un grupo metoxi en moxifloxacin), lo cual contribuye a una mayor actividad frente a anaerobios como *Bacteroides fragilis* y una mejor estabilidad frente a bombas de eflujo y a ciertas mutaciones en topoisomerasas. Además, presentan una afinidad balanceada tanto por la ADN girasa como por la topoisomerasa IV, lo que reduce la probabilidad de selección rápida de mutantes resistentes, ya que se requieren múltiples alteraciones en ambas dianas enzimáticas para generar una resistencia clínicamente significativa (Shams y col., 2014). La moxifloxacin, el miembro más representativo, se ha posicionado como una opción útil en infecciones respiratorias complicadas, sinusitis, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, y en algunos casos de tuberculosis farmacorresistente. Su excelente biodisponibilidad oral, alto volumen de distribución y larga semivida permiten una dosificación diaria única, lo cual mejora la adherencia al tratamiento (Rodvold y col., 2003). Sin embargo, al igual que otras fluoroquinolonas, está asociada a riesgos de prolongación del intervalo QT, además de otros eventos adversos que han llevado a la limitación o retiro de algunos compuestos de esta generación, como trovafloxacin, debido a hepatotoxicidad severa (Goldstein, 2002).

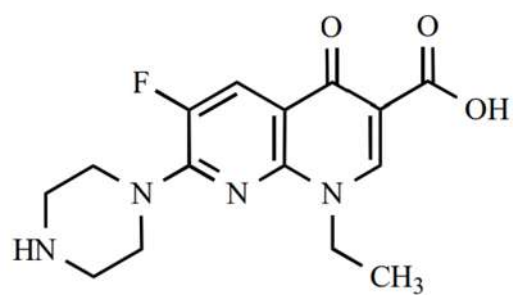
Aunque estas quinolonas ofrecen una mejor cobertura frente a patógenos resistentes y anaerobios, su eficacia frente a *P. aeruginosa* sigue siendo limitada en comparación con ciprofloxacina, y el uso indiscriminado ha derivado en el surgimiento de mecanismos de resistencia como mutaciones en *gyrA* y *parC*,

bombas de eflujo activadas y, en menor medida, genes de resistencia plasmídica como los *qnr* o las enzimas acetilasas tipo AAC(6')-Ib-cr (Strahilevitz y col., 2009).

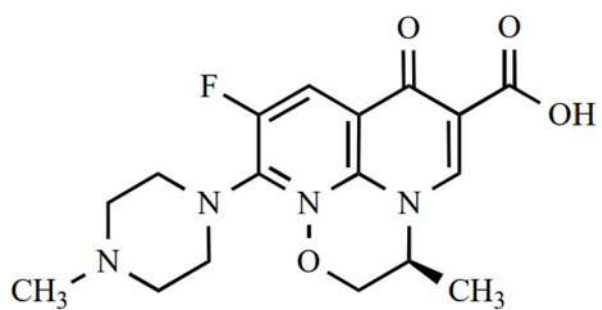
A)



B)



C)



D)

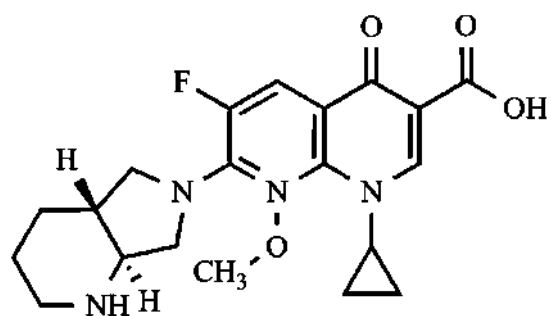


Figura 3. Estructuras químicas representativas de cada generación de quinolonas. A) Ácido oxolínico, **B)** norfloxacin, **C)** levofloxacin y **D)** moxifloxacin (Cattoir y col., 2009).

1.5 Mecanismo de acción de las quinolonas

Funciona mediante la Inhibición de la ADN girasa, las fluoroquinolonas ejercen su acción antibacteriana mediante la inhibición de la ADN girasa, una enzima esencial que participa en el control del superenrollamiento del ADN y que es necesaria para los procesos de replicación, transcripción y recombinación del ADN bacteriano (**Figura 4**). Su principal función es causar giro positivo lo cual reduce tensión que se acumula de manera normal en la cadena de doble hélice del ADN durante los procesos previamente mencionados que además son fundamentales para el mantenimiento de la célula, la girasa está formada por las subunidades GyrA y GyrB funcionando como un heterotetrámero. La ciprofloxacina se une específicamente a la ADN girasa en las bacterias, impidiendo que pueda realizar su actividad normal. Esto provoca la formación de complejos de ADN-enzima inactivos y la inhibición del proceso de replicación del ADN bacteriano.

Inhibición de la topoisomerasa IV: esta enzima también es vital para el proceso de replicación bacteriana, ya que ayuda a separar las moléculas de ADN recién replicadas. La ciprofloxacina también se une y afecta la actividad de la topoisomerasa IV, lo que conduce a la interrupción adicional de la replicación y la síntesis del ADN bacteriano.

La ADN girasa es una enzima que se encuentra solo presente en bacterias, lo cual la vuelve un objetivo ideal para tratamientos contra infecciones bacterianas.

1.6 Sistemas de resistencia a quinolonas

Existen múltiples estrategias empleadas por las bacterias para evitar el efecto de los antibióticos y proliferar en determinados medios y condiciones (**Figura 5**). Estas estrategias se basan en la disminución de la concentración intracelular la cuál puede generarse por sistemas de expulsión, regulación de porinas, modificación en lipopolisacáridos, mutaciones en las proteínas diana de los antibióticos y determinantes de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos. Todas ellas dan como resultado un perfil diferente de resistencia, además de no ser mutuamente excluyentes, pueden tener un efecto aditivo entre sí (Cattoir y col., 2009).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a quinolonas que pueden agruparse funcionalmente en tres categorías principales: (i) aquellos que disminuyen la concentración intracelular del antibiótico, como las bombas de eflujo, la regulación de porinas y las modificaciones en el lipopolisacárido; (ii) los que alteran las moléculas blanco, principalmente mediante mutaciones en las topoisomerasas tipo II; y (iii) los que modifican o protegen directamente al antibiótico, como ocurre con ciertos determinantes enzimáticos o proteínas protectoras. Estos mecanismos no actúan de forma aislada, sino que pueden coexistir y potenciarse, generando perfiles de resistencia más complejos (Becerra y col., 2009; Cattoir y col., 2009).

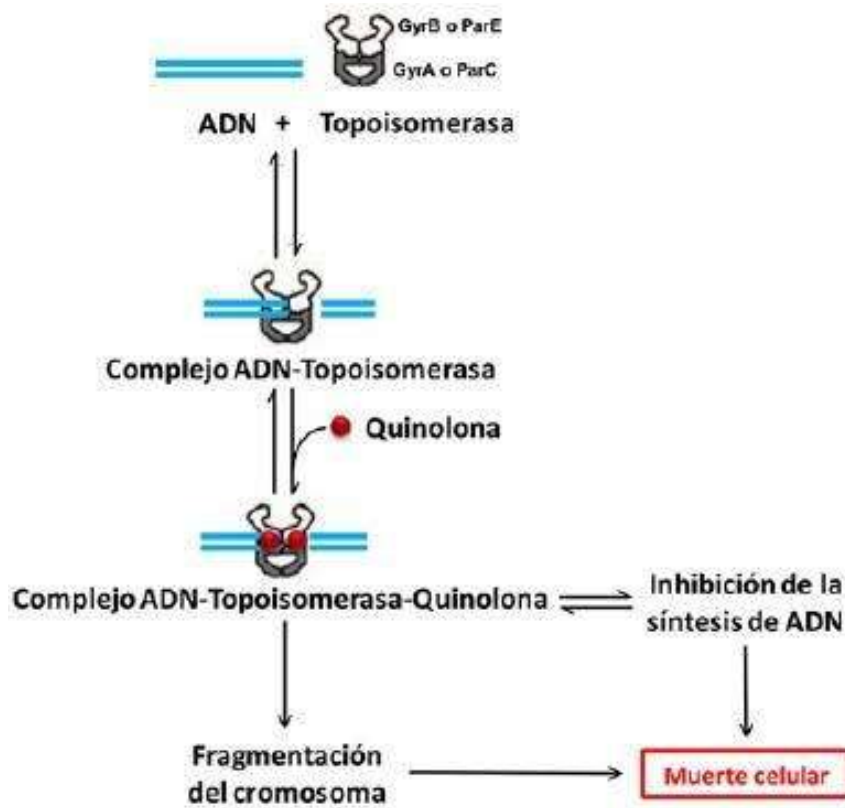


Figura 4. Mecanismo de acción de las quinolonas. Las quinolonas se unen al complejo ADN-topoisomerasa (GyrA/GyrB o ParC/ParE), formando un complejo ternario que bloquea la síntesis de ADN. Esta interacción impide el religamiento del ADN, ocasionando la fragmentación del cromosoma y provocando la muerte celular bacteriana (Chávez-Jacobo, 2015).

Desde el punto de vista genético, estos sistemas pueden estar codificados tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos móviles como plásmidos. Los mecanismos cromosómicos incluyen principalmente mutaciones en genes blanco (*gyrA*, *parC*) y la regulación de sistemas intrínsecos como bombas de eflujo y porinas. En contraste, los determinantes plasmídicos, como *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB* y *crpP*, se caracterizan por su capacidad de transferencia horizontal y por conferir una disminución inicial de la susceptibilidad. Aunque este efecto suele ser de bajo nivel, resulta crítico porque facilita la supervivencia bacteriana bajo presión antibiótica y promueve la selección de mutaciones cromosómicas adicionales, favoreciendo la evolución hacia niveles más altos de resistencia (Zhao y Drlica, 2008; Yassine y col., 2019).

1.6.1 Sistemas de expulsión

Las bacterias gramnegativas, como *E. coli*, resisten múltiples antibióticos mediante bombas de eflujo tripartitas, que atraviesan la membrana celular interna y externa. El sistema AcrAB–TolC constituye una bomba de eflujo tripartita conformado por las proteínas AcrB, AcrA, TolC y el modulador AcrZ perteneciente a la familia RND (Resistance–Nodulation–Division), ampliamente distribuida en bacterias gramnegativas. El sistema AcrAB–TolC constituye una bomba de eflujo tripartita perteneciente a la familia RND (Resistance–Nodulation–Division), ampliamente distribuida en bacterias gramnegativas. Este complejo atraviesa de manera continua la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa, permitiendo la expulsión activa de una amplia gama de compuestos tóxicos desde el citoplasma y el periplasma hacia el exterior celular (Du y col., 2014).

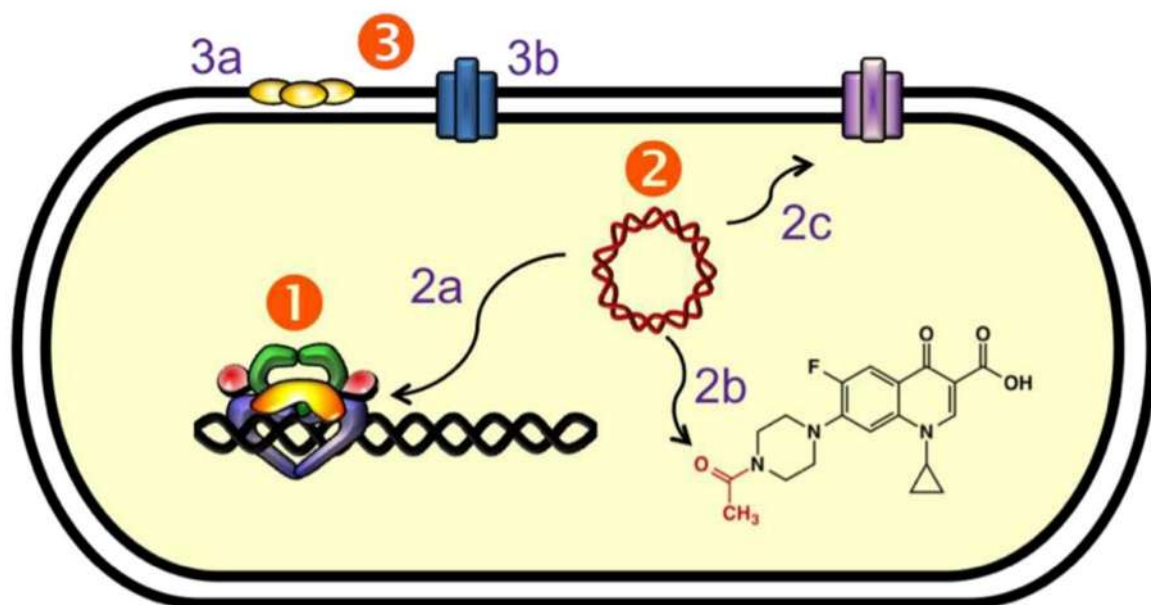


Figura 5. Mecanismos de resistencia a las quinolonas. (1) Resistencia mediada por el blanco molecular: mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV reducen la afinidad de estas enzimas por las quinolonas, debilitando su acción inhibitoria. (2) Resistencia mediada por plásmidos: (2a) las proteínas Qnr interfieren con la unión entre las topoisomerasas y el ADN, protegiendo el complejo enzima-ADN frente a la acción del antibiótico; (2b) la enzima Aac(6')-Ib-cr, una acetiltransferasa de aminoglucósidos, modifica el grupo amino libre presente en el anillo C7 de ciprofloxacino y norfloxacino, reduciendo su efectividad; (2c) algunas bombas de expulsión codificadas por plásmidos disminuyen la concentración intracelular del fármaco al eliminarlo activamente. (3) Resistencia mediada por el cromosoma: (3a) la reducción en la expresión de porinas en bacterias gramnegativas limita la entrada del antibiótico a la célula; (3b) la sobreexpresión de bombas de expulsión codificadas cromosómicamente contribuye a una menor retención intracelular del compuesto (Aldred y col., 2014).

El componente AcrB, localizado en la membrana interna, actúa como el transportador primario y utiliza la fuerza protón-motriz como fuente de energía para captar sustratos estructuralmente diversos, incluyendo antibióticos como fluoroquinolonas, β -lactámicos, tetraciclinas y cloranfenicol. Estos compuestos son reconocidos en múltiples cavidades de unión dentro de AcrB y transportados mediante un mecanismo cíclico de cambios conformacionales (Du y col., 2014).

El adaptador periplásmico AcrA cumple una función estructural y dinámica al conectar AcrB con el canal de salida TolC, estabilizando el complejo y facilitando la transmisión de los cambios conformacionales necesarios para el transporte eficiente. Por su parte, TolC, anclado en la membrana externa, forma un conducto continuo que permite la expulsión directa de los sustratos al medio extracelular, evitando su acumulación en el periplasma (Du y col., 2014).

Una disminución en la concentración intracelular del antibiótico resulta en un perfil de resistencia mayor, esto se puede lograr en el caso de *E. coli* regulando la expresión de las porinas codificadas en el gen *ompF*, si la cantidad de porinas disminuye también la permeabilidad que tiene el antibiótico se verá reducida junto con su efectividad (Cattoir y col., 2009).

1.6.2 Modificación de moléculas blanco

Niveles altos de resistencia suelen ser causados por un cúmulo de mutaciones especialmente en el gen *gyrA* seguido por la subunidad de la topoisomerasa IV codificada en el gen *parC*. Las alteraciones predominantes en GyrA son en la región

determinante de resistencia a quinolonas (QRDR por sus siglas en inglés) la cual está localizada entre los residuos Ala67 y Gln106, aunque en ocasiones una sola mutación en el gen *gyrA* es suficiente para alcanzar perfiles de resistencia altos (Cattoir y col., 2009). En *gyrA*, las mutaciones que ocasionan la sustitución de aminoácidos más comunes son Ser83→Leu y Asp87→Asn/Gly, mientras que en *parC* las mutaciones suelen generar cambios en la subunidad ParC suelen encontrarse cambios como Ser80→Ile y Glu84→Val, los cuales reducen la afinidad de la fluoroquinolona por el complejo enzima-ADN, impidiendo su acción bactericida (Hooper y col., 2015). Estudios clínicos y experimentales han demostrado que una sola mutación en *gyrA* puede elevar moderadamente la concentración mínima inhibitoria (CMI), pero que se requiere la acumulación de múltiples mutaciones combinadas en *gyrA* y *parC* para alcanzar niveles clínicamente relevantes de resistencia. Estas mutaciones no solo surgen bajo presión por antibióticos, sino que pueden coexistir con otros mecanismos, como bombas de eflujo y genes plasmídicos (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr*), lo que potencia su efecto y favorece la persistencia de cepas multirresistentes en ambientes hospitalarios y comunitarios (Cambeau y col., 1995; Redgrave y col., 2014).

1.6.3 Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr son determinantes de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos que pertenecen a la familia de proteínas de repeticiones pentapéptidas. El gen *qnrA1*, identificado por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* en 1998, codifica una proteína de 218 aminoácidos con estructura repetitiva característica y fue el primero de múltiples tipos descubiertos, incluyendo *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD*

(Nordmann y col., 2005). Estas proteínas han sido detectadas en múltiples especies de Enterobacteriaceae y otros bacilos gramnegativos del ambiente acuático, evidenciando un origen ambiental como *Shewanella algae* o *Vibrio* spp.

Desde el punto de vista funcional, Qnr actúa como una proteína “imitadora del ADN”, uniéndose a las enzimas topoisomerasa IV y ADN girasa, evitando la estabilización del complejo ADN-enzima-quinolona y permitiendo la religación del ADN atrapado, anulando el efecto inhibitorio de las quinolonas. En ensayos *in vitro*, pequeñas concentraciones de QnrB1 (en el rango de picomolar a nanomolar) son capaces de proteger significativamente a la girasa del bloqueo causado por ciprofloxacina (Jacoby y col., 2015).

En términos clínicos, aunque las proteínas Qnr sólo confieren un nivel bajo de resistencia (un aumento modesto en la CMI), su presencia favorece la selección y evolución de mutaciones cromosómicas adicionales que incrementan la resistencia a niveles clínicamente relevantes. Además, los genes *qnr* se encuentran frecuentemente co-localizados con genes de β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) o carbapenemasas en plásmidos asociados a multiresistencia, facilitando su diseminación global (Rodríguez-Martínez y col., 2011).

Estas proteínas Qnr son uno de los primeros determinantes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos que se descubrieron, poseen un efecto protector ante la presencia de quinolonas debido a que compiten por la unión a las topoisomerasas modificando así la afinidad que poseen estas enzimas a las quinolonas evitando así que realicen su efecto. Aunque por si solas no generan una resistencia significativa, promueven la selección de mutaciones cromosómicas que si conducen a resistencias de nivel clínico (Cattoir y col., 2009).

1.6.4 Regulación de porinas

Las bacterias gramnegativas desarrollan resistencia a las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina no solo mediante mutaciones en *gyrA* y *parC*, ya mencionadas, sino también a través de regular la disminución de la expresión o la pérdida estructural de porinas constituidas en su membrana externa. En *E. coli*, la disminución en expresión del gen que codifica a la porina OmpF, frecuentemente acompañada por OmpC, reduce la entrada de ciprofloxacina, elevando así la CMI y sosteniendo la viabilidad de cepas con mutaciones en topoisomerasas (QRDRs) sin pérdida de aptitud biológica. Múltiples estudios clínicos y de laboratorio muestran que el fenotipo de resistencia implica una regulación mediada por los sistemas globales MarA, SoxS y Rob, que activan la expresión de la sARN *micF*, que es una cadena pequeña de ARN cuyo producto no es proteína pero participa en regulaciones post-transcripcionales, la cual se une al ARNm de *ompF*, reprimiendo su traducción y disminuyendo la permeabilidad de la membrana externa (kishii, 2009).

En aislados de *E. coli* de origen veterinario, se observó que 10 de 11 cepas resistentes a fluoroquinolonas mostraron disminución de la expresión del gen *ompF* junto con sobreexpresión de los genes que codifican a las proteínas de la bomba AcrAB-TolC, mientras que en muchos de esos casos las mutaciones en *gyrA* también estaban presentes, lo que sugiere un efecto sinérgico entre menor captación, eflujo activo y modificación del blanco terapéutico (Karczmarczyk y col., 2011). En *K. pneumoniae*, la reducción o ausencia de las porinas OmpK35 y OmpK36 se asocia significativamente con la producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL); además, en presencia de mutaciones en

topoisomerasas, la pérdida de porinas causa aumento moderado (dos a cuatro veces) en la resistencia a fluoroquinolonas . Por tanto, la regulación adaptativa o mutacional de porinas representa un mecanismo clave de resistencia que actúa reduciendo la entrada del fármaco, con un impacto notable cuando coexiste con otros mecanismos, lo que facilita la aparición de cepas multirresistentes clínicamente relevantes (Martínez-Martínez, 2002).

1.6.5 Modificación de la ADP-L-glicero-D-manno-heptosa 6-epimerasa

En el contexto de la resistencia a quinolonas, el gen *rfaD* adquiere relevancia por su papel esencial en la síntesis del núcleo interno del lipopolisacárido (LPS) en bacterias gramnegativas como *E. coli*. El LPS es un componente estructural fundamental de la membrana externa, donde contribuye a la integridad, estabilidad y función de barrera, limitando la permeabilidad de la envoltura celular frente a compuestos hidrofóbicos y antibióticos. Alteraciones en la estructura del LPS pueden modificar la permeabilidad de la membrana externa y en consecuencia, influir en la susceptibilidad bacteriana a quinolonas y otros agentes antimicrobianos. La proteína RfaD cataliza la epimerización de ADP-D-glicero-D-manno-heptosa, un paso clave para la formación de un LPS estructuralmente completo y funcional. Mutaciones o deleciones en *rfaD* generan un fenotipo rugoso, caracterizado por un LPS truncado que debilita la barrera de la membrana externa, aumentando su permeabilidad y afectando la distribución de proteínas como las porinas OmpF/OmpC (Pagnout y col., 2019).

Este defecto estructural incrementa la susceptibilidad a diversas moléculas antimicrobianas, incluyendo detergentes y antibióticos como las fluoroquinolonas, al

facilitar su entrada a través de la membrana. De hecho, estudios han mostrado que mutantes *rfaD* presentan mayor sensibilidad a ciprofloxacina en comparación con cepas silvestres, incluso cuando las mutaciones clásicas en *gyrA* o *parC* no están presentes. Además, la disrupción de *rfaD* conlleva alteraciones en el metabolismo redox celular, reduciendo la disponibilidad de NADPH y H₂S, lo que favorece la acumulación de especies reactivas de oxígeno tras el tratamiento con quinolonas, potenciando su efecto letal (Wang y col., 2022).

Por tanto, aunque *rfaD* no está directamente involucrado en la diana molecular de las quinolonas, su papel en el ensamblaje del LPS y la integridad de la membrana lo convierte en un factor modulador de la sensibilidad bacteriana frente a estos antibióticos. Su inactivación puede, paradójicamente, aumentar la eficacia de las quinolonas, lo que sugiere que el estado del LPS puede ser un determinante clave en el éxito terapéutico frente a cepas multirresistentes.

En bacterias gramnegativas como *E. coli* y *K. pneumoniae*, la alteración del LPS mediante mutaciones en genes como *rfaD* puede generar modificaciones estructurales que afectan la conformación o el número de porinas, lo que reduce la entrada de compuestos hidrofílicos como la ciprofloxacina. A diferencia del fenotipo clásico rugoso, algunas cepas muestran una reorganización adaptativa de los LPS que mejora la barrera física de la membrana externa, disminuyendo la permeabilidad sin comprometer la viabilidad celular. Esta disminución en la captación de quinolonas permite que incluso niveles bajos de expresión de bombas de eflujo o mutaciones subóptimas en *gyrA/parC* se manifiestan como fenotipos resistentes (Veleba y col., 2012). Además, la reorganización del LPS inducida por mutaciones en *rfaD* puede modificar la superficie celular, afectando la interacción

inicial del antibiótico con la célula y dificultando su acumulación intracelular. En algunos estudios, se ha observado que ciertas cepas con alteraciones en genes como *rfaD* *rfaC* *rfaF* *rfaP* *rfaG* presentan niveles reducidos de acumulación de ciprofloxacina y resistencia cruzada a múltiples compuestos, lo que sugiere que las modificaciones del LPS pueden funcionar como un mecanismo complementario a otros sistemas clásicos de resistencia, contribuyendo a un fenotipo de multirresistencia estable (Delcour, 2009; Veleba y col., 2012).

1.6.6 Modificación enzimática

Uno de los mecanismos menos comunes, pero clínicamente relevantes de resistencia a quinolonas es la modificación enzimática del antibiótico. A diferencia de otros mecanismos como las mutaciones en las topoisomerasas o el bombeo activo, estas estrategias implican la inactivación química directa del antibiótico mediante enzimas codificadas principalmente en plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal entre especies bacterianas. La enzima AAC(6')-Ib-cr, una variante de la acetiltransferasa aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasa, es el ejemplo más representativo. Esta enzima tiene la capacidad de acetilar el grupo amino piperazinilo presente en varias fluoroquinolonas, como ciprofloxacina y norfloxacina, reduciendo así su capacidad de interacción con sus dianas enzimáticas (Robicsek y col., 2006; Blair y col., 2015).

A diferencia de la versión clásica AAC(6')-Ib, que solo acetila aminoglucósidos, la variante "cr" (ciprofloxacina-resistente) posee dos mutaciones puntuales (Trp102→Arg y Asp179→Tyr) que modifican el sitio activo de la enzima, permitiéndole actuar

también sobre fluoroquinolonas. Este proceso no genera una inactivación completa, pero sí reduce significativamente la concentración intracelular efectiva del antibiótico, disminuyendo su actividad bactericida y favoreciendo la selección de mutantes con mecanismos de resistencia adicionales (Vetting y col., 2008).

1.7 Mutación

Las mutaciones corresponden a alteraciones permanentes en la secuencia del material genético, originadas de manera espontánea, principalmente por errores durante la replicación del ADN o inducidas por agentes externos denominados mutágenos; los cuales pueden ser físicos, químicos o biológicos.

Entre los mutágenos físicos destacan las radiaciones ionizantes, como los rayos X y gamma, que provocan rupturas de doble cadena en el ADN, así como la radiación ultravioleta (UV), la cual favorece la formación de dímeros de timina que interfieren con la replicación normal del ADN (Friedberg y col., 2006; López-García y col., 2020). En cuanto a los mutágenos químicos, destacan los agentes alquilantes, como el etilmetanosulfonato, que introducen grupos alquilo en las bases nitrogenadas, provocando errores de apareamiento durante la replicación (Wyatt & Pittman, 2006). Otros compuestos, como el ácido nitroso, actúan desaminando bases como la adenina y citosina, generando transiciones mutagénicas (Loveless, 1969). Los análogos de bases, como el 5-bromouracilo, se incorporan erróneamente en el ADN y se emparejan de manera inadecuada, mientras que los agentes intercalantes, como el bromuro de etidio, se insertan entre las bases del ADN y causan inserciones o deleciones (Yields & Ehrlich, 1999). Por su parte, los mutágenos biológicos incluyen virus oncogénicos, como el virus del papiloma humano (VPH), capaces de

insertar su genoma en el ADN del huésped y desregular genes implicados en el control del ciclo celular, así como ciertos productos bacterianos como la colibactina de *E. coli*, que inducen daño genotóxico severo en células eucariotas (Nougayrède y col., 2006; Moody & Laimins, 2010). Finalmente, los transposones o elementos genéticos móviles también actúan como mutágenos al insertarse en regiones codificantes o reguladoras del genoma, interrumpiendo su funcionalidad normal (Kidwell & Lisch, 2001). La comprensión de estos agentes es fundamental para el estudio de la mutagénesis por la relación con procesos evolutivos microbianos.

En bacterias, las mutaciones representan una fuente fundamental de variación genética, permitiendo la adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Estas modificaciones se clasifican en puntuales (cambio de un solo nucleótido), deleciones, inserciones y reordenamientos más complejos, como duplicaciones o inversiones de fragmentos. Las mutaciones puntuales pueden ser silenciosas (no cambian el aminoácido codificado), de cambio de sentido (modifican el aminoácido) o sin sentido (introducen un codón de paro prematuro), y su efecto depende del gen afectado y del contexto funcional. Bajo condiciones de estrés, como la exposición a contaminantes o cambios en el ambiente, ciertas mutaciones pueden conferir ventajas adaptativas, facilitando la utilización de nuevas fuentes de nutrientes, tolerancia a cambios extremos de pH, temperatura o salinidad, e incluso la resistencia a agentes antimicrobianos. Sin embargo, muchas mutaciones son perjudiciales o neutras, y su persistencia en una población dependerá de la selección natural. Las bacterias disponen de mecanismos de control, como el sistema de reparación de errores de apareamiento o la activación de respuestas específicas al daño genético, que regulan la frecuencia mutacional para equilibrar

la estabilidad del genoma con la capacidad de adaptación. Además, utilizando técnicas de biología molecular se pueden introducir cambios específicos (mutaciones) en una secuencia de ADN, las cuales son herramientas clave para generar variantes con propiedades mejoradas, como enzimas más eficientes o microorganismos con capacidades industriales particulares. En resumen, las mutaciones son cambios que se presentan en la información genética, pueden ser desde una sola base nitrogenada hasta fragmentos completos; la clasificación para estas es según criterios como origen, efectos e impacto en la funcionalidad, localización, entre otros (Krebs y col., 2017).

2. Antecedentes

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria gramnegativa, aerobia estricta, con forma de bacilo y motilidad conferida por un flagelo polar. Es oxidasa positiva, no fermentadora y presenta una notable versatilidad metabólica, lo que le permite sobrevivir en ambientes diversos, desde suelos y aguas hasta superficies hospitalarias y tejidos humanos. Esta especie es capaz de formar biopelículas, una característica clave en su persistencia y resistencia en entornos clínicos (Moradali y col., 2017). Desde el punto de vista clínico, *P. aeruginosa* se considera un patógeno oportunista de alta preocupación, responsable de infecciones graves como neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones en pacientes con quemaduras, bacteriemias y complicaciones en fibrosis quística (Lister y col., 2009). Su relevancia terapéutica se debe a su resistencia intrínseca a múltiples clases de antibióticos y su capacidad

para adquirir mecanismos adicionales de resistencia, como bombas de expulsión (Ej. MexAB-OprM), mutaciones en porinas, producción de β -lactamasas, incluyendo carbapenemasas, y modificaciones en las dianas antibióticas (Poole, 2011). Debido a esta capacidad de generar cepas multirresistentes (MDR), *P. aeruginosa* ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una bacteria de prioridad crítica para el desarrollo urgente de nuevos antibióticos (WHO, 2017). Su resistencia a carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas ha reducido considerablemente las opciones terapéuticas, convirtiéndola en un desafío clínico creciente a nivel mundial.

2.2 pUM505

El plásmido pUM505 fue obtenido de un aislado clínico de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado en Morelia, Michoacán (Cervantes, 1986). Dentro del grupo de trabajo se obtuvo la secuenciación completa de este plásmido (**Figura 6**); ahora se sabe que posee una longitud de 123 kb con 138 regiones codificantes y que la mayoría de los genes son codificados en la cadena complementaria de ADN (75%) y con un contenido de GC's del 60.5%. Este plásmido al ser transferido a una cepa de *P. aeruginosa* PAO1 confirió múltiples atributos como aumento en virulencia, resistencia a metales pesados como el cromo y el mercurio, así como resistencia a ciprofloxacina. Este plásmido, alberga dos islas genómicas principales. La primera, de alrededor de 31 kb, está relacionada con la resistencia a metales pesados e incluye genes que confieren resistencia a cromo y mercurio. La segunda isla, de aproximadamente 67 kb, comparte homología con las islas de patogenicidad PAPI-1 y PAPI-2 de la cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14 e incluye genes implicados

en la replicación, transferencia conjugativa y posibles factores de virulencia. La participación de la proteína CrpP en la resistencia a ciprofloxacina fue reportada por primera vez por nuestro grupo de trabajo (Chávez-Jacobo y col., 2018). CrpP es una proteína de 65 aminoácidos (aa) que presenta 18% de identidad y 26% de similitud con la aminoglucósido fosfotransferasa (APH-IIb) de *P. aeruginosa* M18, una enzima que se ha sugerido puede estar relacionada con la resistencia a aminoglucósidos (Wu y col., 2011; Chávez-Jacobo y col., 2018). CrpP es codificada por el gen *crpP* (antes nombrado como *orf131*) que fue localizado en el plásmido conjugativo pUM505, aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina y norfloxacina, otro antibiótico del grupo de las quinolonas (**Figura 6**) (Ramírez-Díaz y col., 2011; Chávez-Jacobo y col., 2018).

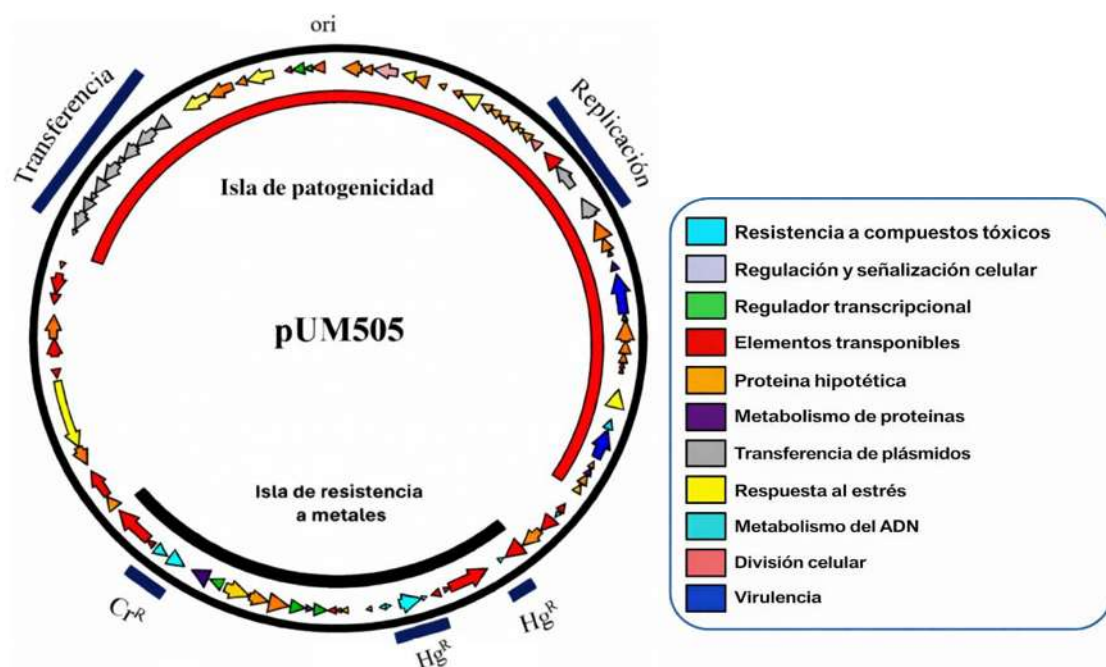


Figura 6. Mapa esquemático del plásmido pUM505. Mostrando la organización de sus principales regiones funcionales. Se destacan la isla de patogenicidad, la isla de resistencia a metales pesados (Hg^R), los genes relacionados con resistencia a compuestos (Cr^R), los elementos de transferencia y las regiones de replicación (ori). Las flechas de colores representan diferentes genes y operones asociados con estas funciones (modificado de Ramírez-Díaz, 2011).

2.3 Nivel de resistencia conferido por la proteína CrpP de pUM505

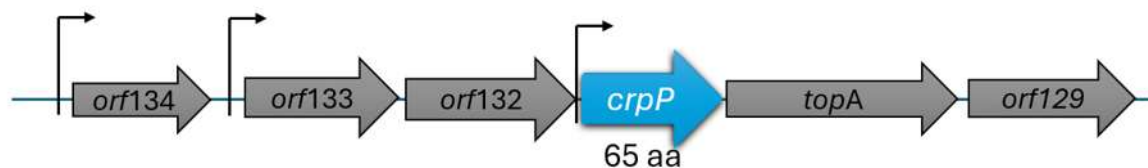
La amplificación y clonación del gen *crpP* en un vector de expresión (**Figura 7 A**), seguida de su transformación en *E. coli* J53-3, se asoció con una disminución en la susceptibilidad a ciprofloxacina en la cepa receptora (**Figura 7 B**). Mediante ensayos enzimáticos acoplados se demostró que la proteína CrpP presenta actividad catalítica dependiente de ATP sobre este antibiótico, lo que sugiere la fosforilación de la ciprofloxacina (**Figura 7 C**). A través de análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y ensayos de Infrarrojo, se determinó que la enzima CrpP fosforila a la molécula de ciprofloxacina la cual posteriormente es degradada (Chávez-Jacobo y col., 2018).

2.4 Prevalencia del gen *crpP*

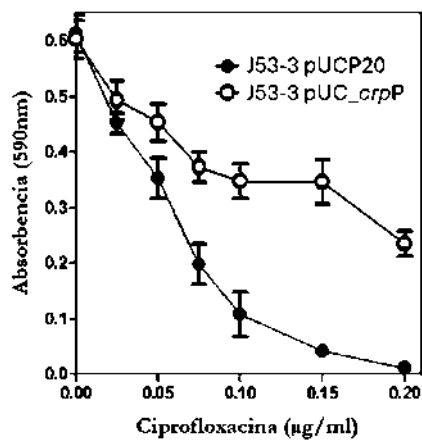
El gen *crpP* de pUM505 se encuentra distribuido en 5.19% de los aislados clínicos de una colección de enterobacterias de hospitales de México y en 7.35% de una colección de transconjugantes con plásmidos que confieren resistencia a antibióticos betalactámicos de espectro extendido, siendo más prevalente en aislados de *E. coli* (75%) seguido por *K. pneumoniae* (25%) (Chávez-Jacobo y col., 2019).

Todas las proteínas homólogas de CrpP identificadas a partir de los aislados clínicos corresponden a proteínas pequeñas (63-70 aminoácidos) con una identidad de 10 - 43.7% con respecto a la secuencia de la proteína CrpP de pUM505. Interesantemente, el gen homólogo *crpP*₂₉₈₂, identificado en uno de los aislados clínicos, confiere menor susceptibilidad a ciprofloxacina que el gen *crpP* de

A)



B)



C)

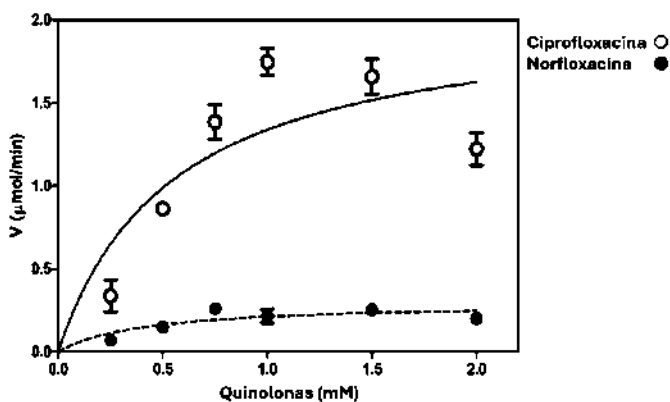


Figura 7. Caracterización de la proteína CrpP del plásmido pUM505. A) Mapa genético que indica la localización del gen *crpP* dentro del plásmido pUM505, B) curva de susceptibilidad a ciprofloxacina en caldo nutritivo de la cepa *E. coli* J53-3 transformada con el gen *crpP* comparando con la cepa sin el gen, C) Actividad enzimática de la proteína recombinante His-CrpP sobre ciprofloxacina y levofloxacina.

pUM505. El homólogo *crpP*₂₉₈₂, además de conferir mayor nivel de resistencia a ciprofloxacina en comparación con el gen *crpP* de pUM505, confiere resistencia a levofloxacina, otro antibiótico del grupo de las quinolonas (Chávez-Jacobo, 2020). A su vez también se encontró otro gen homólogo a *crpP* de pUM505 que confiere una disminución de la susceptibilidad a ciprofloxacina al ser introducido al mismo fondo genético *E. coli* J53-3 el cuál fue denominado *crpP*₂₄₂₄. Estos hallazgos evidencian la diseminación horizontal del gen *crpP* entre diferentes especies de enterobacterias y resaltan su relevancia epidemiológica en el contexto hospitalario, al contribuir potencialmente a la disminución de la eficacia terapéutica de fluoroquinolonas en infecciones bacterianas (Chávez-Jacobo y col., 2019).

2.5 Identificación de aminoácidos conservados en proteínas CrpP

El análisis de las secuencias de las proteínas CrpP homologas mostró que los residuos Gly7, Thr8, Asp9, Lis33 y Gly34 (ubicados en la región N-terminal) y Cis40 (ubicado en la región C-terminal) se conservan en todas las proteínas, sugiriendo que estos residuos podrían ser esenciales para la función de CrpP (Chávez-Jacobo y col., 2019). La inducción de mutaciones en los codones que codifican a Gly7, Asp9, Lis33 y Cis40 dando lugar al cambio por alanina en la proteína CrpP de pUM505 generó proteínas CrpP que confirieron aumento de la susceptibilidad a la ciprofloxacina en *E. coli* (Chávez-Jacobo y col., 2020). Las proteínas CrpP modificadas en los residuos Gly7, Asp9 y Lis33 por alanina poseen menor actividad catalítica para modificar a ciprofloxacina, mientras que el cambio de Cis40 abatió por completo la actividad de la proteína, indicando que estos aminoácidos poseen

un papel esencial para el mecanismo enzimático de CrpP que confiere resistencia a la ciprofloxacina (Chávez-Jacobo y col., 2020).

2.6 Participación del gen *crpP* en la selección colonias resistentes a quinolonas

La expresión del gen *crpP* en *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) aunado a disminuir la susceptibilidad a ciprofloxacina contribuyó al aumento de la selección de colonias con resistencia a ciprofloxacina incrementada (Ponce-Méndez, 2023). La frecuencia de generación de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina a partir de la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) fue de 2.9×10^{-6} colonias, un orden de magnitud mayor que la frecuencia de colonias obtenidas a partir de la cepa *E. coli* J53-3, sugiriendo que el gen *crpP* favorece la selección de colonias altamente resistentes a quinolonas. Las colonias con resistencia a ciprofloxacina incrementada obtenidas a partir de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) mostraron valores de resistencia a ciprofloxacina correspondiente a ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ (45 colonias), 2 $\mu\text{g/ml}$ (29 colonias) y ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (5 colonias), de acuerdo con los estándares de susceptibilidad a antimicrobianos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). El aumento en la resistencia a ciprofloxacina de las colonias obtenidas a partir de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), sugirió que el incremento fue generado por mutaciones de genes cromosómicos. Sin embargo, no se analizó la generación de mutaciones en genes cromosómicos.

El homólogo *crpP*₂₉₈₂, confiere resistencia a levofloxacina y a ciprofloxacina; además, al igual que el gen homólogo *crpP*₂₄₂₄, confiere mayor nivel de resistencia a ciprofloxacina en comparación con el gen *crpP* de pUM505, sugiriendo que la expresión de estas proteínas podría ser relevante clínicamente para la selección de

mutantes resistentes al antibiótico. Esto plantea la hipótesis de que el nivel de resistencia a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP es relevante para la selección de mutantes en genes cromosómicos que contribuyan en el aumento de la resistencia a ciprofloxacina.

3. Justificación

Los genes de resistencia a quinolonas como *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* codificados en plásmidos proporcionan un ambiente favorable que facilita la selección de mutantes con un mayor nivel de resistencia a las quinolonas y promueve el fracaso terapéutico del tratamiento. La proteína CrpP, codificada por el gen *crpP* que fue localizado en el plásmido conjugativo pUM505, participa en la disminución de la susceptibilidad de *E. coli* J53-3 a ciprofloxacina. La expresión de *crpP* en *E. coli* J53-3 condujo a un incremento en el número de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina en comparación a la cepa sin el gen, sugiriendo que la proteína CrpP favorece la selección de mutantes resistentes a quinolonas, al igual que otros mecanismos codificados en plásmidos; sin embargo, se desconoce si existe una correlación entre el nivel de resistencia conferido por la proteína CrpP y el número y tipo de mutaciones generadas. Por lo que evaluar el efecto que tiene el nivel de resistencia a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP en la selección de mutantes con elevada resistencia a ciprofloxacina, podría apoyar en nuestro entendimiento sobre el papel de este mecanismo en la resistencia clínica a quinolonas.

4. Hipótesis

El nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP influye en la selección de mutantes en genes cromosómicos con resistencia incrementada a quinolonas, requiriendo la expresión de un gen *crpP* que codifique a un mecanismo funcional de resistencia a ciprofloxacina para favorecer la selección de mutaciones.

5. Objetivos

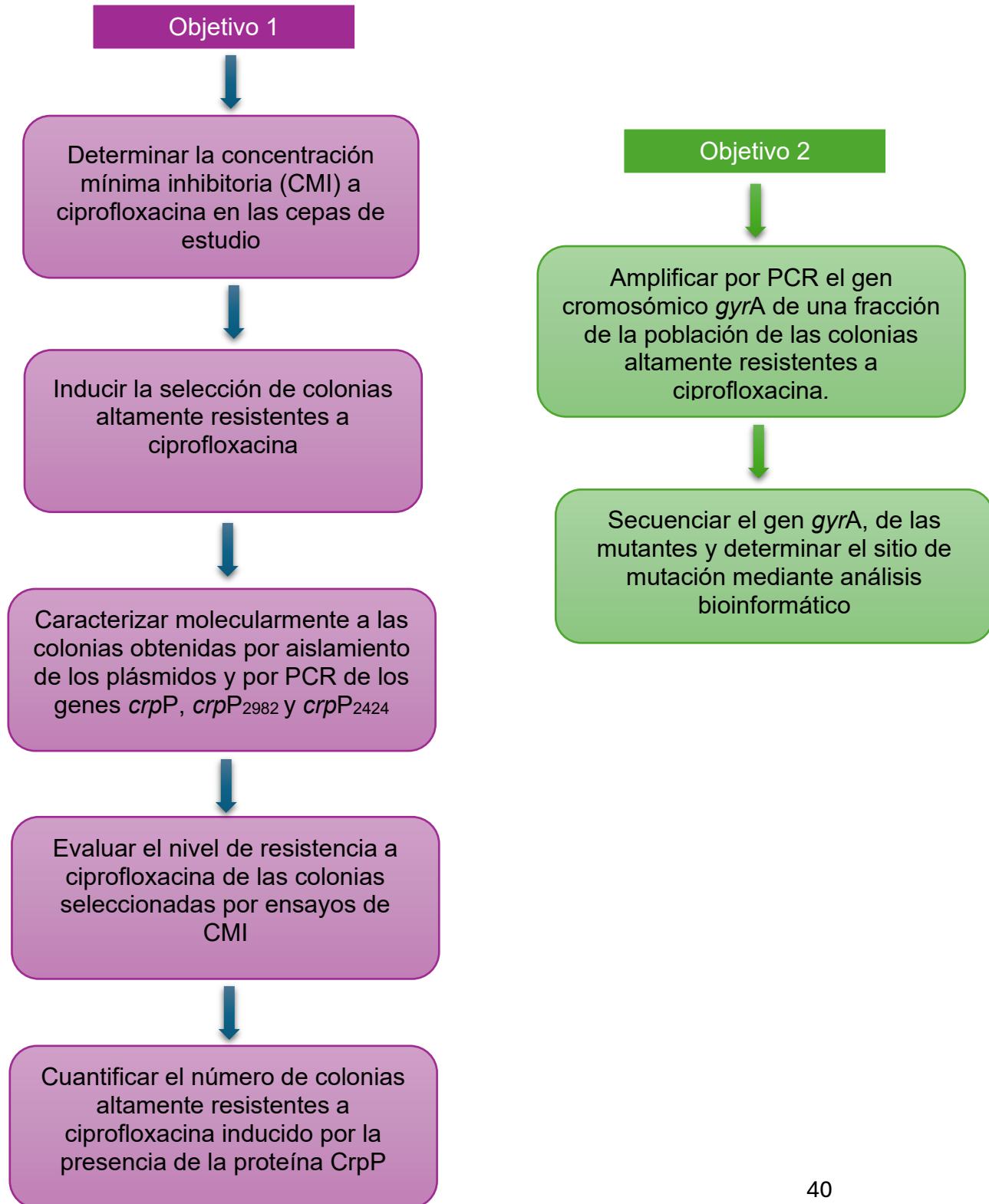
5.1 Objetivo general

Establecer si el nivel de resistencia a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP se relaciona con la generación y/o selección de mutaciones cromosómicas que incrementan la resistencia a ciprofloxacina en bacterias.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la expresión de los genes *crpP*₂₉₈₂ y *crpP*₂₄₂₄ en la selección de mutantes con resistencia a ciprofloxacina incrementada.
2. Identificar mutaciones en el gen *gyrA* de las colonias altamente resistentes a ciprofloxacina.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1 Medios de cultivo empleados

Todos los medios utilizados, y/o sus componentes, se adquirieron de los laboratorios BD Bioxon™ de México S.A., Merck-México S.A. o Sigma Chemical Corporation.

1. Medio mínimo M9 (M9): sales minerales M9 (Sigma), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, glucosa 20 mM (Sambrook y col., 1989).
2. Caldo nutritivo (CN): peptona (0.5%) y extracto de carne (0.3%) (Bioxon).
3. Agar nutritivo: peptona (0.5%), extracto de carne (0.3%) y agar bacteriológico (1.5%) (Bioxon).
4. Caldo Luria Bertani (LB): NaCl (1%) (J. T. Baker), peptona de caseína (1%) (Bioxon), y extracto de levadura (0.5%) (Becton Dickinson).
5. Agar (LB): NaCl (1%) (J. T. Baker), peptona de caseína (1%) (Bioxon), extracto de levadura (0.5%) (Becton Dickinson) y agar bacteriológico (1.5%) (Bioxon).

7.2 Cepas bacterianas

A continuación, se enlistan las cepas que se utilizaron:

1. *E. coli* ATCC 25922: esta cepa se utiliza como referencia para analizar la susceptibilidad a múltiples antibióticos, el uso de esta cepa es para validar los resultados de los ensayos CMI.
2. *E. coli* J53-3: cepa proporcionada por el Instituto Nacional de Salud Pública; Esta bacteria es derivada de *E. coli* K12, posee auxotrofia a los aminoácidos

prolina y metionina; así como resistencia al antibiótico rifampicina, características adquiridas por mutaciones espontáneas. La cepa se caracteriza por tener una sensibilidad elevada a ciprofloxacina.

3. *E. coli* J53-3 pUCP20: J53-3 transformada con el vector pUCp20, se empleó como control negativo en ensayos de susceptibilidad.
4. *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*): J53-3 transformada con el plásmido recombinante pUC_*crpP* (Chávez-Jacobo y col., 2018).
5. *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂): esta cepa contiene el plásmido recombinante pUC_*crpP*₂₉₈₂ (posee un gen *crpP* de un aislado clínico de *K. pneumoniae* homólogo a *crpP* de pUM505) (Chávez-Jacobo y col., 2019).
6. *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄): esta cepa contiene un plásmido recombinante pUC_*crpP*₂₄₂₄ (posee un gen *crpP* de un aislado clínico de *E. coli* homólogo a *crpP* de pUM505) (Chávez-Jacobo y col., 2019).

7.3 Electroforesis en geles de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1% (p/v) disolviendo 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE (Tris-acetato 0.04 M (pH 7.5) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM (pH 8.0), se calentó la mezcla hasta la completa disolución de la agarosa, se dejó enfriar a aproximadamente 60 °C, se vertió la solución en una charola con peine y se dejó solidificar a temperatura ambiente por aproximadamente 45 min.

Posteriormente, el gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se cubrió con buffer TAE, se mezclaron las muestras de ADN con buffer de carga 6X en una proporción 5:1, se cargaron los pozos del gel junto con un marcador de peso molecular de ADN, y se aplicó un voltaje de 120 V durante 30–45 min, hasta observar una adecuada separación de las bandas.

Una vez finalizado el corrimiento se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml, el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se documentó la imagen mediante un sistema de captura digital.

7.4 Oligonucleótidos

Se empleó un par de oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia del plásmido pUM505 para amplificar al gen *crpP* (Chávez-Jacobo y col., 2018); así como un par de oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia cromosómica de la cepa *E. coli* J53-3 para amplificar al gen *gyrA* (**Tabla 1**).

7.5 Lisis alcalina para el aislamiento de plásmidos

Se incubaron cultivos de las cepas de estudio crecidas en tubos con 4ml de LB de por 18 a 20 h a 37 °C, se centrifugó por 2 min a 12,000 rpm para generar una pastilla celular y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 100 µl de la solución de STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM), se resuspendió la pastilla y se añadieron 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló en vortex y se incubó por 5 min a 37 °C, se añadieron 200 µl de la solución de lisis (NaOH 0.1 N, SDS 1%) se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min, posteriormente se añadieron 150 µl de la solución de acetato de potasio (100 ml: acetato de potasio 5 M: 60 ml; ácido acético glacial: 11.5 ml y agua destilada: 28.5 ml) y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en diferentes tubos, se añadió un volumen de la solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubó por 30 min a -80 °C. Se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm se decantó el sobrenadante y lavó 2 veces con etanol al 70% (v/v), se secó la pastilla y se resuspendió en buffer TE en un rango de 20-50 µl, se almacenó el ADN a -20 °C (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados

Gen	oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Tamaño de producto (pb)
<i>crpP</i>	Dirorf131	ACGAGGGATCCTGTGTCAAAG	198
	Revorf131	AGCGGGATCAAGCTTAAATCGA	
<i>gyrA</i>	OD <i>gyrA</i>	GAGCGACCTTGCGAGAGAAA	2623
	OR <i>gyrA</i>	TTCTTCTTCTGGCTCGTCGT	

Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, donde Dir y OD indican directo, Rev y OR indican reverso. También es indicado el tamaño del producto esperado (pb).

7.6 Extracción de ADN total

La extracción de ADN genómico total se realizó mediante el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). Se incubó la cepa bacteriana en 5 ml de medio LB o CN durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, el cultivo se centrifugó por 2 min a 12,000 rpm para obtener una pastilla celular, se decantó el sobrenadante y se añadió 1.0 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), se resuspendió la pastilla mediante vortex y se centrifugó nuevamente, desechando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 450 µl de buffer TE y se añadieron 20 µl de lisozima (10 mg/ml), mezclando suavemente e incubando por 30 min a 37 °C. Después se añadieron 25 µl de pronasa (20 mg/ml) y se incubó por 15 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 50 µl de SDS al 10%, se mezcló suavemente y se incubó por 30 min a 37 °C. Se añadieron 100 µl de NaCl 5 M, se mezcló por inversión y se agregaron 100 µl de la solución CTAB/NaCl (CTAB 10% y NaCl 0.7 M), incubándose nuevamente por 10 min a 65 °C.

Tras la lisis, se añadió un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm. La fase acuosa se recuperó cuidadosamente y se transfirió a un tubo nuevo, donde se lavó 2 veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y nuevamente cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), posteriormente se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se dejó reposar por 10 min para la precipitación del ADN. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó tres veces con 1 ml de etanol al 70%, vortexeando y centrifugando por 5 min en cada lavado. Finalmente, la pastilla se dejó secar y se

resuspendió en 25–100 µl de buffer TE. Se añadieron 5 µl de RNasa y se incubó por 30 min a 37 °C, inactivando posteriormente la enzima mediante incubación a 65 °C durante 15 min. El ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, cargando 2–5 µl de cada muestra y corriendo el gel a 120 V.

7.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Para las reacciones de PCR que utilizaron ADN genómico como molde, se emplearon 100 ng de ADN por reacción, en el caso de las PCR realizadas con ADN plasmídico, se añadieron 0.5 µl de la extracción alcalina como ADN molde, los oligonucleótidos directos y reversos se añaden a una concentración de 1 µM, se utilizó reactivo Master Mix (Promega) que contiene *taq* polimerasa, al cofactor MgCl₂ así como dNTP's todo a concentraciones óptimas, ajustado todo a un volumen final de 10 µl. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Para el gen *crpP* se utilizaron oligonucleótidos Dirorf131 y Revorf131 (**Tabla 1**). La reacción comenzó con la desnaturalización por un tiempo de 5 min a 95 °C, después se sometió la mezcla a 30 ciclos de desnaturalización (95 °C y 30 s) alineamiento (55 °C y 30 s) y extensión (72 °C y 30 s), seguido por una extensión final de 5 min (Chávez-Jacobo y col., 2018).

Para el gen *gyrA* se utilizaron los oligonucleótidos OD *gyrA* y OR *gyrA* (**Tabla 1**). La reacción comenzó con la desnaturalización por un tiempo de 5 min a 95 °C, después se sometió la mezcla a 30 ciclos de desnaturalización (95 °C y 30 s), alineamiento

(55 °C y 30 s) y extensión (72 °C y 2 min 50 s), seguido por una extensión final de 5 min.

7.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a ciprofloxacina

La determinación de la CMI a ciprofloxacina para las cepas de estudio se realizó haciendo uso de *E. coli* ATCC 29522 para validar los resultados obtenidos del ensayo.

La CMI a ciprofloxacina se determinó en placas de agar nutritivo con diferentes concentraciones de ciprofloxacina y empleando un replicador Steers. Previamente, se crecieron cultivos de cada una de las cepas en 4 ml de CN incubando durante la noche a 37 °C. Una vez llegado a término se determinó la absorbancia a 590 nm de longitud de onda del cultivo para ajustar dicha absorbancia del cultivo a 0.8, posteriormente se hizo una dilución 1:100 y se inoculó en las placas de agar nutritivo, se incubó por 24 h a 37 °C y se evaluó el crecimiento pasado ese tiempo.

7.9 Inducción y cuantificación de mutantes resistentes a quinolonas

Para la obtención y selección de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina se prepararon cultivos en 4ml de CN de las cepas de estudio y posteriormente se cuantificó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada cultivo mediante la absorbancia leída a una longitud de onda de 590 nm. Se inocularon placas de AN con la concentración inhibitoria de ciprofloxacina (previamente determinada por CMI) con $(4 \pm 1.2 \times 10^7)$ UFC/ml. Las placas de AN se incubaron durante 32 h a 37 °C, posteriormente se contó el número de colonias obtenidas.

7.10 Determinación de la frecuencia de mutación

La frecuencia de mutación de las cepas analizadas fue determinada contabilizando número de colonias que crecieron en el medio de selección con respecto al número total de bacterias inoculadas en el medio al inicio del ensayo. El número total de bacterias del cultivo empleado para la mutagénesis se determinó por el conteo de las UFC por ml del cultivo. La concentración bacteriana del cultivo se estimó mediante comparación de la OD del cultivo con el estándar de McFarland en donde se considera una concentración de 1×10^8 UFC/ml para una OD de 0.5, como referencia indirecta de las UFC del cultivo.

Con el fin de conocer el efecto que tiene el nivel de susceptibilidad conferido por las diferentes proteínas CrpP se determinó la frecuencia de mutación para cada cepa de estudio mediante la siguiente ecuación:

$$(f) = \frac{m}{N}$$

Donde:

- f = frecuencia de mutación
- m = número de mutantes obtenidas
- N = número de células iniciales totales

7.11 Caracterización de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina

Las colonias recuperadas de los ensayos de selección fueron caracterizadas fenotípicamente mediante su crecimiento en placas de medio M9, medio M9 suplementado con los aminoácidos prolina y metionina, así como también placas de

agar nutritivo suplementadas con rifampicina. Se emplearon como controles a las cepas de *E. coli* J53-3, *E. coli* (pUC_*crp*P), *E. coli* (pUC_*crp*P₂₉₈₂) y *E. coli* (pUC_*crp*P₂₄₂₄).

7.12 Secuenciación y análisis del gen *gyrA*.

Utilizando el ADN obtenido por CTAB de las colonias altamente resistentes a ciprofloxacina el gen *gyrA* fue amplificado por PCR. Los productos de amplificación se enviaron a la compañía ElimBioserch para su secuenciación empleando los oligonucleótidos correspondientes. Una vez obtenidas las secuencias estas fueron analizadas empleando el software SnapGene y NCBI BLAST y se compararon con las secuencias del gen *gyrA* silvestre.

7.13 Concentración de prevención de aparición de mutantes (CPM)

La CPM se determinó empleando inóculos bacterianos crecidos a una concentración de 1×10^9 – 10^{10} UFC/ml en tubos 2 ml de CN.

Alícuotas de 1 ml de medio centrifugado, decantado y resuspendido en 100 µl de CN se sembraron sobre placas de agar suplementadas con concentraciones crecientes de ciprofloxacina. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24–48 h. La CPM se estableció como la menor concentración de antibiótico en la que no se observó crecimiento bacteriano.

8. Resultados

8.1 Caracterización molecular de las cepas de estudio

Con el propósito de realizar la caracterización de las cepas de estudio primero se llevó a cabo el aislamiento del ADN plasmídico, seguido de amplificación de genes *crpP*. Los resultados mostraron que las cepas *E. coli* pUCP20, *E. coli* (pUC_*crpP*), *E. coli* (pUC_*crpP*₂₉₈₂) y *E. coli* (pUC_*crpP*₂₄₂₄) poseen plásmidos cuyas bandas de ADN miden aproximadamente el tamaño esperado (**Figura 8 A**). El corrimiento electroforético del ADN aislado mostro una banda de aproximadamente 3.8 kb para *E. coli* pUCP20, y una banda de ~4 kb para los plásmidos recombinantes pUC_*crpP*, pUC_*crpP*₂₉₈₂ y pUC_*crpP*₂₄₂₄. Este resultado indica que las cepas de estudio poseen plásmidos con tamaño predicho. Además, se realizó la amplificación de los genes *crpP* por PCR empleando el ADN plasmídico de las cepas. Los resultados mostraron bandas de amplificación de PCR de ~200 pb, tamaño predicho para la amplificación de un fragmento de los genes *crpP* (**Figura 8 B**). Estos resultados indican que los plásmidos aislados de las cepas de estudio poseen clonados a los genes *crpP*. En conjunto estos datos confirman que las cepas de estudios corresponden a las transformantes de *E. coli* J53-3 con plásmidos recombinantes con los genes *crpP*.

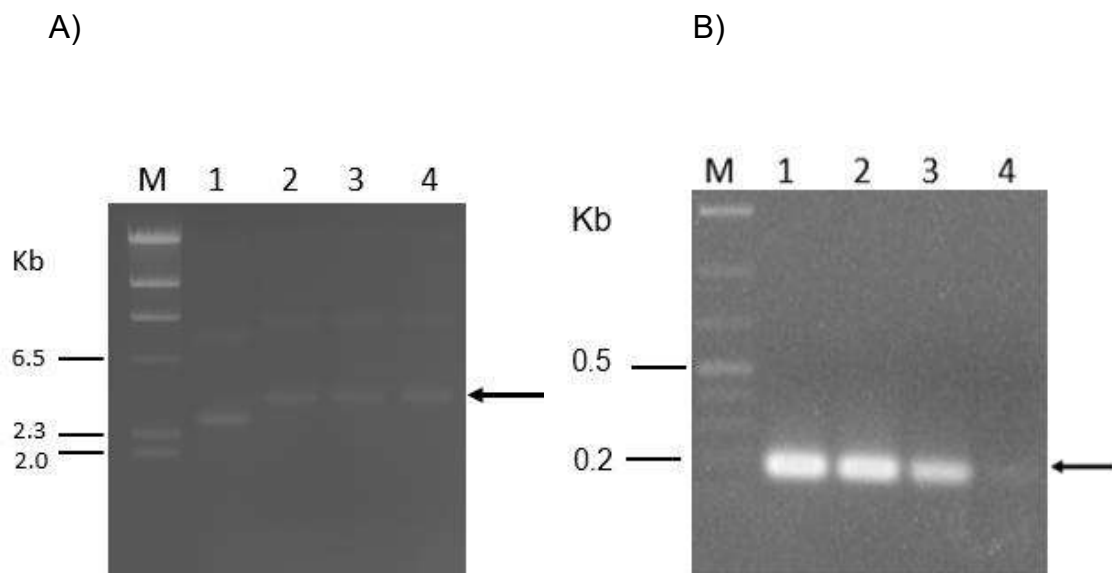


Figura 8. Aislamiento de ADN plasmídico y análisis por PCR de los genes *crpP*.

A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de aislamiento plasmídico de las cepas de estudio, carril M. marcador Lambda *Hind*III; carril 1 ADN plasmídico de *E. coli* (pUCP20); carril 2 ADN plasmídico de *E. coli* (pUC_*crpP*); carril 3 ADN plasmídico de *E. coli* (pUC_*crpP*₂₉₈₂); carril 4 ADN plasmídico de *E. coli* (pUC_*crpP*₂₄₂₄); la flecha indica aproximadamente 4 kb. **B)** Fotografía de productos de PCR en un gel de agarosa al 1% utilizando plásmido como ADN molde, carril M es el marcador ADN de escalera de 1 kb GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), carril 1 *crpP*₂₄₂₄; carril 2 *crpP*₂₉₈₂; carril 3 *crpP*; carril 4 control negativo pUCP20; flecha indica aproximadamente 200 pb.

8.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para determinar la concentración de ciprofloxacina a la cual las cepas de estudio no crecen se realizó la determinación de la CMI como se describe en materiales y métodos. Los resultados mostraron que las cepas de *E. coli* (pUC_*crpP*) y *E. coli* (pUC_*crpP*₂₄₂₄) tuvieron un valor de 0.04 µg/ml de CMI, mientras que la cepa de *E. coli* (pUC_*crpP*₂₉₈₂) obtuvo un valor CMI de 0.05 µg/ml (**Tabla 2**). En este ensayo se empleó a la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control del ensayo, la cual mostró como se esperaba una CMI de 0.005 µg/ml de ciprofloxacina, mientras que la cepa de *E. coli* J53-3 mostro un CMI de 0.03 µg/ml. Estos resultados concuerdan con lo esperado, confirmando que la cepa de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) presenta menor susceptibilidad a ciprofloxacina en comparación con *E. coli* J53-3; cuya susceptibilidad en comparación a la cepa de *E. coli* (pUC_*crpP*₂₉₈₂) es mayor, dado a que esta última posee mayor resistencia al antibiótico en comparación con las otras cepas. Las cepas de *E. coli* J53-3, *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) y *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄) fueron consideradas como cepas silvestres y empleadas para la realización de ensayos de inducción de selección de colonias con resistencia incrementada a ciprofloxacina.

Tabla 2. CMI a ciprofloxacina obtenido para las cepas de estudio.

Cepas	CMI (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.005
<i>E. coli</i> J53-3	0.03
<i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20)	0.03
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i>)	0.04
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₉₈₂)	0.05
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₄₂₄)	0.04

8.3 Efecto de los genes *crpP* homólogos en la selección de colonias con resistencia a ciprofloxacina incrementada

Para evaluar el efecto de la presencia de los genes *crpP* en la generación de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina, las cepas *E. coli* J53-3, *E. coli* J53-3 (pUCP20), *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) y *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄) se cultivaron en placas de CN suplementadas con la concentración de ciprofloxacina correspondiente a aquella que inhibió su crecimiento, previamente determinada mediante ensayos de CMI. Para cada cepa se realizaron tres ensayos independientes, generándose un banco de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina para cada condición experimental. A partir de la cepa *E. coli* J53-3 se recuperaron 24 colonias. De manera muy similar, se obtuvieron 21 colonias a partir de la cepa *E. coli* J53-3 (pUCP20), lo que indica que el vector por sí solo no tiene un efecto sobre la selección o aparición de colonias resistentes al antibiótico. En contraste, al cultivar la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) en placas de AN suplementadas con 0.04 µg/ml de ciprofloxacina, se obtuvieron 136 colonias. Este incremento en el número de colonias recuperadas sugiere que la presencia del gen *crpP* favorece la selección de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina. Asimismo, al cultivar la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) en placas de AN suplementadas con 0.05 µg/ml de ciprofloxacina, correspondiente a su respectiva CMI, se obtuvieron 302 colonias. De manera concordante, la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄), cuya CMI es equivalente a la de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), produjo 156 colonias. Este valor es más cercano al observado para la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) que a los obtenidos para la cepa control *E. coli* J53-3 o para la cepa *E.*

coli J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂), lo cual es consistente con el nivel de susceptibilidad conferido por las diferentes proteínas CrpP. Este resultado sugiere que las diferentes variantes de la proteína CrpP que confieren distintos niveles de susceptibilidad podría influir en la selección de colonias con resistencia incrementada a ciprofloxacina, lo cual se refleja en el número de colonias recuperadas en los ensayos de selección.

8.4 Determinación de la frecuencia de mutación

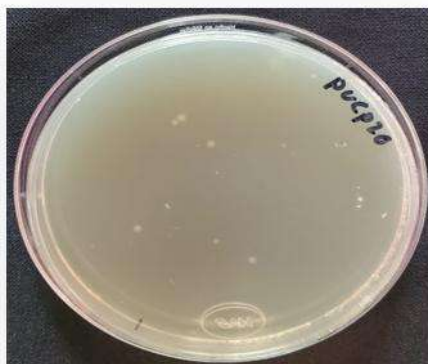
Una vez obtenidas las colonias (probables mutantes) con resistencia a ciprofloxacina aumentada de cada una de las cepas empleadas, se determinó la frecuencia de mutación empleado la formula descrita en materiales y métodos (**Tabla 3**).

Para la cepa *E. coli* J53-3 se obtuvo un total de 7 ± 2 (UFC) (**Figura 10**) de colonias recuperadas con resistencia incrementada a ciprofloxacina. Considerando la cantidad inicial de células ($\sim 4 \times 10^7$ células) y al sustituir estos valores en la ecuación correspondiente, se obtuvo una frecuencia de aparición de colonias con resistencia incrementada a ciprofloxacina de $1.75 \times 10^{-7} (\pm 3.53 \times 10^{-8})$. De manera similar, para la cepa *E. coli* J53-3 (pUCP20) la frecuencia de aparición fue de $2.0 \times 10^{-7} (\pm 4.21 \times 10^{-8})$, valor comparable al observado en la cepa control, lo que indica que la presencia del vector no modifica la frecuencia de aparición de colonias con resistencia incrementada al antibiótico. En contraste, para la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) la frecuencia de aparición fue de $1.09 \times 10^{-6} (\pm 2.25 \times 10^{-7})$, valor sustancialmente superior al observado en la cepa control. Este incremento corresponde aproximadamente a un orden de magnitud, lo que sugiere que la

presencia del gen *crpP* se asocia con una mayor frecuencia de aparición de colonias con resistencia incrementada a ciprofloxacina. Por otra parte, la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) presentó una frecuencia de aparición de $2.51 \times 10^{-6} (\pm 5.22 \times 10^{-7})$, valor superior al observado en la cepa control como al conferido por el gen *crpP* proveniente de pUM505. Finalmente, para la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄), la frecuencia de aparición fue de $2.51 \times 10^{-6} (\pm 5.22 \times 10^{-7})$, valor que también supera al control y a la frecuencia conferida por el gen *crpP* de pUM505. Estos datos en conjunto refuerzan la observación de que las diferencias entre el nivel de resistencia a ciprofloxacina conferido por las variantes de CrpP contribuye en la aparición de colonias con resistencia incrementada al antibiótico.

A)

E. coli J53-3 (pUCP20)



[CIP] ($\mu\text{g/ml}$)

0.03

B)

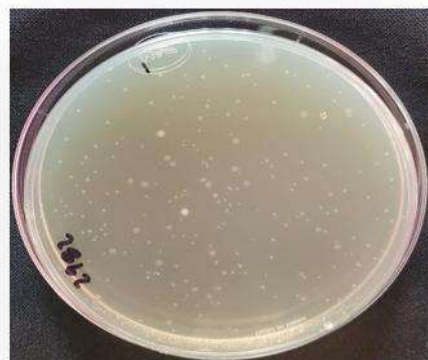
E. coli J53-3 (pUC_*crpP*)



0.04

C)

E. coli J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂)



[CIP] ($\mu\text{g/ml}$)

0.05

D)

E. coli J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄)



0.04

Figura 9. Generación de bancos de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina. Fotografías representativas de la generación de los bancos de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina utilizando a **A)** *E. coli* J53-3 (pUCP20), **B)** *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), **C)** *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂), **D)** *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄) como cepas silvestres, respectivamente.

Tabla 3. Frecuencia de mutación de las cepas de estudio.

Cepa	No. colonias (desviación estándar)	Frecuencia de mutación (desviación estándar)
<i>E. coli</i> J53-3	7 (± 2)	1.75×10^{-7} ($\pm 3.53 \times 10^{-8}$)
<i>E. coli</i> J53-3 pUCP20	7 (± 2)	2×10^{-7} ($\pm 3.53 \times 10^{-8}$)
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crp</i> P)	45 (± 9)	1.09×10^{-6} ($\pm 2.25 \times 10^{-7}$)
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crp</i> P ₂₉₈₂)	100 (± 16)	2.51×10^{-6} ($\pm 5.22 \times 10^{-7}$)
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crp</i> P ₂₄₂₄)	49 (± 9)	2.73×10^{-6} ($\pm 2.25 \times 10^{-7}$)

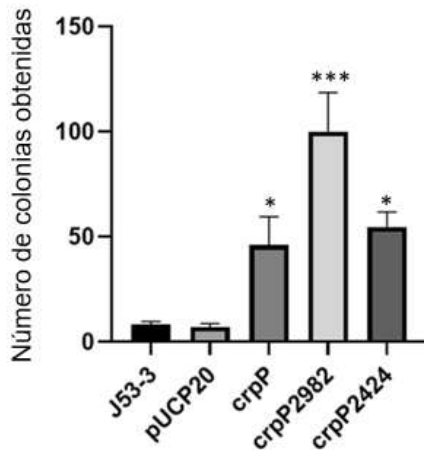


Figura 10. Número de colonias recuperadas y frecuencia de mutación. Número de colonias obtenidas en diferentes cepas y construcciones plasmídicas. La cepa *E. coli* J53-3 y el control *E. coli* J53-3 pUCP20 presentan un bajo número de colonias, mientras que la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) incrementa significativamente la formación de colonias, siendo más evidente en la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂), seguida de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄). Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Dunnett, comparando cada tratamiento contra el control. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.5 Caracterización del fenotipo de las colonias con resistencia a ciprofloxacina aumentada

Con el propósito de caracterizar los bancos de las colonias con resistencia a ciprofloxacina aumentada obtenidas a partir de cada una de las cepas de estudio, las colonias obtenidas fueron crecidas en medio M9.

La cepa de *E. coli* J53-3, cepa receptora de los plásmidos recombinantes, posee auxotrofia a metionina y prolina por lo que no es capaz de crecer en medio mínimo como M9, además de que es resistente a rifampicina. Los resultados mostraron que las colonias con resistencia a ciprofloxacina aumentada obtenidas de los bancos a partir de las cepas de estudio, aunque presentaron crecimiento en el agar nutritivo (**Figura 11 A**) (como era esperado), no presentaron crecimiento en medio M9 (**Figura 11 B**). El cultivo de las colonias en medio M9 suplementado con metionina y prolina, mostro el crecimiento de todas las colonias (**Figura 11 C**). Finalmente, las colonias con resistencia a ciprofloxacina aumentada mostraron crecimiento en medio suplementado con rifampicina (**Figura 11 D**). En conjunto estos datos indican que todas las colonias con resistencia a ciprofloxacina aumentada obtenidas provienen de las cepas de origen empleadas y no son contaminantes.

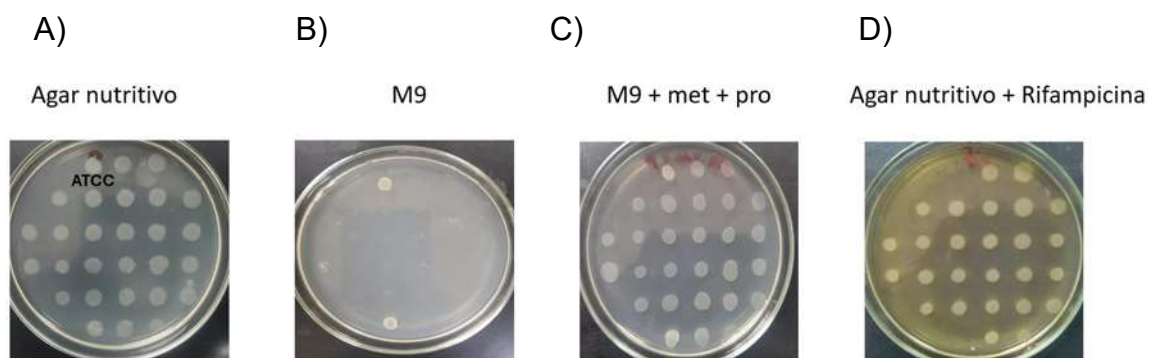


Figura 81. Caracterización fenotípica de las colonias recuperadas. Fotografías representativas de **A)** inoculación de cepas de estudio en agar nutritivo; **B)** en medio mínimo M9; **C)** medio M9 suplementada con metionina y prolina y **D)** en agar nutritivo suplementada con rifampicina. Como control se empleó a la cepa *E. coli* ATCC 29522 y la cepa silvestre de la que se deriva el banco de colonias evaluado.

8.6 Determinación del nivel de resistencia a ciprofloxacina de las colonias obtenidas

Se determinó la CMI de las colonias obtenidas en cada uno de los bancos de mutantes para conocer el nivel de resistencia a ciprofloxacina (**Tablas 4-8**).

Los resultados mostraron que todas las cepas derivadas de *E. coli* J53-3 obtenidas de los ensayos de selección presentan crecimiento a una concentración de ciprofloxacina de 0.03 µg/ml, la cual se determinó como mínima inhibitoria para *E. coli* J53-3, esto indica que todas las cepas recuperadas derivadas de *E. coli* J53-3 poseen menor susceptibilidad a ciprofloxacina. También se pudo observar que todas las colonias la obtenidas del banco de mutantes de la cepa silvestre de *E. coli* J53-3 (pUCP20) mostraron un nivel de CMI superior al descrito para la cepa silvestre que fue de 0.03 µg/ml; el comportamiento de incremento en la CMI a ciprofloxacina de cada banco de colonias obtenido en comparación a la cepa silvestre correspondiente fue observado también en los casos de las cepas portadoras de genes *crpP* y homólogos (**Figura 12**). Se elaboraron las curvas de distribución de la CMI a ciprofloxacina de cada banco de colonias generado (**Figura 13**), observando que la curva de distribución del CMI fue similar para las colonias obtenidas del banco de mutantes a partir de *E. coli* J53-3, mostrando un pico que distingue una población bacteriana que mostró una CMI menor a 1 µg/ml.

Se evaluó la distribución de colonias susceptibles, intermedias y resistentes en diferentes variantes de *E. coli* J53-3, de acuerdo con los puntos de corte de CMI establecidos por el CLSI. En la cepa base (*E. coli* J53-3), el 83.3 % de las colonias fueron clasificadas como susceptibles, mientras que el 16.66 % mostró un fenotipo

intermedio, sin detectarse colonias con resistencia de relevancia clínica (**Tabla 9**). De manera similar, en la cepa portadora del vector vacío *E. coli* J53-3 (pUCP20), se observó una proporción ligeramente mayor de colonias susceptibles (85.71 %) y un 14.28 % de colonias intermedias (**Tabla 10**). En las cepas transformadas con variantes del gen *crpP*, se mantuvo una tendencia general hacia la susceptibilidad. En *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), el 82.35 % de las colonias fueron susceptibles y el 17.64 % intermedias (**Tabla 11**). En contraste, la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) mostró una ligera variación, con un incremento en la proporción de colonias susceptibles (89.4 %) y una disminución en las intermedias (10.26 %), además de la aparición de una única colonia resistente (0.33 %), lo cual no se observó en las demás condiciones (**Tabla 12**). Por su parte, *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄) presentó un comportamiento similar a todos los demás bancos de colonias con resistencia incrementada evaluados, con 82.69 % de colonias susceptibles y 17.3 % intermedias (**Tabla 13**). En conjunto, los resultados indican que, bajo las condiciones evaluadas, la mayoría de las colonias se mantienen dentro del rango de susceptibilidad, con una fracción menor en la categoría intermedia y una presencia prácticamente nula de resistencia, incluso en las cepas transformadas con variantes del gen *crpP*.

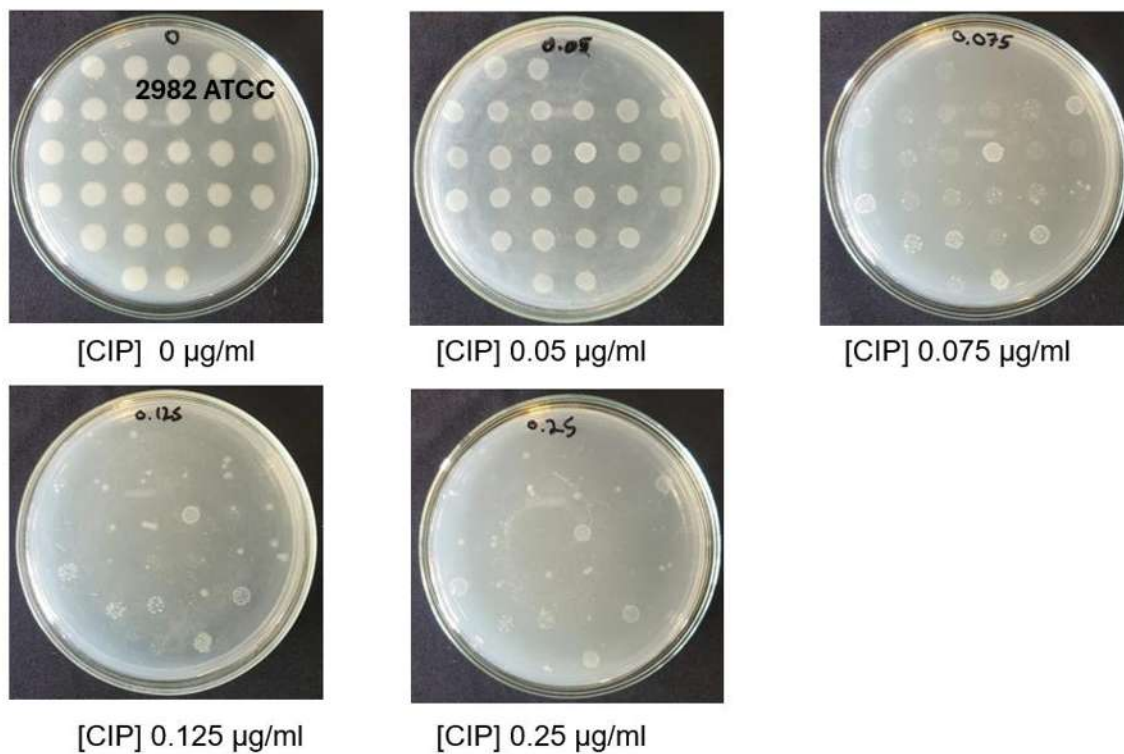


Figura 12. Determinación de la CMI de las colonias obtenidas en los bancos generados. Fotografía representativa de la determinación de la CMI de las colonias altamente resistentes a ciprofloxacina recuperadas de los ensayos de selección.

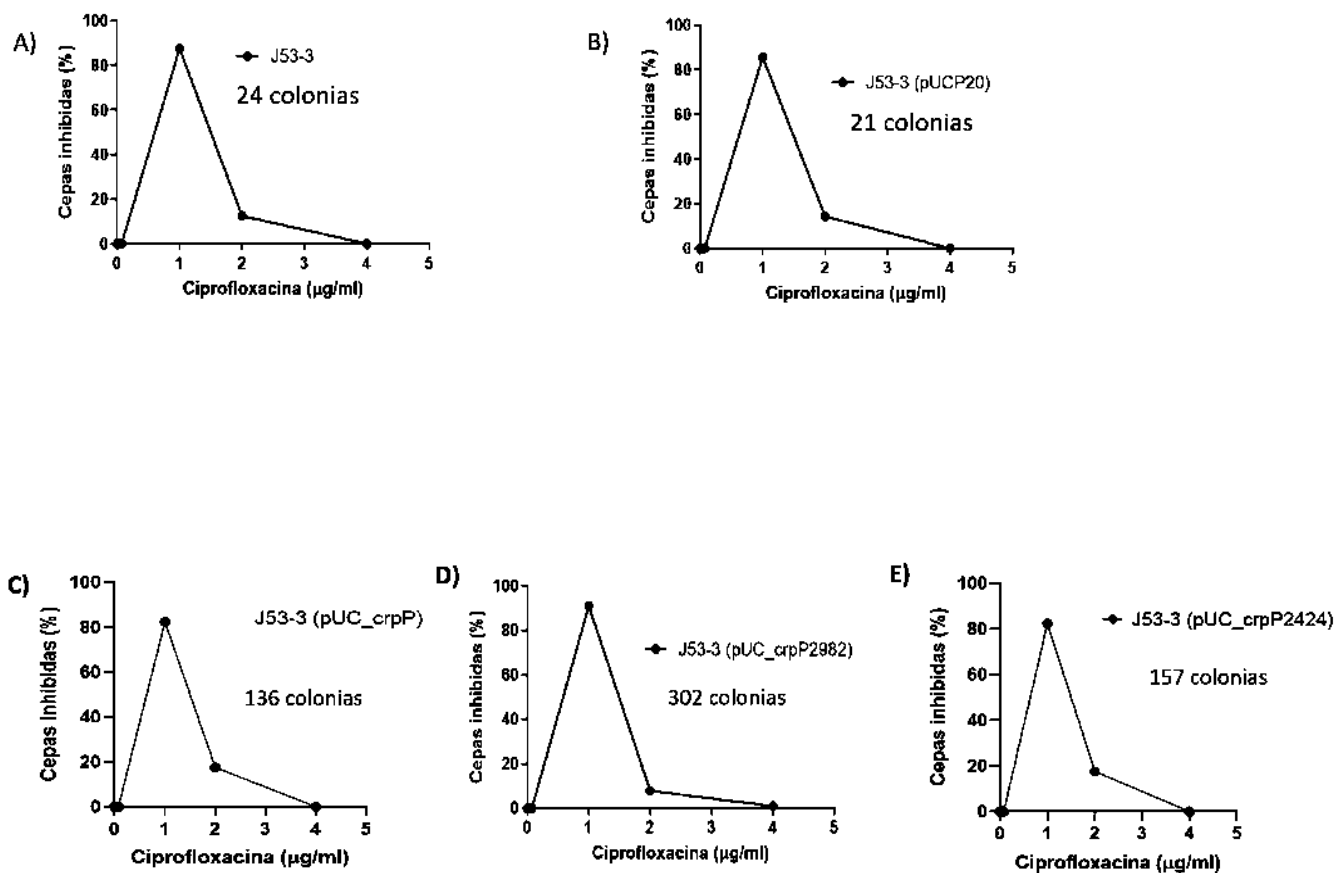


Figura 13. Distribución CMI de las colonias de los bancos obtenidos. Gráficas de distribución de la CMI a ciprofloxacina del banco obtenido a partir de **A)** *E. coli* J53-3; **B)** *E. coli* J53-3 (pUCP20); **C)** *E. coli* J53-3 (pUC_crpP); **D)** *E. coli* J53-3 (pUC_crpP₂₉₈₂) y **E)** *E. coli* J53-3 (pUC_crpP₂₄₂₄).

Tabla 4. CMI a ciprofloxacina de las colonias del banco derivado de *E. coli* J53-3.

No. Mutante	CMI (µg/ml)	No. Mutante	CMI (µg/ml)
1	1	13	1
2	2	14	1
3	1	15	1
4	1	16	0.5
5	2	17	1
6	0.5	18	2
7	2	19	1
8	1	20	0.5
9	0.5	21	0.5
10	0.5	22	1
11	1	23	1
12	1	24	1

Tabla 5. CMI a ciprofloxacina de las colonias del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUCP20).

No. Mutante	CMI (µg/ml)	No. Mutante	CMI (µg/ml)
1	1	12	1
2	0.5	13	1
3	0.5	14	0.5
4	0.5	15	0.5
5	0.5	16	0.5
6	0.5	17	2
7	0.5	18	1
8	1	19	0.5
9	1	20	0.5
10	2	21	1
11	2		

Tabla 6. CMI a ciprofloxacina de las colonias del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUC_crpP).

No. Mutante	CMI (µg/ml)	No. Mutante	CMI (µg/ml)
1	0.5	69	0.5
2	0.5	70	0.5
3	0.125	71	0.5
4	0.5	72	2
5	2	73	0.5
6	0.5	74	1
7	0.5	75	0.5
8	0.5	76	2
9	2	77	1
10	0.5	78	2
11	0.5	79	2
12	0.5	80	0.125
13	2	81	0.125
14	0.125	82	2
15	0.125	83	0.5
16	2	84	0.5
17	0.5	85	0.5
18	0.125	86	2
19	0.5	87	1
20	0.5	88	2
21	0.125	89	0.5
22	0.5	90	0.5
23	0.125	91	2

24	0.5	92	1
25	0.125	93	1
26	2	94	0.5
27	0.125	95	2
28	0.5	96	0.5
29	0.5	97	0.5
30	2	98	1
31	0.5	99	0.5
32	0.5	100	0.5
33	0.5	101	1
34	1	102	2
35	0.5	103	2
36	0.5	104	0.5
37	0.5	105	2
38	0.5	106	0.5
39	0.5	107	2
40	0.5	108	0.5
41	2	109	0.5
42	0.5	110	2
43	0.5	111	2
44	0.5	113	0.5
45	0.5	114	0.5
46	0.5	115	0.5
47	0.5	116	1
48	0.5	117	0.5
49	0.5	118	0.125

50	0.5	119	1
51	0.5	120	0.5
52	0.5	121	0.5
53	2	122	0.5
54	0.5	123	0.5
55	0.125	124	0.5
56	0.5	125	2
57	0.125	126	1
58	0.5	127	0.5
59	0.5	128	0.5
60	0.5	129	0.125
61	1	130	0.5
62	0.5	131	1
63	0.5	132	0.5
64	1	133	0.5
65	2	134	1
66	0.5	135	0.5
67	0.125	136	0.125
68	0.125		

Tabla 7. CMI a ciprofloxacina de las colonias del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUC_crpP₂₉₈₂).

No. Mutante	CMI (µg/ml)	No. Mutante	CMI (µg/ml)
1	0.5	153	0.25
2	0.5	154	0.25
3	1	155	0.25
4	0.5	156	0.25
5	0.5	157	0.5
6	0.5	158	0.5
7	0.25	159	1
8	0.5	160	0.5
9	0.25	161	0.5
10	0.25	162	0.25
11	0.25	163	0.25
12	1	164	0.25
13	0.25	165	0.5
14	0.5	166	0.5
15	0.5	167	0.5
16	0.5	168	0.5
17	1	169	0.5
18	0.25	170	1
19	0.5	171	0.5
20	0.5	172	2
21	0.5	173	0.5
22	1	174	0.5
23	0.5	175	0.5

24	2	176	0.5
25	1	177	0.5
26	1	178	0.5
27	1	179	0.5
28	0.25	180	0.5
29	0.5	181	2
30	0.5	182	0.5
31	0.5	183	0.5
32	0.5	184	2
33	0.25	185	0.5
34	1	186	0.25
35	0.5	187	0.25
36	1	188	0.5
37	0.5	189	0.5
38	0.25	190	0.5
39	2	191	0.5
40	1	192	0.5
41	0.5	193	0.25
42	0.5	194	2
43	0.5	195	1
44	0.5	196	0.5
45	0.5	197	0.5
46	0.25	198	2
47	0.5	199	1
48	2	200	1
49	0.5	201	0.5

50	0.5	202	0.5
51	2	203	0.5
52	0.25	204	0.5
53	0.25	205	2
54	0.5	206	0.25
55	0.5	207	1
56	2	208	2
57	2	209	0.5
58	0.25	210	0.5
59	0.5	211	1
60	2	212	1
61	0.5	213	1
62	0.5	214	1
63	1	215	0.25
64	0.5	216	0.25
65	0.5	217	0.5
66	0.25	218	1
67	2	219	0.5
68	0.5	220	1
69	2	221	1
70	0.5	222	2
71	0.5	223	2
72	0.5	224	0.25
73	1	225	0.5
74	0.5	226	2
75	0.5	227	0.5

76	0.5	228	0.5
77	0.25	229	2
78	2	230	0.5
79	0.5	231	1
80	0.5	232	1
81	0.25	233	0.25
82	0.5	234	2
83	1	235	0.5
84	0.5	236	0.5
85	0.5	237	0.5
86	0.5	238	1
87	1	239	0.5
88	0.5	240	0.5
89	0.5	241	0.5
90	0.5	242	0.25
91	2	243	0.25
92	0.5	244	1
93	0.5	245	0.5
94	1	246	0.5
95	0.5	247	0.5
96	2	248	0.5
97	0.5	249	0.5
98	0.25	250	0.5
99	0.5	251	0.5
100	0.5	252	0.5
101	1	253	1

102	0.5	254	0.25
103	0.25	255	0.25
104	0.25	256	0.5
105	0.5	257	0.25
106	0.5	258	0.5
107	0.5	259	0.5
108	0.5	260	2
109	0.5	261	1
110	0.5	262	1
111	1	263	1
113	1	264	1
114	1	265	0.5
115	0.5	266	0.5
116	0.5	267	0.5
117	0.5	268	0.5
118	0.5	269	0.5
119	2	270	0.25
120	1	271	0.25
121	2	272	0.25
122	0.5	273	0.5
123	0.5	274	0.5
124	0.5	275	0.5
125	0.5	276	1
126	0.5	277	1
127	0.5	278	2
128	0.25	279	0.25

129	0.5	280	1
130	0.5	281	1
131	0.5	282	0.5
132	0.5	283	0.5
133	2	284	0.5
134	0.5	285	0.5
135	0.5	286	0.25
136	0.5	287	0.25
137	0.5	288	0.5
138	0.25	289	0.5
139	0.5	290	0.5
140	1	291	2
141	0.5	292	0.5
142	2	293	0.5
143	0.5	294	0.5
144	1	295	0.25
145	0.5	296	0.25
146	0.5	297	0.5
147	0.5	298	4
148	1	299	0.5
149	0.5	300	0.5
150	0.5	301	0.5
151	0.5	302	0.5
152	2		

Tabla 8. CMI a ciprofloxacina de las colonias del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUC_*crp*P₂₄₂₄).

No. Mutante	CMI (µg/ml)	No. Mutante	CMI (µg/ml)
1	0.25	79	0.5
2	0.25	80	0.5
3	0.5	81	1
4	0.5	82	0.5
5	0.5	83	2
6	2	84	0.5
7	0.25	85	0.5
8	2	86	2
9	0.5	87	2
10	2	88	2
11	1	89	1
12	1	90	1
13	0.25	91	0.25
14	1	92	0.5
15	1	93	2
16	0.5	94	0.5
17	0.5	95	0.5
18	0.5	96	1
19	2	97	0.25
20	0.5	98	0.5
21	0.5	99	0.5
22	0.5	100	2
23	2	101	0.5

24	2	102	1
25	1	103	1
26	0.25	104	2
27	0.25	105	1
28	0.5	106	0.5
29	0.5	107	0.5
30	0.5	108	0.5
31	0.5	109	0.5
32	2	110	0.5
33	0.5	111	0.5
34	0.5	113	0.5
35	2	114	2
36	1	115	2
37	0.5	116	0.5
38	0.25	117	1
39	0.5	118	0.5
40	0.5	119	0.5
41	2	120	0.25
42	0.5	121	0.25
43	2	122	0.25
44	1	123	0.5
45	1	124	2
46	1	125	0.5
47	0.5	126	1
48	2	127	1
49	0.25	128	0.5

50	2	129	0.5
51	0.5	130	0.5
52	0.5	131	0.5
53	0.5	132	2
54	0.25	133	0.5
55	1	134	0.25
56	2	135	1
57	0.25	136	0.25
58	0.5	137	1
59	0.5	138	2
60	0.5	139	1
61	0.5	140	1
62	0.5	141	0.5
63	1	142	0.5
64	1	143	0.5
65	2	144	0.25
66	0.5	145	0.5
67	0.5	146	0.5
68	0.5	147	0.5
69	2	148	0.5
70	0.5	149	0.5
71	0.25	150	1
72	0.5	151	0.5
73	0.5	152	0.5
74	1	153	0.5
75	1	154	0.5

76	0.5	155	0.25
77	2	156	0.25
78	1	157	0.25

Tabla 9. Número de colonias susceptibles, intermedias o resistentes del banco derivado de *E. coli* J53-3 según valores CMI reportados por el CLSI.

Clasificación	No. colonias	Porcentaje (%)
Susceptible: $\leq 1,0$ ($\mu\text{g/ml}$)	20	83.3
Intermedio: 2 ($\mu\text{g/ml}$)	4	16.66
Resistente: ≥ 4 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0
Total	24	100

Tabla 10. Número de colonias susceptibles, intermedias o resistentes de *E. coli* J53-3 (pUCP20) según valores CMI reportados por el CLSI.

Clasificación	No. colonias	Porcentaje (%)
Susceptible: $\leq 1,0$ ($\mu\text{g/ml}$)	18	85.71
Intermedio: 2 ($\mu\text{g/ml}$)	3	14.28
Resistente: ≥ 4 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0
Total	21	100

Tabla 61. Número de colonias susceptibles, intermedias o resistentes de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) según valores CMI reportados por el CLSI.

Clasificación	No. colonias	Porcentaje (%)
Susceptible: $\leq 1,0$ ($\mu\text{g/ml}$)	112	82.35
Intermedio: 2 ($\mu\text{g/ml}$)	24	17.64
Resistente: ≥ 4 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0
Total	136	100

Tabla 72. Número de colonias susceptibles, intermedias o resistentes de *E. coli* J53-3 (pUC_*crp*P₂₉₈₂) según valores CMI reportados por el CLSI.

Clasificación	No. colonias	Porcentaje (%)
Susceptible: $\leq 1,0$ ($\mu\text{g/ml}$)	270	89.4
Intermedio: 2 ($\mu\text{g/ml}$)	31	10.26
Resistente: ≥ 4 ($\mu\text{g/ml}$)	1	0.33
Total	302	100

Tabla 13. Numero de colonias susceptibles, intermedias o resistentes de *E. coli* J53-3 (pUC_*crp*P₂₄₂₄) según valores CMI reportados por el CLSI.

Clasificación	No. colonias	Porcentaje (%)
Susceptible: $\leq 1,0$ ($\mu\text{g/ml}$)	129	82.69
Intermedio: 2 ($\mu\text{g/ml}$)	27	17.3
Resistente: ≥ 4 ($\mu\text{g/ml}$)	0	0
Total	156	100

8.7 Determinación de la resistencia a levofloxacin y gentamicina de las colonias obtenidas de los bancos

Dada a la similitud química entre ciprofloxacina y levofloxacina se determinó la CMI de algunas colonias de los bancos de mutantes a levofloxacina (**Tabla 14**). Los resultados mostraron que las colonias analizadas del banco de mutantes de la cepa de *E. coli* J53-3 (**Tabla 15**) fueron menos susceptibles a levofloxacina mostrando un valor de CMI de 1.2 µg/ml en comparación con la cepa silvestre *E. coli* J53-3 que mostró una CMI de 0.04 µg/ml, indicando que estas colonias además de haber incrementado su resistencia a ciprofloxacina incrementaron su resistencia a otra quinolona. Resultados similares fueron observados para las colonias analizadas de los bancos de *E. coli* J53-3 (pUCP20), *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) y *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄) (**Tablas 16-19**). Estos datos sugieren que el mecanismo adquirido por las colonias caracterizadas para incrementar su resistencia a ciprofloxacina también participa en la resistencia a otras quinolonas. Con el propósito de evaluar si el incremento de resistencia observado en las colonias caracterizadas es específico para quinolonas o permite la resistencia a otros antibióticos se determinó la CMI a gentamicina, un antibiótico aminoglucósido. Los resultados mostraron que las colonias altamente resistentes a ciprofloxacina analizadas poseen el mismo valor CMI a gentamicina que las cepas silvestres de las que provienen, sugiriendo que el mecanismo que confiere el aumento en la resistencia a las quinolonas en las colonias evaluadas es específico para quinolonas.

Tabla 14. CMI a levofloxacinina de las cepas control y silvestres.

Cepas control	CMI Lev (µg/ml)	CMI GM (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.02	2
<i>E. coli</i> J53-3	0.04	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i>)	0.04	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₉₈₂)	0.04	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>crpP</i> ₂₄₂₄)	0.04	2

Lev, levofloxacinina; GM, gentamicina.

Tabla 85. CMI a levofloxacin de las colonias seleccionadas del banco derivado de *E. coli* J53-3.

Colonias recuperadas	CMI Lev (µg/ml)	CMI GM (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.02	2
<i>E. coli</i> J53-3 colonia 1	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 colonia 2	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 colonia 3	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 colonia 4	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 colonia 5	1.2	2

Lev, levofloxacin; GM, gentamicina.

Tabla 16. CMI a levofloxacin de las colonias seleccionadas del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUCP20).

Colonias recuperadas	CMI Lev (µg/ml)	CMI GM (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.02	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20) colonia 1	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20) colonia 2	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20) colonia 3	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20) colonia 4	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUCP20) colonia 5	1.2	2

Lev, levofloxacin; GM, gentamicina.

Tabla 17. CMI a levofloxacin de las colonias seleccionadas del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUC_crpP).

Colonias recuperadas	CMI Lev (µg/ml)	CMI GM (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.02	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP) colonia 1	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP) colonia 2	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP) colonia 3	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP) colonia 4	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP) colonia 5	1.2	2

Lev, levofloxacin; GM, gentamicina.

Tabla 98. CMI a levofloxacin de las colonias seleccionadas del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUC_crpP₂₉₈₂).

Colonias recuperadas	CMI Lev (µg/ml)	CMI GM (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.02	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₉₈₂) colonia 1	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₉₈₂) colonia 2	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₉₈₂) colonia 3	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₉₈₂) colonia 4	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₉₈₂) colonia 5	1.2	2

Lev, levofloxacin; GM, gentamicina.

Tabla 19. CMI a levofloxacin de las colonias seleccionadas del banco derivado de *E. coli* J53-3 (pUC_crpP₂₄₂₄).

Colonias recuperadas	CMI Lev (µg/ml)	CMI GM (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.02	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄) colonia 1	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄) colonia 2	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄) colonia 3	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄) colonia 4	1.2	2
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_crpP ₂₄₂₄) colonia 5	1.2	2

Lev, levofloxacin; GM, gentamicina.

8.8 Efecto de la proteína CrpP en el umbral de aparición de mutantes

La selección de mutantes resistentes a las quinolonas se produce exclusivamente en un rango específico de concentraciones denominada ventana de selección, cuya concentración inferior es cercana al valor de la CMI, mientras que la concentración superior se sitúa en el límite para la aparición de mutantes resistentes en placas de selección, denominado concentración de prevención de la aparición de mutantes resistentes o CPM (mutant prevention concentration, MPC). Se determinó la concentración de la ventana de selección para las transformantes de *E. coli* J53-3 con los genes *crpP*, así como la CPM. Los resultados mostraron que para *E. coli* J53-3 se obtuvieron colonias mutantes en una ventana de 0.03- 0.04 µg/ml de ciprofloxacina, pero a 0.05 µg/ml ya no hubo presencia de colonias, determinando así la concentración de 0.05 µg/ml como la CPM para esta cepa (**Figura 14**). En el caso de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) se obtuvieron colonias mutantes en una ventana de selección de 0.04 a 0.06 µg/ml, siendo 0.07 µg/ml la CPM (**Figura 14**), la concentración de la ventana de selección para la aparición de mutantes fue significativamente mayor en presencia del gen *crpP*. Cuando se empleó a la cepa de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂) la ventana de selección fue de 0.04- a 0.09 µg/ml y la CPM fue de 0.1 µg/ml (**Figura 14**), concentración superior a la observada para las cepas de *E. coli* J53-3 y *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*). Estos datos sugieren que el nivel de susceptibilidad conferida por las diferentes proteínas CrpP incrementa el rango de las concentraciones de la ventana de selección de mutantes y de la CPM, lo cual además concuerda con el número de colonias con resistencia incrementada a ciprofloxacina obtenidas con cada una de las cepas que poseen un gen *crpP*.

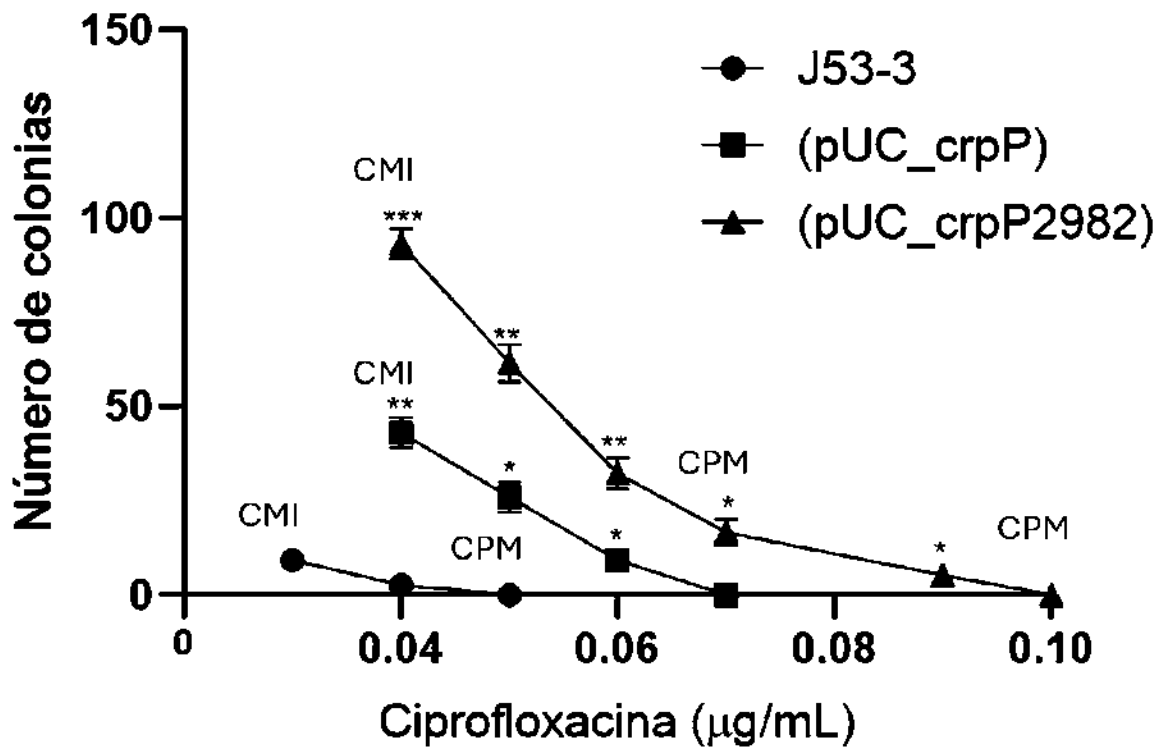


Figura 14. Concentración de ciprofloxacin de la ventana de selección de mutantes y de prevención de aparición de mutantes (CPM). Los datos representan la media $\pm$ DE (n=3). Se realizó un ANOVA de una vía para cada concentración seguida de la prueba de Tukey. $p < 0.05$ se consideró significativo.

8.9 Secuenciación gen *gyrA*

Se analizó la secuencia del gen *gyrA*, que codifica a la subunidad GyrA de la ADN girasa, en cuatro colonias altamente resistentes a ciprofloxacina del banco de mutantes de *E. coli* J53-3. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparados con la secuencia del gen *gyrA* de *E. coli* J53-3 de la base de datos del CNIB (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

Cuando se comparó la secuencia de la colonia denominada *E. coli* J53-3 mutante 1, cuyo valor CMI a ciprofloxacina fue de 1 µg/ml, con el gen silvestre *gyrA* de *E. coli* J53-3, se observó un cambio en el nucleótido de adenina de la posición 260 por guanina (**Figura 15**), lo que generó el cambio del codón GAC por GGC de la secuencia codificante que conduce a la sustitución del residuo de Asp 87 por Gly de GyrA (**Figura 16**). Por otro lado, la comparación de la secuencia del gen *gyrA* de la cepa silvestre de *E. coli* J53-3 con las secuencias obtenidas de cuatro colonias provenientes de *E. coli* J53-3 correspondientes a *E. coli* J53-3 mutante 2, *E. coli* J53-3 mutante 3 y *E. coli* J53-3 mutante 4, que tuvieron un CMI de 2 µg/ml, mostró una mutación puntual en el nucleótido guanina de la posición 241 por timina (**Figura 15**). Esta mutación tuvo como consecuencia el cambio del codón GGU por el codón UGU de la región codificante dando lugar a la sustitución del residuo de Gly 81 por Cis en la proteína GyrA (**Figura 16**). Estos datos sugieren que el aumento en la resistencia observada en las mutantes del banco de *E. coli* J53-3 analizadas se debe a una mutación en el gen *gyrA*.

```

E. coli J53-3      AAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCAT 240
E. coli J53-3 mutante 1 AAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCAT 240
E. coli J53-3 mutante 2 AAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCAT 240
E. coli J53-3 mutante 3 AAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCAT 240
E. coli J53-3 mutante 4 AAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCAT 240
*****

E. coli J53-3      GGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTAT 300
E. coli J53-3 mutante 1 TGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTAT 300
E. coli J53-3 mutante 2 TGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTAT 300
E. coli J53-3 mutante 3 GGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTAT 300
E. coli J53-3 mutante 4 TGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTAT 300
*****

```

Figura 15. Alineamiento de una región de los genes *gyrA* de las colonias del banco de *E. coli* J53-3. Se muestran el alineamiento de la región de los genes *gyrA* en donde ocurrió la mutación. Con asteriscos se indican los nucleótidos conservados y con recuadro en rojo los nucleótidos mutados en los genes *gyrA*.

```

E. coli J53-3      KAYKKSARVVGDVIGKYHPCDSAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNGFGSIDGDSAAAM 120
E. coli J53-3 mutante 1 KAYKKSARVVGDVIGKYHPCDSAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNGFGSIDGDSAAAM 120
E. coli J53-3 mutante 2 KAYKKSARVVGDVIGKYHPCDSAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNGFGSIDGDSAAAM 120
E. coli J53-3 mutante 3 KAYKKSARVVGDVIGKYHPCDSAVYGTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNGFGSIDGDSAAAM 120
E. coli J53-3 mutante 4 KAYKKSARVVGDVIGKYHPCDSAVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNGFGSIDGDSAAAM 120
*****

```

Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas GyrA de las colonias del banco de *E. coli* J53-3. Se muestra el alineamiento de las secuencias de las proteínas GyrA de las mutantes con la proteína GyrA de *E. coli* J53-3. Con asteriscos se indican los residuos idénticos de las proteínas GyrA y con punto los residuos conservados. Con un recuadro rojo se indica los aminoácidos sustituidos en las proteínas GyrA.

9. Discusión

El desarrollo de las fluoroquinolonas se originó a partir de modificaciones estructurales del ácido nalidíxico, un subproducto identificado durante la síntesis del medicamento antipalúdico cloroquina, el cual mostró actividad antimicrobiana moderada y de espectro reducido (Lesher y col., 1962). La optimización química de este compuesto condujo a la generación de las quinolonas de segunda generación y, posteriormente, a las fluoroquinolonas, caracterizadas por una mayor potencia antimicrobiana, mejor penetración celular y un espectro de acción ampliado frente a bacterias Gram negativas y positivas (Hooper y Jacoby, 2015).

Las fluoroquinolonas, incluyendo la ciprofloxacina, ejercen su efecto bactericida mediante la inhibición de las topoisomerasas tipo II, particularmente la ADN girasa y la topoisomerasa IV, estabilizando complejos de rotura ADN–enzima que conducen a daño cromosómico letal (Drlica y Zhao, 1997). En *E. coli*, la diana primaria de ciprofloxacina es la subunidad A de la ADN girasa, codificada por el gen *gyrA*, donde mutaciones puntuales en regiones específicas, QRDR, se asocian de manera consistente con incrementos en la CMI (Yoshida y col., 1990).

Los antecedentes de este trabajo indican que la resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* es el resultado de la interacción entre mecanismos cromosómicos y determinantes plasmídicos. Entre estos últimos, la proteína CrpP ha sido descrita como un mecanismo de resistencia de bajo nivel capaz de disminuir la susceptibilidad a ciprofloxacina mediante la modificación del antibiótico (Chávez-Jacobo y col., 2018).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la expresión del gen *crpP* y sus variantes homólogas en la susceptibilidad a ciprofloxacina y en la selección de mutantes con resistencia incrementada en *E. coli*. En particular, se buscó determinar si el nivel de resistencia basal conferido por estas proteínas influye en la frecuencia de aparición de colonias altamente resistentes y en la selección de mutaciones en genes diana como *gyrA*, bajo condiciones de presión antibiótica controlada.

El nivel de resistencia a ciprofloxacina conferido por *crpP* corresponde a un fenotipo de bajo nivel, caracterizado por incrementos mínimos en la CMI respecto a la cepa parental. Como punto de partida, la determinación de la CMI permitió establecer el nivel de susceptibilidad basal de cada cepa (**Tabla 2**). Como se esperaba, las cepas portadoras de los genes *crpP* mostraron un incremento en la CMI en comparación con la cepa control *E. coli* J53-3, la CMI de *E. coli* J53-3 a ciprofloxacina fue menor con respecto a la CMI de las cepas de *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*), *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₄₂₄) y *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*₂₉₈₂), pues los genes *crpP* disminuyen la susceptibilidad a este antibiótico. Evidenciando que la expresión de *crpP* confiere un incremento en la resistencia a ciprofloxacina en comparación con la cepa parental. El sistema CrpP se comporta de manera similar a otros determinantes plasmídicos como *qnr* o *aac*(6')-Ib-cr, los cuales no confieren resistencia clínica por sí mismos, pero sí modifican el umbral a partir del cual pueden seleccionarse mutaciones cromosómicas (Jacoby y col., 2015). Las proteínas Qnr, protegen a la ADN girasa de la acción de las fluoroquinolonas y generan aumentos discretos en la CMI, generalmente dentro de un rango bajo (Rodríguez-Martínez y col., 2016). De manera similar, la enzima AAC(6')-Ib-cr modifica químicamente a ciprofloxacina mediante acetilación, lo que también resulta en una reducción limitada de la

susceptibilidad (Strahilevitz y col., 2009). En conjunto, estos sistemas comparten con el sistema codificado por CrpP la característica de no conferir resistencia clínica por sí mismos, pero sí establecer un nivel basal de resistencia que permite la supervivencia bacteriana en presencia de concentraciones bajas a intermedias del antibiótico. CrpP ha sido propuesto como una proteína que inactiva a la ciprofloxacina mediante un mecanismo enzimático (Chávez-Jacobo y col., 2018), aunque los valores de MIC a ciprofloxacina conferidos por los distintos homologos sugiere que su eficiencia y alcance pueden variar. Además, reportes previos indican que la proteína CrpP puede favorecer la selección de colonias con resistencia a ciprofloxacina incrementada (Ponce-Méndez, 2023). Esto sugiere que *crpP* puede considerarse funcionalmente análogo a otros mecanismos plasmídicos de bajo nivel en el contexto de la evolución de la resistencia a ciprofloxacina.

Aunque en general los mecanismos de resistencia codificados en plásmidos, como los ya antes mencionados Qnr y AAC(6')-Ib-cr, confieren un nivel de resistencia que por sí solo no es clasificado como resistencia clínica, sin embargo, estudios previos han demostrado que pueden facilitar la selección de mutaciones en genes cromosómicos como *gyrA* y *parC*, incrementando progresivamente los niveles de resistencia (Yassine y col., 2019). En este contexto, se ha propuesto que estos determinantes actúan ampliando el rango de la concentración del antibiótico en el cual las bacterias pueden sobrevivir, favoreciendo así la selección de bacterias con ventajas adaptativas que le permitan crecer a pesar del efecto del antibiótico. La expresión de *crpP* en *E. coli* además de aumentar la CMI (**Tabla 2**), también se ha asociado con un aumento en la frecuencia de aparición de colonias con resistencia incrementada al generar 35 ± 4 colonias con resistencia incrementada derivadas de

la cepa *E. coli* J53-3 (pUC_*crpP*) dando un total de 70 colonias obtenidas en totales; en comparación con las 7 ± 3 colonias obtenidas a partir de la cepa *E. coli* J53-3 con un total de 14 colonias totales obtenidas en el estudio previo dentro del grupo de trabajo (Ponce-Méndez, 2023). Sin embargo, aún es limitado el conocimiento sobre cómo distintas variantes de CrpP modulan este proceso, así como su impacto específico en la selección de mutaciones bajo presión con ciprofloxacina.

En este estudio se determinó que las cepas que expresan a los genes homólogos *crpP* presentaron frecuencias de selección de colonias altamente resistentes cercanos a un orden de magnitud en comparación con la cepa control (**Tabla 3**), lo que indica que su efecto en referencia a la selección de colonias con resistencia incrementada es cuantitativamente similar al efecto de la expresión de otros determinantes codificados en plásmidos que confieren un bajo nivel de resistencia como *qnr* y *aac(6')-Ib-cr*. Los sistemas plasmídicos de resistencia a quinolonas como *crpP*, *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* muestran comportamientos comparables, generalmente asociados con incrementos de una a dos órdenes de magnitud respecto a cepas sin estos determinantes. Para las proteínas Qnr y AAC(6')-Ib-cr, se ha reportado que la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a fluoroquinolonas puede incrementarse de valores basales del orden de 10^{-8} – 10^{-7} hasta aproximadamente 10^{-7} – 10^{-6} (Hooper y col., 2015). Sin embargo, los resultados mostraron que, además, el nivel de susceptibilidad basal que confieren las proteínas CrpP tiene un efecto en la frecuencia de selección de colonias resistentes, esto se evidencia al comparar las frecuencias de mutación obtenidas a partir de las cepas de *E. coli* J53-3 que expresan a los diferentes homólogos siendo el gen *crpP*₂₉₈₂ el que confirió la frecuencia más alta (**Tabla 3**). Esto sugiere la

relación entre el nivel de resistencia conferido por las proteínas CrpP y su efecto en generación de mutaciones (**Figura 10, Tabla 3**).

Las concentraciones elegidas para realizar los ensayos de selección de colonias altamente resistentes a ciprofloxacina se establecieron con base en el concepto de ventana de selección de mutantes ya mencionada previamente, esta describe el intervalo de concentraciones de un antibiótico en el cual las bacterias portadoras de mutaciones que confieren resistencia tienen una ventaja competitiva sobre la población susceptible (Zhao y Drlca, 2008). Este rango se encuentra entre CMI de la población sensible y la CPM, trabajar dentro de este intervalo es crucial para favorecer la aparición y selección de variantes con mecanismos cromosómicos adicionales de resistencia. Las concentraciones utilizadas en este estudio se situaron estratégicamente en la CMI determinada para cada cepa (**Tabla 2**), pero por debajo de la MPC estimada para ciprofloxacina por parte de las cepas de estudio, lo que garantizó que las bacterias sin mutaciones no sobrevivieran, eliminando así la porción de la población susceptible, mientras que aquellas con mutaciones pudieran proliferar. Este enfoque es coherente con investigaciones previas en las que la exposición a concentraciones dentro del rango de la ventana de aparición de mutantes a fluoroquinolonas facilita la acumulación secuencial de mutaciones en *gyrA*, *parC*, porinas y sistemas de eflujo (Andersson y Hughes, 2014; Li y col., 2016).

Además, para la elección de la concentración de ciprofloxacina empleada para la selección de las colonias se consideró una concentración lo suficientemente alta para eliminar la mayoría de la población susceptible determinada mediante los

ensayos de CMI, pero no tan elevada como para impedir el crecimiento de células que además de la resistencia basal conferida por los genes *crpP* adquieran nuevos mecanismos de resistencia generados por cambios genéticos adaptativos. Los resultados obtenidos indican un mayor número de mutantes seleccionados en cepas portadoras de *crpP*₂₉₈₂ en comparación a las que contienen el gen *crpP* de pUM505 y genes homólogos que confieren un nivel de susceptibilidad similar, sugiriendo que el nivel inicial de susceptibilidad conferido por los genes *crpP* influye directamente en la frecuencia de mutación. Este patrón coincide con lo descrito para otros genes plasmídicos de resistencia a quinolonas, como *qnr* y *aac(6')-Ib-cr*, en los que pequeñas variaciones en la reducción de la susceptibilidad inicial se traducen en diferencias significativas en la frecuencia de aparición de mutantes con resistencia incrementada (Jacoby y col., 2015; Yassine y col., 2019).

La frecuencia de mutación representa una medida puntual y dependiente de las condiciones experimentales; esto incluye la cantidad de inóculo, el tiempo de incubación y la presión selectiva y no describe con precisión la dinámica intrínseca de generación de mutaciones en ausencia de selección directa (Foster, 2006; Hershberg y col., 2015). El desarrollo de la resistencia a fluoroquinolonas constituye un proceso evolutivo dinámico que depende de la interacción entre presión del antibiótico y la plasticidad genética bacteriana. Desde la introducción de la ciprofloxacina como agente terapéutico de amplio uso, la emergencia de mecanismos cromosómicos y plasmídicos ha comprometido progresivamente su eficacia clínica. En *E. coli*, la resistencia se asocia principalmente con mutaciones en genes que codifican las topoisomerasas tipo II, así como con determinantes

móviles que disminuyen la susceptibilidad basal y amplían la ventana de selección de mutantes (Redgrave y col., 2014; Hooper y Jacoby, 2015).

El sistema de resistencia conferido por el gen *crpP* además de disminuir la susceptibilidad a ciprofloxacina, establece un nivel basal de resistencia al antibiótico que modifica la respuesta de la población bacteriana frente a la exposición a ciprofloxacina. Por lo tanto, la diferencia en los valores de CMI observada entre las cepas representa una medida directa del nivel de resistencia conferido por cada variante de *crpP*, el cual condiciona la capacidad de las bacterias para tolerar concentraciones crecientes del antibiótico (Hooper y Jacoby, 2015; Jacoby y col., 2015).

Los ensayos de generación de colonias altamente resistentes mostraron una tendencia a obtener mayor número de colonias empleando a las cepas que expresan a los genes *crpP* en comparación con las cepas control. Este efecto fue consistente entre las cepas transformadas con los genes que codifican a los homólogos CrpP analizados (**Tabla 3**), lo que indica que este determinante no solo reduce la susceptibilidad basal a ciprofloxacina, sino que también favorece la selección de variantes con niveles incrementados de resistencia. En conjunto, estos resultados respaldan el papel de *crpP* como un modulador de la dinámica de selección de mutantes, en línea con lo reportado para otros sistemas de resistencia plasmídica a quinolonas (Jacoby y col., 2015; Ponce-Méndez, 2023).

Las colonias obtenidas a partir de los ensayos de inducción de colonias altamente resistentes presentaron aumento en la CMI a ciprofloxacina (**Tabla 4-8, Figura 12**),

alcanzando niveles comparables con la clasificación de bacterias con resistencia intermedia a ciprofloxacina de acuerdo con criterios clínicos del CLSI. Este resultado es relevante al considerar que las colonias fueron recuperadas a partir de las cepas transformadas con los genes *crpP* y bajo condiciones de presión del antibiótico, definidas a partir del nivel de susceptibilidad basal de las cepas de origen. El hecho de que las colonias aisladas exhiban valores de CMI superior a los obtenidos para las cepas parentales, sugiere la adquisición de cambios genéticos adicionales con impacto directo en el nivel de resistencia. Mutaciones en genes diana de las fluoroquinolonas, como *gyrA*, han sido ampliamente asociadas con aumentos sustanciales en la CMI tras exposición a concentraciones selectivas del antibiótico (Zhao y col., 2014). Los ensayos de CMI se realizaron incubando a las por 24 h. El tiempo de incubación empleado es conforme a técnicas de microbiología estandarizadas, con el fin de evaluar la inhibición de la población inicial bajo condiciones controladas y evitar la aparición de variantes adaptativas o mutantes tardíos, así como cambios en el medio que puedan afectar la precisión del ensayo (Andrews, 2001). Mientras que, para los ensayos de selección de colonias altamente resistentes los cultivos se incubaron durante 32 h. Un periodo de incubación prolongado permite la recuperación de colonias derivadas de las cepas nativas capaces de sobrevivir a la presencia de ciprofloxacina y favorecer la detección de variantes con crecimiento lento, evitando la subestimación de su frecuencia y permitiendo una estimación más representativa bajo condiciones selectivas (Andersson y Hughes, 2014; Zhao y Drlica, 2008).

En contraste con el nivel de susceptibilidad disminuida conferido por *crpP*, los mutantes que presentaron sustituciones puntuales en el gen *gyrA* mostraron incrementos mucho más pronunciados en la CMI a ciprofloxacina, alcanzando valores aproximadamente diez veces superiores, un orden de magnitud, a los de la cepa silvestre. Este comportamiento es consistente con el papel de la región QRDR como principal sitio de interacción entre las fluoroquinolonas y la ADN girasa, donde cambios estructurales reducen la afinidad del antibiótico por su diana. En este sentido, mientras que *crpP* establece un nivel basal de susceptibilidad disminuida, las mutaciones en *gyrA* representan un cambio directo en el blanco molecular que se traduce en incrementos sustanciales en la resistencia. Estos resultados respaldan un modelo en el cual la resistencia a ciprofloxacina se incrementa de manera progresiva, partiendo de una reducción inicial de la susceptibilidad y avanzando hacia niveles más altos mediante la selección de mutaciones cromosómicas con mayor impacto fenotípico (Redgrave y col., 2014; Hooper y Jacoby, 2015).

La secuenciación del gen *gyrA* en mutantes con CMI de 2 µg/ml reveló una sustitución puntual en la región QRDR: cambio de guanina por timina en la posición 241, que produjo la transición del codón GGU a UGU y la sustitución del residuo Gly81 por Cys en la proteína GyrA. Esta región amino-terminal es crítica para la interacción de la ADN girasa con fluoroquinolonas, y mutaciones en esta zona han sido ampliamente asociadas con incremento en la CMI (Yoshida et al., 1990; Ruiz, 2003). El cambio de glicina a cisteína puede representar una modificación estructural relevante, ya que la glicina es un aminoácido pequeño, mientras que la cisteína posee una cadena lateral más voluminosa con un grupo tiol (-SH). La

conservación del resto de la secuencia de GyrA sugiere que la mutación Gly81→Cys altera específicamente la afinidad por la ciprofloxacina sin comprometer la función catalítica esencial de la enzima. Este tipo de compromiso estructural–funcional es característico de mutaciones adaptativas en genes diana de antibióticos, donde la presión selectiva favorece cambios mínimos con alto impacto fenotípico (Redgrave et al., 2014). Un ejemplo bien documentado es el de sustituciones puntuales en la región QRDR del gen *gyrA*, como los cambios en los residuos equivalentes a Ser83 o Asp87 en *E. coli*, que con una sola modificación pueden generar incrementos significativos en la CMI a fluoroquinolonas. De manera similar, mutaciones en el gen *rpoB* asociadas con resistencia a rifampicina también implican sustituciones puntuales que alteran la interacción del antibiótico con la ARN polimerasa, sin comprometer completamente la función esencial de la enzima. Estos ejemplos ilustran cómo modificaciones discretas en proteínas blanco pueden traducirse en cambios sustanciales en el fenotipo de resistencia (Garibyan y col., 2003).

Aunque las mutaciones más frecuentemente asociadas a resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* se localizan en posiciones equivalentes a los residuos de Ser 83 y Asp 87 en la subunidad GyrA, se ha documentado que sustituciones en residuos adyacentes dentro de la región QRDR también pueden contribuir a incremento de la CMI. Estas mutaciones suelen conferir niveles bajos a moderados de resistencia cuando se presentan de forma aislada (Marcusson y col., 2009). En conjunto, estos resultados sugieren que el cambio de Gly81→Cys en GyrA en las colonias analizadas desempeña un papel directo en la disminución de la

susceptibilidad a ciprofloxacina, probablemente mediante la alteración de la interacción antibiótico y la enzima. En algunas de las mutantes caracterizadas, se identificó el cambio del residuo de Asp 87 por Gly en la subunidad GyrA. Diversos estudios han demostrado que las sustituciones en Asp87 (particularmente Asp87→Asn, Asp87→Gly y Asp87→Tyr) se encuentran entre las mutaciones más frecuentemente asociadas con resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* clínicos y de laboratorio y suelen conferir incrementos moderados a altos en la CMI cuando se presentan incluso de forma aislada (Marcusson y col., 2009). El residuo Asp 87 se localiza dentro de la región QRDR y desempeña un papel estructural y funcional relevante dentro de la región QRDR debido a su cadena lateral cargada negativamente, la cual contribuye a la correcta orientación del antibiótico y a la estabilidad del complejo girasa–ADN–fluoroquinolona, por lo que se le asocia con incrementos significativos en la CMI. En las mutantes analizadas el cambio del residuo Asp 87 por glicina, un aminoácido pequeño y eléctricamente neutro, podría indicar la pérdida de una carga negativa, reduciendo las interacciones electrostáticas locales, además de incrementar la flexibilidad conformacional de la región. Alteraciones que modifiquen la secuencia de aminoácidos de características distintas (ácidos, básicos, polares y no polares) pueden disminuir la afinidad de ciprofloxacina por su blanco molecular, reduciendo la eficiencia del antibiótico para estabilizar el complejo escindido (Ruiz y col., 2003). Además, se ha descrito que la resistencia mediada por mutaciones primarias en *gyrA*, suelen constituir el primer paso en la evolución hacia niveles más elevados de resistencia, especialmente cuando se combinan con mutaciones adicionales en *parC* o con mecanismos de disminución de la acumulación intracelular del antibiótico, como la sobreexpresión

de bombas de eflujo (Hooper y Jacoby, 2015; Redgrave y col., 2014). La sustitución del residuo Asp87→Gly en GyrA en las mutantes analizadas concuerda con la relevancia de Asp87 como residuo crítico dentro de la QRDR y confirman su papel central en la evolución y consolidación de la resistencia a fluoroquinolonas.

Desde una perspectiva clínica y epidemiológica, considerar mecanismos de resistencia de bajo nivel a ciprofloxacina como el conferido por la proteína CrpP resulta fundamental, ya que incluso incrementos modestos en la CMI pueden traducirse en la ampliación de la ventana del rango de selección de mutantes, favoreciendo la evolución hacia fenotipos de resistencia intermedia o alta. La vigilancia microbiológica no debe limitarse a detectar únicamente resistencia clínica establecida, sino también determinantes plasmídicos que modulan tempranamente la trayectoria evolutiva de las bacterias frente a fluoroquinolonas (Hooper y Jacoby, 2015).

En condiciones de exposición a ciprofloxacina, el principal blanco de acción son la ADN girasa y la topoisomerasa IV, la inhibición de estas enzimas provoca roturas de doble cadena en el ADN y detención de la replicación como ya se había descrito (Hooper & Jacoby, 2015). Este daño activa la respuesta SOS, un sistema global de reparación regulado por RecA y LexA, que incrementa la expresión de polimerasas propensas a errores como Pol IV (*dinB*) y Pol V (*umuDC*), favoreciendo la introducción de mutaciones durante la síntesis de ADN (Cirz y col., 2005). De este modo, la exposición de las bacterias a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina o dentro de la ventana de selección de mutantes no solo selecciona

variantes preexistentes, sino que puede inducir un aumento transitorio de la tasa de mutación.

La expresión del gen *crpP* confiere una susceptibilidad disminuida en la bacteria, permitiendo que las bacterias sobrevivan más tiempo en condiciones de estrés genotóxico. Esta prolongación de la viabilidad bajo presión antibiótica podría favorecer la acumulación de mutaciones en genes diana como *gyrA* y *parC*, así como en elementos asociados a la permeabilidad (porinas como *ompF*) o al lipopolisacárido (*rfaD*), que modulan la entrada del fármaco, o la selección de mutaciones preexistentes en subpoblaciones heterogéneas. Estudios de variabilidad fenotípica demuestran que, en poblaciones bacterianas, pequeñas fracciones de células pueden presentar estados fisiológicos que las protegen transitoriamente del antibiótico (Balaban y col., 2019). En estos subgrupos, el antibiótico actúa como un factor de selección, enriqueciendo aquellas variantes que ya portan cambios en los blancos de acción o en la expresión de bombas de eflujo. La existencia de múltiples mecanismos como la resistencia basal al antibiótico conferido por un sistema plasmídico como el conferido por las proteínas CrpP, la exposición prolongada al antibiótico dentro de las concentraciones umbral, la inducción de la respuesta SOS y la selección de variantes con modificaciones (mutantes) acumulativas, en conjunto, genera un escenario altamente favorable para la evolución hacia fenotipos de alta resistencia. Comprender estos procesos es esencial para diseñar estrategias que minimicen la exposición de poblaciones bacterianas a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina, reduciendo así la probabilidad de aparición de mutantes multirresistentes.

10. Conclusión

El sistema de resistencia a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP además de disminuir la susceptibilidad al antibiótico favorece la selección de mutaciones que incrementan el nivel de resistencia de las bacterias. Además, el nivel de susceptibilidad conferido por las proteínas CrpP homologas es importante pues se relaciona directamente con la frecuencia de selección de colonias con resistencia incrementada a ciprofloxacina.

11. Referencias

Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574.

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465-478.

Andersson, M. I., y MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1-11.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.

Andriole, V. T. (2005). The quinolones: past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases*, 41, S113.

Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., y Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 441-448.

Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(2), 70-76.

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.

Cambau, E., & Gutmann, L. (1993). Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs*, 15-23.

Cambau, E., Perani, E., Dib, C., Petinon, C., Trias, J., & Jarlier, V. (1995). Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(10), 2248-2252.

Cattoir, V., & Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 16(8), 1028-1046.

Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Gutiérrez-Corona, J. F., ... & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(6), 10-1128.

Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Ortiz-Alvarado, R., ... & Ramírez-Díaz, M. I. (2019). Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(5), 1253-1259.

Chávez-Jacobo VM, García Merinos JP, López Y, Meza-Carmen V, y Ramírez-Díaz MI. (2020). Identification of essential residues for ciprofloxacin resistance of ciprofloxacin-modifying enzyme (CrpP) of pUM505. *Microbiology*, 166(4), 367–374.

Chávez-Jacobo, V. M., Ramírez-Díaz, M. I., Silva-Sánchez, J., & Cervantes, C. (2015). Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. *Revista de educación bioquímica*, 34(1), 4-9.

Cirz, R. T., Chin, J. K., Andes, D. R., de Crécy-Lagard, V., Craig, W. A., & Romesberg, F. E. (2005). Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS biology*, 3(6), e176.

CLSI. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 33rd ed. CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Collin, F., Karkare, S., & Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3), 479-497.

Cook, M. A., & Wright, G. D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, 14(657), eabo7793.

Dalhoff, A., & Petersen, U. (2003). Levofloxacin: a review of its use in community-acquired pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(1), 1–13.

Díaz, P. S. (2003). Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Revista Española Quimioterapia*, 16(2), 172-187.

Drlica, K., & Zhao, X. (2007). Mutant selection window hypothesis updated. *Clinical infectious diseases*, 44(5), 681-688.

Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., & Zhao, X. (2009). Quinolones: action and resistance updated. *Current topics in medicinal chemistry*, 9(11), 981-998.

Emmerson, A. M., & Jones, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 13-20.

Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International journal of applied microbiology and biotechnology research*, 4(2016), 90-101.

Foster, P. L. (2006). Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods in Enzymology*, 409, 195–213.

Garibyan, L., Huang, T., Kim, M., Wolff, E., Nguyen, A., Nguyen, T., ... & Miller, J. H. (2003). Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA repair*, 2(5), 593-608.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3872-3876.

Goldstein, E. J. C. (2002). Safety profile of the fluoroquinolones: focus on levofloxacin. *Clinical Infectious Diseases*, 34, S47–S52.

Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A. H., & Sørensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), 3332-3337.

Hershberg, R. (2015). Mutation—the engine of evolution: studying mutation and its role in the evolution of bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a018077.

Hoiby N. (2011). Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Medicine* 9: 1-7.

Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9), a025320.

Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York academy of sciences*, 1354(1), 12-31.

Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2015). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 475-503.

Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N., & Fanning, S. (2011). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Applied and environmental microbiology*, 77(20), 7113–7120.

Katzung, B. G. (2010). Farmacología básica y clínica. S. B. Masters, & A. J. Trevor (Eds.). McGraw-Hill Interamericana.

Khodursky, A. B., & Cozzarelli, N. R. (1998). The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27668-27677.

Kidwell, M. G., & Lisch, D. R. (2001). Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*, 55(1), 1-24.

Kishii, R., & Takei, M. (2009). Relationship between the expression of *ompF* and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 15(6), 361–366.

Krebs, J. E., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. (2017). Lewin's genes XII. Jones & Bartlett Learning.

Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., & Brundage, R. P. (1962). 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5(5), 1063-1065.

Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2016). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), 337–418.

Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610.

Ma, W. T., Sandri, G. V., & Sarkar, S. (1992). Analysis of the Luria–Delbrück distribution using discrete convolution powers. *Journal of Applied Probability*, 29(2), 255–267.

Marcusson, L. L., Frimodt-Møller, N., & Hughes, D. (2009). Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathogens*, 5(8), e1000541.

Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 430-449.

Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Conejo, M.delC., García, I., Joyanes, P., Doménech-Sánchez, A., & Benedí, V. J. (2002). Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), 3926–3932.

Espinosa Meléndez, M. T. (2012). Farmacología y terapéutica en odontología: fundamentos y guía práctica. In *Farmacología y terapéutica en odontología: fundamentos y guía práctica* (pp. 440-440).

Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. *How to overcome the antibiotic crisis: facts, challenges, technologies and future perspectives*, 237-272.

Morrissey, I., George, J. T., & Wise, R. (1986). The effect of calcium and magnesium ions on the in vitro activity of ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 17(4), 501–508.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 463-469.

O'Neill. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The health and wealth of nations. Rev Antimicrob Resist.* 1-16.

Oliphant, C. M., & Green, G. M. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American family physician*, 65(3), 455-465.

Pagnout, C., Sohm, B., Razafitianamaharavo, A., Caillet, C., Offroy, M., Leduc, M., ... & Duval, J. F. (2019). Pleiotropic effects of rfa-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Scientific reports*, 9(1), 9696.

Ponce-Méndez, B. C. (2023). Estudio de la presencia del orf131 del plásmido pUM505 en la inducción de mutantes resistentes a quinolonas (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2, 65.

Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445.

Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), 4783–4788.

Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), 149–182.

Rodríguez-Martínez, J. M., Machuca, J., Cano, M. E., Calvo, J., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 29, 13–29.

Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., ... & Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature medicine*, 12(1), 83–88.

Rosche, W. A., & Foster, P. L. (2000). Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods*, 20(1), 4–17.

Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1109–1117.

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2016(1), 2475067.

Steenbergen, J. N., Alder, J., Thorne, G. M., & Tally, F. P. (2005). Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 283–288.

Skidgel, R., Erdös, E. G., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2007). Goodman y Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica.

Smith, K. P., & Kirby, J. E. (2018). The inoculum effect in the era of multidrug resistance: Minor differences in inoculum have dramatic effect on MIC determination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(3), 10–1128.

Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 664–689.

Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210.

Teichmann, L., Luitwieler, S., Bengtsson-Palme, J., & Ter Kuile, B. (2025). Fluoroquinolone-specific resistance trajectories in *E. coli* and their dependence on the SOS-response. *BMC microbiology*, 25(1), 37.

Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638-5642.

Vetting, M. W., Hegde, S. S., & Blanchard, J. S. (2008). The structure and mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* cyclodityrosine synthetase. *Nature Chemical Biology*, 4(10), 702–708.

Wang, X., Chen, X., Wang, Z., Zhang, Y., He, H., & Zhang, Y. (2022). Disruption of *rfaD* sensitizes *Escherichia coli* to bactericidal antibiotics via increasing oxidative stress and cell envelope damage. *Cells*, 11(17), 2667.

Wood, S. J., Kuzel, T. M., & Shafikhani, S. H. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: infections, animal modeling, and therapeutics. *Cells*, 12(1), 199.

Wu, D. Q., Ye, J., Ou, H. Y., Wei, X., Huang, X., He, Y. W., & Xu, Y. (2011). Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC genomics*, 12(1), 438.

Xiong, X., Bromley, E. H., Oelschlaeger, P., Woolfson, D. N., & 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 research*, 39(9), 3917-3927.

Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., ... & Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(9), 3354-3360.

Yassine, I., Rafei, R., Osman, M., Mallat, H., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2019). Plasmid-mediated quinolone resistance: Mechanisms, detection, and epidemiology in the Arab countries. *Infection, Genetics and Evolution*, 76, 104020.

Zhao, X., & Drlica, K. (2008). A unified anti-mutant hypothesis for fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 385–392

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Dilucidar el efecto del nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina conferido por las proteínas CIP en la selección de mutaciones que incrementan la resistencia a ciprofloxacina en bacterias	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Joshua Avam Fernández Ramírez	23534909@umich.mx
Director	Martha Isela Ramírez Díaz	Martha.vamirez@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	Mauro Martínez Pacheco	mauro.martinez.pacheco@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	SI	La figura 6 de la tesis posee un cuadro que en formato imagen se hizo con IA
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	SI	Al requerir información (artículos) para la búsqueda con IA y con el doi obtuve los artículos
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	[Redacted Name] [Redacted Signature]
Lugar y fecha	25/05/2026 ; Morelia, Michoacán, México.

Joshua Aram Fernández Ramírez

Dilucidar el efecto del nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina conferido por las proteínas C  rpP en la selección de mutaciones...



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:595063487

Fecha de entrega

27 may 2026, 1:41 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

27 may 2026, 2:07 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

Dilucidar el efecto del nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina conferido por las proteínas CrpP e....pdf

Tamaño del archivo

2.0 MB

133 páginas

23.773 palabras 130.064 caracteres