



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BOMBAS DE
EXPULSIÓN DE MULTIRRESISTENCIA A
FÁRMACOS EN BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

TANYA PAULINA TREJO MUÑÚZURI

Tutora: DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BOMBAS DE EXPULSIÓN DE MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS EN BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. María Del Carmen Wacher Rodarte en el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. María Del Carmen Wacher Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dr. Carlos Eslava Campos	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Teresita Sainz Espuñes, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos correspondientes a la evaluación de la expresión génica.

Se reconoce la colaboración del Dr. Fernando Montiel Aguirre, del departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de susceptibilidad a distintos agentes tóxicos.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Raúl Gutiérrez Lucas en los experimentos correspondientes a la evaluación de la expresión génica.

Se reconoce la asesoría técnica del Q.F.B. Juan Carlos Jiménez Castellanos en los experimentos de fluorimetría.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (34815-n, 41328-q) y PAEP-UNAM (030539, 202352). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en Noviembre de 2012.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Bertha González Pedrajo	Inst. de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Teresita Sainz Espuñes	UAM-Xochimilco
Vocal	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Inst. de Inv. Biomédicas, UNAM

Dedicatoria

A mis padres:

C.D. Hilda Lourdes Muñúzuri Arana

Dr. Ángel Gerardo Trejo Castillo

Por ser el pilar fundamental de mi educación, tanto académica, como de la vida. El orgullo que sienten por mí, fue mi mayor motivación y lo que me permitió llegar con éxito hasta el final.

Hoy puedo ver alcanzada una meta más y le agradezco a la vida el poder tenerlos a mi lado para compartirlo. Este logro es por ustedes, gracias a su incondicional apoyo, por ser mi ejemplo de superación, por sus consejos, por su paciencia, por su comprensión y por su cariño incondicional.

¡Los amo muchísimo!

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Carmen Wachter Rodarte, por darme su apoyo y confianza en los momentos que más lo necesité, esto ha sido posible gracias a usted.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus consejos y opiniones que ayudaron a enriquecer y mejorar poco a poco este trabajo.

A los miembros del jurado, por la atención y el tiempo dedicado al presente trabajo, así como por las sugerencias, consejos y correcciones para mejorarlo.

Al Dr. Fernando Montiel Aguirre y a la M. en C. Raquel Ortega Muñoz, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo y confianza a lo largo de todo este tiempo, pero sobre todo, por su valiosa amistad.

A la Dra. Teresita Sainz Espuñes, a quien considero un pilar importante de este proyecto. Gracias a su apoyo y consejos fue posible cosechar gran parte de los frutos de este proyecto. Gracias por su confianza y su amistad.

A mi familia, a mi hermano, a mi cuñada, a mi pequeña Andy, a mis primas, tíos y mis pequeñas sobrinas, que siempre han sido motivos de alegría en mi vida.

A mi segunda familia, esa que aunque no lleva mi sangre, la llevo siempre en el corazón: a mi hermano Juanito, China, Mau, Brenda, Dany, Rudy. Termina una etapa más en mi vida y es grato saber que siguen formando parte de ella, gracias por su apoyo incondicional, por compartir conmigo buenos y malos ratos...gracias a la vida por ponerlos en mi camino.

A ti, mi cómplice de vida, por disfrutar conmigo los triunfos, por reconfortarme en los tropiezos, por alentarme y motivarme siempre a seguir adelante. Gracias por acompañarme y apoyarme en cada paso hasta llegar al final de esta meta.

A la universidad Nacional Autónoma de México por ser mi hogar durante tanto tiempo, por enseñarme el amor, el respeto, los valores y el espíritu universitario.

“Por mi raza hablará el espíritu”

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un profesional con habilidades específicas: es también un niño situado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie.

ÍNDICE

	Pág.
Abreviaturas	8
Resumen	9
1. Antecedentes	
1.1. Resistencia a antibióticos.....	11
1.1.1. Tipos de resistencia.....	12
1.1.2. Elementos genéticos móviles.....	13
1.1.3. Bases bioquímicas de la resistencia a antibióticos.....	15
1.2. Bombas de expulsión en la multiresistencia a fármacos (<i>Mulidrug efflux pumps</i>).....	17
1.2.1. Familias de bombas de expulsión.....	20
1.2.2. Perfil de sustratos para bombas de multiresistencia a fármacos (MDR).....	29
1.2.3. Regulación.....	30
1.3. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	34
1.3.1. Resistencia a antibióticos en BAL.....	36
1.3.2. Perfiles de susceptibilidad a antibióticos en BAL.....	37
1.3.3. Bombas de expulsión de multiresistencia en BAL.....	42
2. Justificación	46
3. Objetivos	
3.1. Objetivo general.....	50
3.2. Objetivos particulares.....	50
4. Hipótesis	50
5. Materiales y métodos	
5.1. Esquema general de trabajo.....	51
5.2. Obtención de cepas.....	51
5.3. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	52

	Pág.
5.4. Tolerancia a bromuro de etidio	
5.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	52
5.4.2. Concentración mínima bactericida (CMB).....	53
5.5. Acumulación de bromuro de etidio.....	53
5.6. Expresión de bombas de expulsión	
5.6.1. Extracción de ARN.....	54
5.6.2. Determinación de la concentración de ARN.....	56
5.6.3. RT-PCR.....	57
5.6.4. Análisis de amplicones por densitometría.....	59
6. Resultados	
6.1. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	61
6.2. Tolerancia a bromuro de etidio.....	63
6.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	64
6.2.2. Concentración mínima bactericida (CMB).....	65
6.3. Acumulación de bromuro de etidio.....	68
6.4. Expresión de bombas de expulsión.....	71
6.4.1. RT-PCR.....	71
6.4.2. Análisis de amplicones por densitometría.....	73
7. Discusión	75
8. Conclusiones	96
9. Perspectivas	100
10. Referencias	101

Abreviaturas

(BAL)	Bacteria(s) Ácido Láctica(s)
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
EtBr	Bromuro de etidio
MDR	<i>(MultiDrugResistance)</i> Multirresistencia a fármacos y/o compuestos tóxicos
MLS	Fenotipo de resistencia a Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas
RI	Resistencia Intermedia
SDR	<i>(SpecificDrugResistance)</i> Resistencia particular a fármacos y/o compuestos tóxicos

Resumen

En su ambiente natural, los microorganismos se encuentran continuamente expuestos a numerosas moléculas tóxicas que comprenden desde compuestos naturales (alcaloides de plantas), péptidos (bacteriocinas) y productos metabólicos nocivos (sales biliares, ácidos grasos, antibióticos), hasta químicos producidos industrialmente (solventes, ácidos orgánicos, algunas clases de antibióticos). Por esta razón, han desarrollado varias estrategias para resistir los efectos de las sustancias citotóxicas.

Un mecanismo de resistencia distribuido en todos los organismos vivos involucra la expulsión de los compuestos tóxicos de la célula por medio de sistemas de transporte de MDR. Éstos, son proteínas de membrana que expulsan activamente compuestos nocivos de diversas estructuras químicas y de distintos blancos celulares.

En microorganismos multirresistentes, la cantidad de transportadores de MDR puede estar aumentada o pueden encontrarse sobre-expresados. La sobre-expresión de bombas de expulsión de MDR disminuye la concentración intracelular de los compuestos, haciendo que estos se encuentren en sub-dosis tóxicas, provocando que la célula se adapte al compuesto y que, tras varias generaciones, se vuelva tolerante o resistente al mismo.

En la actualidad se encuentran en aumento los reportes de microorganismos resistentes y multirresistentes a antibióticos que no son necesariamente considerados clínicamente relevantes, como es el caso de las bacterias ácido lácticas.

En el presente trabajo se estudió si el fenotipo de multirresistencia asociado a bacterias ácido lácticas se encuentra relacionado con la sobreexpresión de bombas de expulsión de MDR. Para ello, se evaluó la susceptibilidad de algunas

cepas de bacterias ácido lácticas frente a distintas familias de antibióticos. Se encontró que, de manera general, presentan perfiles de resistencia bastante amplios. En todos los casos la resistencia abarcó simultáneamente más de 3 familias distintas de antibióticos, por lo que las BAL de este estudio fueron consideradas como portadoras de un fenotipo de multirresistencia (a excepción de los enterococos). Adicionalmente, el fenotipo de multirresistencia también se asoció a un fenotipo de eflujo (con experimentos de acumulación de bromuro de etidio) en microorganismos de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*.

Sin embargo, solamente en el caso de *Lc. lactis* fue posible establecer una relación entre los fenotipos de multirresistencia y de eflujo y la sobreexpresión de una bomba de expulsión de MDR, provocada, probablemente por una proteína represora defectuosa.

Salvo el caso de *Lc. lactis*, no parece haber una relación directa entre la sobreexpresión de bombas de eflujo y el fenotipo de multirresistencia a antibióticos asociado a las bacterias ácido lácticas. Los resultados de este estudio sugieren que la resistencia en estas bacterias, podría estar mediada principalmente por otros mecanismos de resistencia intrínseca como la ausencia de blanco del antibiótico y diversas modificaciones en el sitio blanco, entre otras. Aunque no debe descartarse la posibilidad de que otras bombas de eflujo de MDR, no evaluadas en este estudio se encuentren funcionando como un mecanismo importante y/o contribuyan al fenotipo de eflujo observado en todos los casos.

1. Antecedentes

1.1. Resistencia a antibióticos

Los agentes antimicrobianos tienen un gran valor por combatir las enfermedades infecciosas. Sin embargo, su eficacia ha sido amenazada por la aparición de la resistencia bacteriana (*Flórez et al., 2005*).

La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir, inhibir o revertir los efectos de un antibiótico. La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas al azar, por la presencia de genes de resistencia a antibióticos o también puede inducirse artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población microbiana (*Cordiés et al., 1998*).

En los últimos años se estima que se han aportado a la biósfera entre una y diez millones de toneladas de antibióticos. La correlación entre la utilización de antibióticos y el aislamiento de bacterias resistentes ha sido puesta de manifiesto por diversos autores a través de los años (*Barbosa & Levy, 2000; Granizo et al., 2000; Bronzwaer et al., 2002*). De este modo, la introducción de nuevos fármacos va seguida, en un periodo más o menos corto, de la aparición de microorganismos resistentes (*Flórez-García, 2007*).

La presión selectiva que los antibióticos ejercen en determinados hábitats favorece la adquisición de sistemas de resistencia como respuesta adaptativa de los microorganismos. La resistencia es, pues, un proceso evolutivo inevitable y predecible. En estas condiciones, son frecuentes las mutaciones espontáneas; primer paso en el desarrollo de altos niveles de resistencia (*Mazel & Davies, 1999*).

La aparición de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que puede ser debido a la diseminación de los sistemas de defensa que presentan las cepas

productoras de dichos compuestos (Hawkey, 2000); a la adquisición de nuevos genes, o cambios en genes cuyas proteínas codificadas modifican su actividad hasta ser capaces de proteger el blanco de acción o de modificar, incluso, a los antibióticos (Davies, 1994). Ambos tipos de procesos han contribuido a la enorme diversidad y variabilidad de los mecanismos de resistencia conocidos en la actualidad (Walsh, 2000).

1.1.1. Tipos de resistencia

- Resistencia intrínseca (natural). Esta resistencia es la que presentan, por ejemplo, los microorganismos productores de antibióticos como autodefensa frente a su efecto inhibitor. Se incluye, además, la resistencia de los microorganismos “insensibles” a los que no afectan determinados antibióticos, sin que ello conlleve ningún tipo de alteración. La ausencia del blanco molecular de acción es una clara forma de resistencia intrínseca. Así por ejemplo, la resistencia a vancomicina de muchas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* es consecuencia de la ausencia del dipéptido D-alanina-D-alanina que en estos microorganismos se sustituye de forma natural por D-alanina-D-lactato (Flórez-García, 2007).
- Resistencia adquirida. La resistencia adquirida, como su nombre lo indica, se adquiere en un determinado momento del ciclo de vida del organismo. Puede adquirirse por mutación o estar mediada por fenómenos de transferencia y adquisición génica (conjugación, transformación, transducción). Una vez que se adquiere la información genética, las bacterias pueden transmitir los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por los diversos procesos de intercambio de material genético (Cordiés et al., 1998).

La mayoría de los genes de resistencia son portados por plásmidos, transposones y otros elementos genéticos con capacidad de movilidad inter-genérica e inter-específica (Mazel & Davies, 1999).

1.1.2. Elementos genéticos móviles

➤ Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias y, en algunas ocasiones, en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía desde 1 a 250 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula (*Thomas, 2000*).

Se han encontrado plásmidos en casi todas las bacterias. A diferencia del ADN cromosomal, los plásmidos no tienen proteínas asociadas (*Orman, 2006*).

Muchos de ellos poseen información genética importante para las bacterias. Por ejemplo, los genes que codifican para las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos están frecuentemente en plásmidos.

Los plásmidos R confieren a las células que los poseen, resistencia a los antibióticos. Un plásmido R puede llegar a tener hasta 10 genes que confieren resistencia y pueden transferirse a otra bacteria de la misma especie, a virus e inclusive, a bacterias de diferentes especies. Actúan proporcionando la información necesaria para destruir el antibiótico o para bloquear el efecto que produce el antibiótico en la vía metabólica bacteriana (*Orman, 2006*).

➤ Transposones

Son segmentos de ADN con la capacidad de moverse a lo largo del genoma. Son únicos en cuanto a que tienen la capacidad de migrar por sí mismos desde un locus genético a otro, ya sea en la misma bacteria, o incluso entre bacterias de diferente género.

Se conocen dos tipos de transposones (***Figura 1***):

- *Transposón Simple, Secuencia de Inserción o Elemento de Inserción (IS)*: los transposones simples contienen una secuencia central con información para la transposasa y en los extremos una secuencia repetida en orden

inverso. Esta secuencia repetida en orden inverso no es necesariamente idéntica, aunque muy parecida. Cuando un transposón simple se integra en un determinado punto del ADN aparece una repetición directa de la secuencia diana (5-12 pb) (Galun, 2003).

- *Transposón Compuesto (Tn)*: contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central que además suele contener información de otro tipo. Por ejemplo, los factores de transferencia de resistencia (RTF), que poseen información en la zona central para resistencia a antibióticos (Galun, 2003).

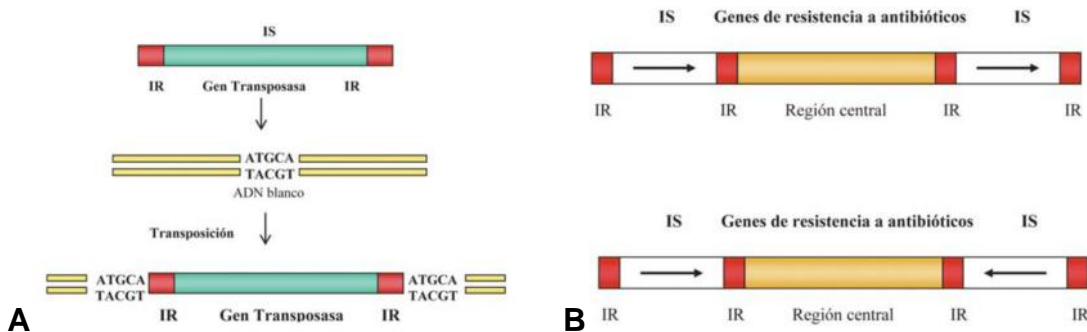


Figura 1. Tipos de transposones. **A)** Transposón simple, **B)** Transposón compuesto (Orman, 2006)

Los transposones desempeñan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos porque a menudo contienen secuencias de genes llamadas *integrones* que median la resistencia a los antibióticos (Pinilla et al., 2006).

➤ Integrones

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio-específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, genes de resistencia a antibióticos. El dinamismo de los integrones se refiere a la capacidad de los genes estructurales presentes en el integrón para escindirse en forma de círculos

de ADN autónomos (llamados cassettes de genes) y a la capacidad de estos círculos autónomos para integrarse en un integrón diferente (García, 1999).

Todos los integrones conocidos están compuestos por tres elementos clave, necesarios para la obtención de genes exógenos: primero, un gen que codifica para una integrasa (*intI*), segundo, un sitio primario de recombinación (*attI*), y tercero, un promotor fuerte (P) (Rowe-Magnus & Mazel, 1999).

El integrón de clase 1 (Figura 2) está comúnmente asociado al transposón Tn21 y contiene una secuencia 3' conservada que se compone de los genes de resistencia *qacE* 1, y *sul1*, con un marco de lectura abierto con función desconocida denominado *orf5* que se encuentra localizado en una zona lejana hacia el extremo 3' del gen de la integrasa (Roe & Pillai, 2003).

Los integrones, y de manera más frecuente el integrón de clase 1, han sido asociados a cepas aisladas de alimento para animales que presentan multiresistencia a antimicrobianos.

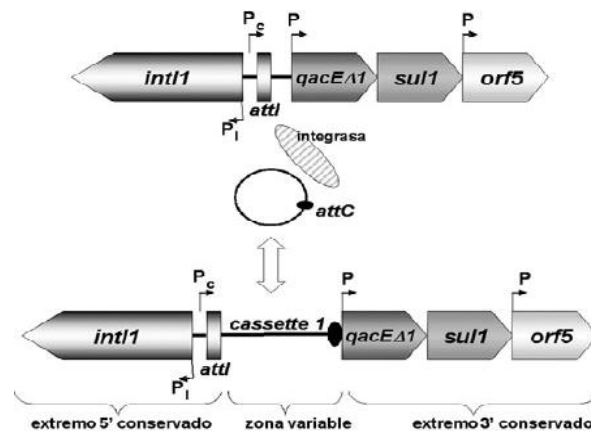


Figura 2. Estructura y diferenciación de las regiones del integrón de clase 1.
(Mella et al., 2004)

1.1.3. Bases bioquímicas de la resistencia a antibióticos

Sean intrínsecas o adquiridas, las bases bioquímicas de la resistencia son extremadamente variadas. La mayoría se puede agrupar en alguna de las siguientes categorías:

a) Modificación del blanco molecular de acción del antibiótico.

Una alteración en el blanco del antibiótico impide la unión del antimicrobiano y, consecuentemente, confiere resistencia al mismo. Encontramos este mecanismo de resistencia en aquellas modificaciones estructurales que afectan a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) presentes en la pared bacteriana de algunas cepas resistentes a este antibiótico. Las alteraciones de las PBPs son adquiridas y casi siempre se deben a mutaciones cromosómicas (*Walsh, 2000*). Otro ejemplo son las modificaciones ribosomales que hacen que una bacteria sea invulnerable a la acción de aminoglicósidos, macrólidos o tetraciclinas. En algunas cepas, la resistencia a eritromicina está mediada por una metiltransferasa que incorpora un grupo metilo en el residuo de adenina situado en la posición 2058 del ARNr 23S o en posiciones adyacentes (*Bussiere et al., 1998*).

b) Detoxificación por modificación y/o inactivación del antibiótico

Muchas bacterias son capaces de sintetizar enzimas que modifican de forma específica e irreversible a los antibióticos. Esta acción puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: la enzima puede inactivar el antibiótico como consecuencia de la ruptura de enlaces covalentes de su estructura, o modificarlo químicamente por adición o sustitución de radicales de su molécula. La destrucción enzimática es uno de los mecanismos de resistencia más frecuente a los β -lactámicos. Se conoce un gran número de β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de penicilinas y cefalosporinas, originando derivados biológicamente inactivos.

Entre los mecanismos de inactivación por sustitución o modificación del antibiótico, podemos mencionar la resistencia al cloranfenicol en la que la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa acetila los grupos hidroxilos del mismo. De igual forma, las enzimas adenil-transferasas (AMP), fosforil-transferasas (-PO₃) o acetil-transferasas modifican los aminoglicósidos de manera que reducen o pierden su afinidad por el ribosoma (*Shaw et al., 1993*).

c) Ausencia o cambios en el transporte del antibiótico

La interferencia con el transporte del antibiótico, asociada al establecimiento de una barrera de permeabilidad al mismo, es un mecanismo habitual de resistencia. A causa de su tamaño, los macrólidos encuentran dificultades para pasar la barrera de la membrana externa en bacterias Gram-negativas. La penetración de tetraciclina en las células se ve reducida cuando las porinas disminuyen o se modifican. La ausencia de transporte mediada por los citocromos es causa de resistencia natural a los aminoglicósidos en organismos anaerobios como las bifidobacterias.

En otra categoría podríamos situar la excreción del antibiótico al exterior celular una vez que ha sido incorporado. De esta forma, la expulsión de tetraciclina por proteínas de membrana reduce la concentración intracelular (*Chopra & Roberts, 2001*).

d) Transporte inespecífico del antibiótico al exterior de la célula bacteriana.

Además de mecanismos específicos, se han sugerido varios mecanismos (inespecíficos) que contribuyen al incremento en la resistencia a antibióticos, entre ellos: el grosor de la pared celular, sistemas de autólisis de pared celular defectuosos y, transportadores multi-fármacos (*Ammor et al., 2008*).

En las células existen sistemas generales de detoxificación, como los sistemas de resistencia múltiple a fármacos (Multi-Drug Resistance), capaces de expulsar numerosos sustratos tóxicos. Los sistemas generales MDR están presentes en todos los seres vivos y son capaces de expulsar numerosos compuestos citotóxicos no relacionados estructuralmente, incluyendo diversos antibióticos.

1.2. Bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos (MDR)

La multirresistencia a fármacos (MDR) es un fenotipo cada vez más asociado a muchos patógenos. Esto también incluye la extensa resistencia a fármacos (XDR) encontrada en *Mycobacterium tuberculosis* y la pan-resistencia, sobre todo, en bacterias Gram-negativas.

La MDR puede ser causada por la presencia simultánea de múltiples mecanismos de resistencia individuales, cada uno de ellos codificado, bien por plásmidos o por genes en el cromosoma (*Li & Nikaido, 2009*).

Como se mencionó anteriormente, las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos ingeniosos que son bastante específicos para un antibiótico o alguna familia de antibióticos. Sin embargo, hay otros mecanismos más generales de resistencia, en donde, el acceso del antimicrobiano inalterado hasta su sitio de acción es prevenido por barreras de baja permeabilidad a fin de disminuir la entrada del antimicrobiano a la célula o, también, mediante el bombeo del antimicrobiano fuera de la célula en un proceso dependiente de energía (*Nikaido, 1994*).

El “eflujo” en una célula, es el bombeo de un soluto fuera de la misma. Los genes que codifican para las “bombas de eflujo” o “bombas de expulsión” se encuentran en todos los organismos y, tanto en bacterias susceptibles, como en bacterias resistentes a antibióticos. En las bacterias, estos genes se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos transmisibles. Algunos de estos sistemas pueden ser inducidos por sus propios sustratos, de modo que una cepa que es aparentemente susceptible podría ser capaz de sobre-producir una bomba de expulsión y adquirir resistencia (*Piddock, 2006*).

La primera bomba de expulsión descrita fue la glicoproteína P (de origen mamífero), una bomba acoplada a la hidrólisis de ATP que confiere resistencia a un amplio espectro de compuestos, incluyendo agentes quimioterapéuticos contra el cáncer (*Paulsen, 2003*).

Las bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos (bombas de expulsión-MDR) son muy abundantes y ubicuas en la naturaleza, constituyen en promedio más del 10% de los transportadores en un organismo. La mayoría de los sistemas de expulsión descritos se encuentran generalmente en organismos asociados al suelo o plantas (*Paulsen, 2003*).

Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar una amplia gama de estructuras y compuestos diferentes, asociándolas con múltiples resistencias a fármacos y/o compuestos tóxicos (entre ellos a los antibióticos). La resistencia, en este contexto, no necesariamente significa resistencia a los agentes que se utilizan para tratar una infección por una especie en particular o, incluso, resistencia a concentraciones clínicamente exitosas de estos medicamentos, por lo que la relevancia clínica de la resistencia mediada por bombas de expulsión es especie, fármaco e infección dependiente (*Piddock, 2006*).

Además de la función de incrementar el eflujo de los antibióticos en microorganismos resistentes, se ha sugerido que el aumento en la expresión de genes de las bombas de expulsión, podría representar el primer paso en una bacteria para hacerse totalmente resistente (*Oethinger et al., 2000*).

Es bien sabido que las bombas de expulsión-MDR codificadas por las bacterias pueden conferir resistencia clínicamente relevante a los antibióticos. Ahora se entiende que estas bombas de expulsión también tienen un papel fisiológico. Estas pueden conferir resistencia a las sustancias naturales producidas por el hospedero, incluyendo hormonas, bilis y moléculas de autodefensa, lo que indica que estos sistemas podrían tener un papel importante al permitir a las bacterias sobrevivir en su nicho ecológico.

La genómica ha revelado que existen muchos genes que codifican posibles bombas de expulsión de muchos tipos, de los cuales un subconjunto se cree que confieren multirresistencia a fármacos (MDR) (*Saier & Paulsen, 2001*). También hay evidencia de que el tamaño del genoma es un reflejo del número de genes de bombas presentes, de tal manera que grandes genomas poseen un mayor número de genes de bombas de expulsión (*Piddock, 2006*). A menudo, un solo organismo puede poseer múltiples bombas de expulsión de MDR.

1.2.1. Familias de bombas de expulsión

En células eucariotas, todas las bombas de expulsión-MDR bien caracterizadas se dividen en dos familias de proteínas de transporte: la familia ABC (ATP Binding Cassette) y la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily). Estas dos familias son amplias y muy antiguas filogenéticamente.

En las células procariontas, las bombas de expulsión-MDR son miembros no sólo de estas dos familias de permeasas, sino también de otras familias: la familia SMR (Small Multidrug Resistance), la familia RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), y la familia MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion) (*Saier et al., 1998; Piddock, 2006; Li & Nikaido, 2009*) (**Figura 3**).

Cada familia de permeasas en donde se han encontrado miembros que confieren resistencia a antibióticos posee, por lo menos, una subfamilia con miembros reconocidos que catalizan la expulsión de estos fármacos. Otras subfamilias tienen otras funciones de transporte, generalmente llevando nutrientes al interior de la célula o exportando macromoléculas que han sido sintetizadas (*Saier et al., 1998*).

La expulsión por las proteínas de las familias RND, SMR y MFS es impulsada por una fuerza protón motriz; la expulsión por las proteínas de la familia MATE es impulsada por un sistema antiporte de sodio. Al transporte por medio de las proteínas de las familias mencionadas se le conoce como transporte secundario. Finalmente, la hidrólisis acoplada de ATP provoca la expulsión en los transportadores primarios de la familia ABC (*Alekshun, 2007*).

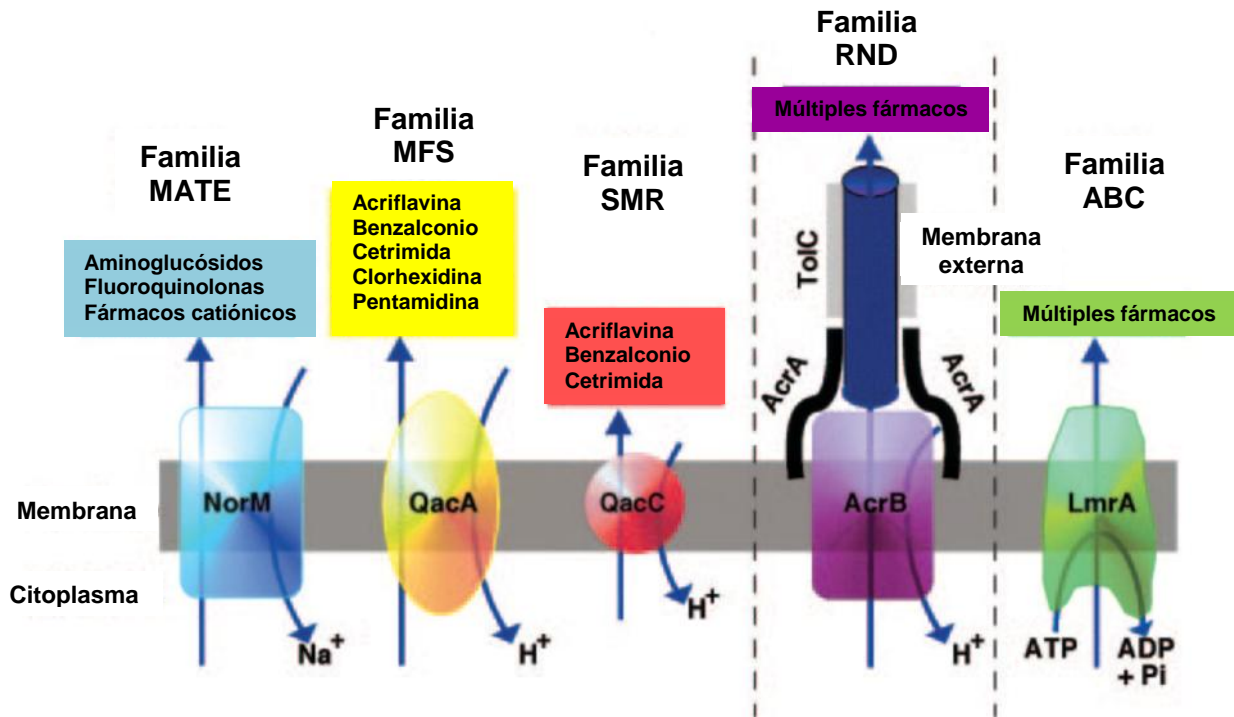


Figura 3. Diagrama de comparación de las cinco familias de bombas de expulsión. En la figura se muestran cinco ejemplos de proteínas de expulsión (NorM, QacA, QacC, AcrB y LmrA), cada una de ellas perteneciente a una familia distinta de bombas de expulsión. También se muestran ejemplos de algunos de los sustratos para cada proteína de expulsión, así como el tipo de transporte acoplado que medía el eflujo en cada caso (Piddock, 2006).

Las proteínas de expulsión también se presentan en dos tipos generales de acuerdo al número de sus componentes. Algunas, como los transportadores de tetraciclina y macrólidos (Tet y Mef, respectivamente) son sistemas de expulsión de un componente sencillo. Otros, requieren dos proteínas adicionales para desarrollar resistencia a fármacos (particularmente en microorganismos Gram-negativos), formando complejos tripartitos entre la bomba de eflujo, una proteína de fusión de membrana y proteínas de membrana externa. Estos sistemas son capaces de unir múltiples compuestos con estructuras químicas no relacionadas, por lo tanto, confieren extensos fenotipos de resistencia.

Dichos complejos tripartitos de transporte pueden ser formados por miembros de las familias RND, MFS y ABC (Alekshun, 2007) (**Figura 4**).

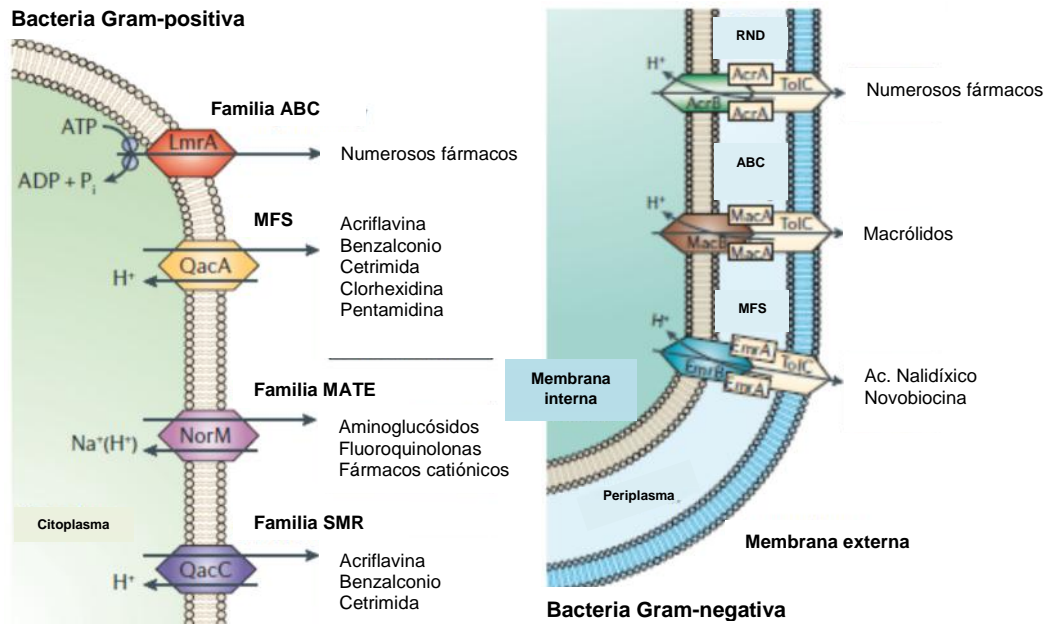


Figura 4. Representación esquemática de la estructura y localización en la membrana de las diferentes familias de bombas de expulsión. Se indican los ejemplos más comunes de las proteínas individuales de cada familia. Se muestran algunos ejemplos de antibióticos que son sustrato para cada bomba en particular (Pidcock, 2006).

•Familia MFS

Los transportadores MFS forman una superfamilia que comprende un gran número de subfamilias; de éstas, los transportadores de azúcares y de fármacos son, por mucho, los más numerosos. La familia MFS es conocida por representar el más amplio grupo de transportadores secundarios, con bombas de MDR bien caracterizadas, entre ellas, Bmr y Blt de *Bacillus subtilis*, MdfA de *E. coli*, LmrP de *Lactobacillus lactis* y, NorA y QacA de *S. aureus* (Li & Nikaido, 2009).

En bacterias Gram-positivas clínicamente importantes, las dos bombas de expulsión de multiresistencia a fármacos examinadas con más detalle pertenecen a la familia MFS: NorA de *Staphylococcus aureus* y PmrA de *Streptococcus pneumoniae*.

Estos transportadores están compuestos típicamente por aproximadamente 400 residuos de aminoácidos que se suponen arreglados en 12 hélices alfa intermembranales con un largo bucle citoplasmático entre las hélices 6 y 7 (**Figura**

5). Lo más probable es que esta estructura haya surgido por duplicación genética, ya que las dos mitades del transportador, en general, poseen secuencias afines. Un ejemplo típico de estos transportadores es NorA de *S. aureus*, que produce resistencia a fluoroquinolonas, además de colorantes e inhibidores catiónicos como la puromicina y tetrafenilfosfonio. El cromosoma de *S. aureus* contiene, por lo menos, otros dos homólogos a NorA, NorB y NorC, que producen fenotipos similares de resistencia (Nikaido, 2009).

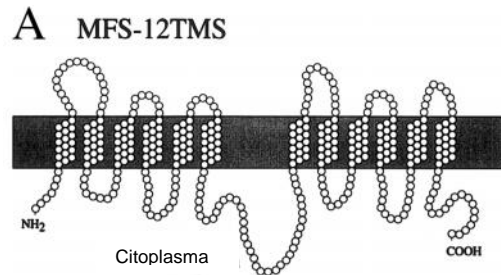


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de los transportadores MFS con 12 dominios transmembranales (Saier et al., 1998).

Un pequeño número de los transportadores MFS tiene una supuesta topología de 14 hélices alfa (**Figura 6**); no obstante, los transportadores MFS de este tipo tienden a formar un bucle citoplasmático de menor tamaño (Borges-Walmsley, 2003). Los primeros ejemplos de esta clase fueron los transportadores QacA y QacB. Estas bombas expulsan sustancias biocidas y colorantes monocatiónicos como el cloruro de benzalconio, cetiltrimetilamonio y bromuro de etidio; adicionalmente, QacA expulsa compuestos biocidas dicatiónicos como la clorhexidina (Nikaido, 2009).

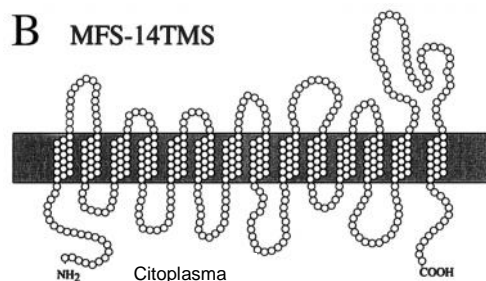


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de los transportadores MFS con 14 dominios transmembranales (Saier et al., 1998).

•Familia RND

Los transportadores pertenecientes a esta superfamilia juegan un papel muy importante en la multirresistencia en bacterias Gram-negativas. Esto es porque las bombas se asocian con otras dos clases de proteínas: una proteína perteneciente a la familia OMF (*Outer Membrane Factor*) que forma un conducto hacia la membrana externa (ejemplificado principalmente por TolC) y, una proteína que funciona como “adaptador” periplasmático, clasificada en la familia MFP (*Membrane Fusion Protein*), formando un complejo tripartito. Esta construcción permite el eflujo de los fármacos directamente hacia el medio externo, en lugar de mantenerse en el espacio periplasmático.

Esto representa una enorme ventaja, ya que, una vez exportados al medio externo, los compuestos tóxicos deberán atravesar nuevamente la membrana externa para re-ingresar a la célula bacteriana, por lo que estos transportadores funcionan de manera sinérgica con la barrera de permeabilidad que impone la presencia de una membrana externa (*Nikaido, 2009*).

Los sistemas tripartitos RND mejor caracterizados son: el sistema AcrAB-TolC de *Escherichia coli* y MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (*Li & Nikaido, 2009*).

Estos transportadores son mucho más grandes que los transportadores MFS, están compuestos típicamente por aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos.

Incluso con esta diferencia de tamaño, éstos adoptan una estructura similar de 12 hélices alfa transmembranales (**Figura 7**). Sin embargo, a diferencia de los transportadores MFS, éstos poseen dos largos dominios extracitoplásmicos entre las hélices 1 y 2 y entre las hélices 7 y 8. Se ha demostrado que estos dominios tienen un papel importante en el reconocimiento de fármacos. De forma similar a los transportadores MFS, la primera mitad de los transportadores RND generalmente se asemeja a la segunda mitad, sugiriendo nuevamente que estos

transportadores fueron originados por duplicación genética (Borges-Walmsley, 2003).

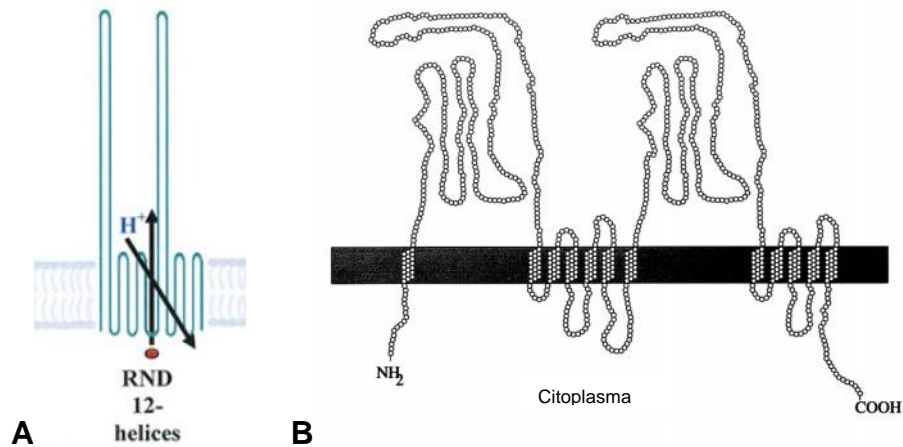


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de los transportadores RND. **A)** (Borges-Walmsley, 2003), **B)** (Saier et al., 1998).

•Familia SMR

Las bombas de eflujo de la familia SMR fueron descubiertas en un plásmido perteneciente a *S. aureus*. Posteriormente, se encontraron también codificadas por genes en el cromosoma de bacterias Gram-negativas.

Actualmente, se sabe que las proteínas SMR pueden ser codificadas en el cromosoma o en plásmidos y también se les asocia con los integrones. La especificidad de sustrato no se limita a los desinfectantes y puede extenderse a los antibacterianos clínicamente relevantes, como los aminoglucósidos. En microorganismos Gram negativos, estos transportadores exportan los sustratos sólo hacia el periplasma, ya que no forman sistemas tripartitos, sin embargo, pueden causar resistencia significativa si el sustrato es tomado consecutivamente por bombas del tipo RND con sistemas tripartitos constitutivos, como el sistema AcrAB-TolC (Li & Nikaido, 2009).

Los transportadores SMR son mucho más pequeños que aquellos pertenecientes a las familias MFS y RND y representan a las proteínas transportadoras más pequeñas conocidas.

Las bombas SMR normalmente están compuestas por 100 residuos de aminoácidos que se encuentran ordenados en 4 hélices alfa transmembranales (**Figura 8**). La bomba SMR mejor caracterizada es la EmrE de *E. coli*, un transportador multifármacos que confiere resistencia al bromuro de etidio y al metil viologen (una sustancia herbicida). Otra bomba SMR multifármacos de *P. aeruginosa* muy cercana a la bomba EmrE ha sido recientemente caracterizada y se comprobó que tiene un papel importante en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* al bromuro de etidio, acriflavina y a antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (Borges-Walmsley, 2003).

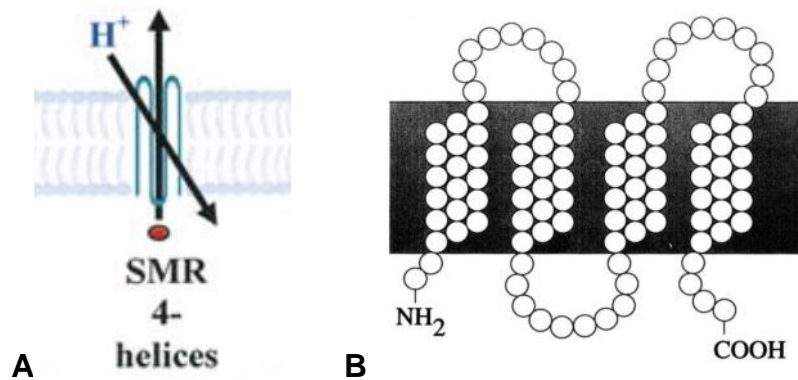


Figura 8. Representación esquemática de la estructura de los transportadores SMR. **A)** (Borges-Walmsley, 2003), **B)** (Saier et al., 1998).

•Familia MATE

Los transportadores de la familia MATE funcionan como sistemas antiporte de sodio. Presentan perfiles de sustrato generalmente más estrechos que los de los transportadores RND. A la fecha, hay sólo unos 20 transportadores MATE caracterizados, aunque las secuencias de genomas bacterianos contienen muchos más ejemplos aun por caracterizar (Li & Nikaido, 2009).

Los transportadores MATE son similares en tamaño a los transportadores MFS, están compuestos típicamente por 450 residuos de aminoácidos, los cuales se encuentran arreglados en 12 hélices alfa transmembranales; sin embargo, ellos no tienen secuencias similares a las de los miembros de la familia MFS. Esta nueva familia ha sido identificada recientemente, con la caracterización de NorM, un sistema antiporte multifármacos impulsado por iones sodio de *Vibrio*

parahaemolyticus, que confiere resistencia a colorantes, fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Otro transportador de la familia MATE, YdhE, ha sido caracterizado en *E. coli*, y se demostró que confiere resistencia a antimicrobianos catiónicos (como: ácido nalidixico, norfloxacin, ciprofloxacina, etc.).

Los transportadores MATE son una familia relativamente nueva de los transportadores de fármacos bacterianos y por tanto, de todas las familias de bombas de expulsión actualmente conocidas. Estos transportadores son los menos caracterizados. Se sabe poco sobre su estructura, regulación o mecanismo de acción (*Borges-Walmsley, 2003*).

•Familia ABC

En contraste con los organismos procariotes, el principal mecanismo de expulsión en eucariotes es dependiente de proteínas que consiguen la energía para el transporte por medio de hidrólisis de ATP (**Figura 9**). Los miembros de esta familia incluyen a la bomba de resistencia multifármacos, P-gp (glicoproteína P) y MRP (proteína de resistencia multifármacos); ambas confieren resistencia a fármacos anticancerígenos. Dichos transportadores también se encuentran en numerosos hongos patogénicos y protozoarios, en donde confieren resistencia a antimicrobianos; por ejemplo, P-gpA, un homólogo de MRP, es una bomba de arsénico/antimonio que es responsable de la resistencia al fármaco Pentosam en *Leishmania*. Adicionalmente, se han encontrado homólogos bacterianos; estos incluyen al transportador multifármacos LmrA de *Lactococcus lactis*, en donde se ha demostrado que su expresión confiere multirresistencia a fármacos y, más recientemente, el transportador MacAB de *E. coli* que está relacionado con la expulsión de antibióticos de la familia de los macrólidos (*Borges-Walmsley, 2003*).

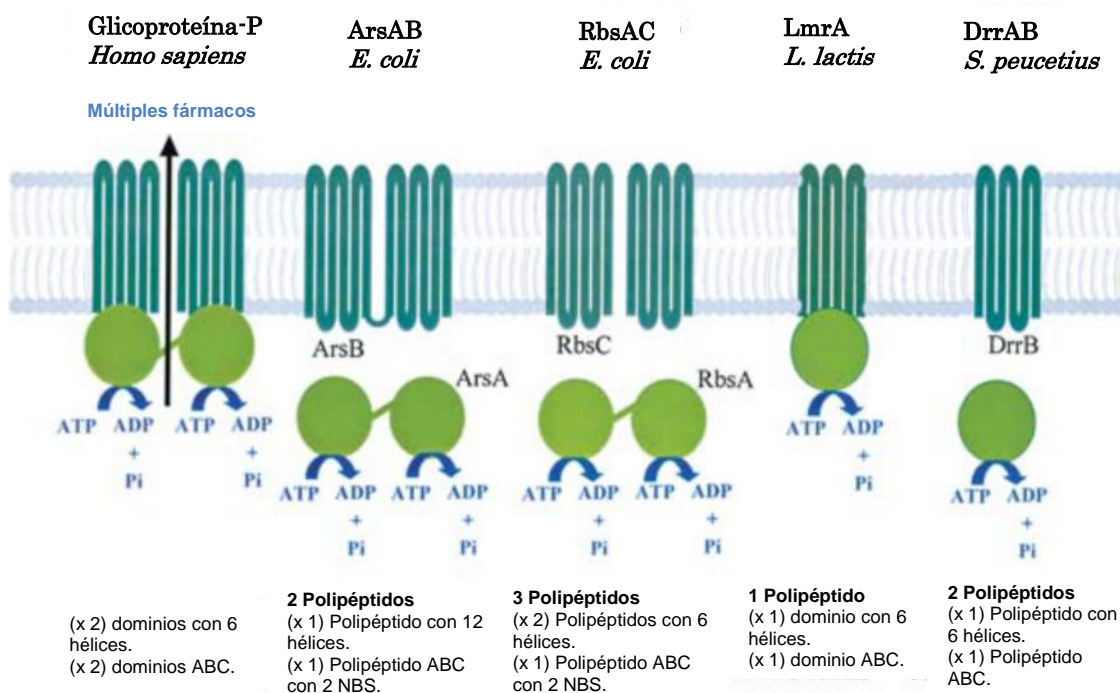


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de las bombas de eflujo de la familia ABC en distintas especies (Borges-Walmsley, 2003).

Para las bacterias Gram-negativas, las bombas de expulsión que están asociadas con resistencia clínicamente significativa a los antibióticos son las de la familia RND, mientras que para las bacterias Gram-positivas, las bombas de expulsión clínicamente importantes son miembros de la familia MFS (Pidcock, 2006).

Tabla 1. Familias de bombas de expulsión y ejemplos de algunos transportadores.

	Familias de bombas de expulsión	Ejemplos de transportadores
Sistemas antiporte impulsados por protones.	MFS	TetA(B), TetA(K), QacA, NorA, PmrA
	RND	Acr AB, Mex AB
	SMR	EmrE
Sistema antiporte impulsado por sodio.	MATE	NorM, YdhE
Sistemas acoplados a hidrólisis de ATP	ABC	LmrA, MacAB

1.2.2. Perfil de sustratos para bombas de multirresistencia a fármacos (MDR)

El fenotipo de “mutante de eflujo” (aquellos que fenotípicamente asemejan a mutantes que sobreexpresan una bomba de expulsión) es la cepa que generalmente es multirresistente a fármacos. Por ejemplo, cuando los microorganismos son resistentes (o menos susceptibles) a antimicrobianos de, al menos, tres diferentes clases de antibióticos, desinfectantes (biocidas), detergentes o colorantes.

Estos agentes incluyen de manera típica a quinolonas (ácido nalidixico, ciprofloxacina, norfloxacina), tetraciclinas, cloranfenicol, bromuro de etidio, acriflavina, dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton X-100 y triclosan, pero los agentes que se consideran como sustratos específicos para una bomba en particular son ligeramente diferentes dependiendo de la bomba y de la especie bacteriana (*Piddock, 2006*).

Se ha sugerido que algunas bombas de expulsión son pobremente expresadas *in vitro* y que un inductor de expresión está presente cuando la bacteria está creciendo en su entorno natural o en un hospedero. Sin embargo, sólo unos pocos de estos inductores naturales han sido identificados: las sales biliares y los ácidos grasos de bacterias entéricas y Triton X-100 (*Piddock, 2006*).

Un dato relevante es que las familias SMR y RND sólo incluyen en la actualidad bombas de expulsión del tipo multifármacos. Las permeasas que son específicas a algún determinado fármaco aparentemente están ausentes en estas dos familias. Tal vez la naturaleza de la construcción de sus conductos difiere de la naturaleza de los conductos de las permeasas de las familias MFS o ABC, y se impide el reconocimiento intramembranal estereoespecífico de fármacos (*Saier et al., 1998*).

En un estudio realizado por Poole, K. (2005) se elaboró un listado con algunos detalles de sustratos para bombas de expulsión específicas de bacterias. Las concentraciones mínimas inhibitorias de dichos sustratos para cepas que sobreexpresaban alguna bomba de expulsión fueron de dos, a ocho veces

mayores que aquellas cepas de la misma especie consideradas como susceptibles para el mismo sustrato. Sin embargo, en muchos casos, los incrementos en las concentraciones mínimas inhibitorias debidas a la sobreexpresión de una bomba de expulsión de MDR no confirieron la misma magnitud de incremento como lo hacen otros mecanismos de resistencia como - lactamasas, enzimas modificantes de aminoglicósidos o sustituciones en la topoisomerasa.

Del mismo modo, en aquellos mutantes en donde un gen específico para una bomba de expulsión había sido interrumpido o borrado, las concentraciones mínimas inhibitorias para los sustratos de esa bomba disminuían a tal modo que daban lugar a una cepa hiper-susceptible.

Se ha demostrado que la reserpina (un inhibidor de bombas de expulsión) *in vitro*, suprime la aparición de *S. aureus* resistente a norfloxacin (Markham & Neyfakh, 1996) y *Str. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina. Lomovskaya et al., (2001) también demostró que el inhibidor de bombas MC-207 a 110 suprime la aparición de *P. aeruginosa* resistente a levofloxacina. Recientemente se ha propuesto que la inhibición de las bombas de expulsión da lugar a altas concentraciones intracelulares de los compuestos tóxicos que son sustrato de dichos transportadores, llegando a un punto tal que no permiten la supervivencia del microorganismo.

1.2.3. Regulación

La carente especificidad en los componentes de las bombas de expulsión multifármacos, sugiere que su expresión debe ser controlada cuidadosamente, ya que su sobreexpresión descontrolada podría dar como resultado la salida de metabolitos esenciales.

A pesar de que se han llevado a cabo muchos estudios sobre los mecanismos de regulación de las bombas de expulsión en cepas mutantes producidas en los

laboratorios, los mecanismos que dan lugar al incremento en el eflujo de fármacos en los aislados clínicos se pueden clasificar en cuatro grupos (Pidcock, 2006):

- a) Mutaciones en el gen represor local. Muchos genes de bombas de expulsión de MDR de la familia RND se encuentran en operones que, a su vez, se encuentran bajo control de un gen de represión local, que usualmente es del tipo del represor TetR; por ejemplo, en *E. coli*, los genes de las bombas AcrA y AcrB se co-transcriben y se encuentran bajo el control de *acrR*. Lo mismo se aplica para los genes *acr* de otras especies. Las mutaciones en *acrR* des-reprimen y permiten la expresión de *acrB* y *acrS*, reprimen a *acrEF* y dan lugar a la sobreexpresión de la bomba de expulsión (**Figura 10**).

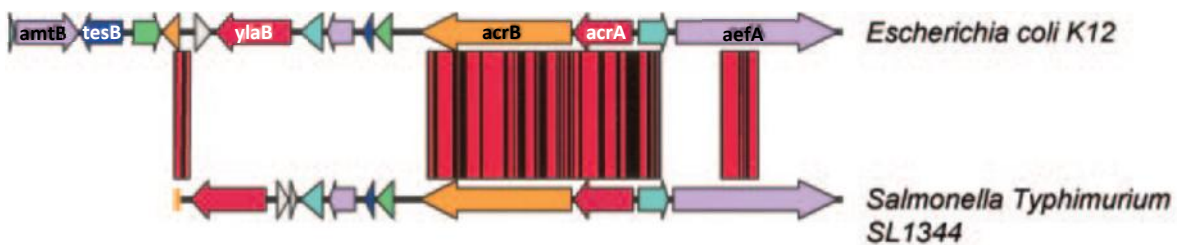


Figura 10. Comparación de la organización genética del operón *acrRAB* de *E. coli* y *Salmonella Typhimurium*. El diagrama muestra las similitudes entre los genes que codifican para bombas de eflujo de MDR pertenecientes a la familia RND de dos especies bacterianas (Pidcock, 2006).

- b) Mutaciones en un gen de regulación global. En términos de regulación fisiológica, el sistema de AcrAB ha sido el más estudiado. En primer lugar, los sistemas globales de regulación, tales como *marAB* y *soxRS* influyen en la resistencia a los antibióticos de *E. coli*. Los reguladores positivos MarA y SoxS se producen en niveles más altos en respuesta a la presencia de antibióticos y de radicales superóxido, respectivamente, y estos reguladores son conocidos por aumentar la expulsión de varios fármacos, mediada por la bomba AcrAB. Además del aumento de la transcripción del operón *acrAB*, MarA y SoxS regulan negativamente la síntesis de la porina OmpF principalmente a través del aumento de la producción de un ARN antisentido, *micF*. Como

consecuencia, la disminución en la permeabilidad de la membrana externa, tiene un efecto sinérgico que intensifica el efecto de la maquinaria de expulsión que ha sido incrementada.

En segundo lugar, otras condiciones de estrés global, tales como la adición de NaCl 0.5 M, de etanol al 4%, o la entrada a la fase estacionaria también aumentan la transcripción del operón *acrAB*. Este efecto no está mediado por *marAB* o *soxRS*. Bajo estas condiciones, la transcripción del gen represor también es mayor, mecanismo que puede impedir la sobreexpresión de la bomba *AcrAB* sin control (*Nikaido, 1996*).

- c) Mutaciones en la región promotora del gen del transportador. Se ha observado que algunas mutaciones identificadas en la región promotora de *norA* de aislados de *S. aureus* dan lugar a su sobreexpresión. Kaatz et al. mostraron específicamente que mutaciones en el nucleótido 5 del RNAm de *norA* se traducían en mutantes con sobreexpresión.

- d) Elementos de inserción hacia el extremo 5' del gen del transportador. Se ha identificado la presencia de algunas secuencias de inserción (IS) hacia el extremo 5' de los genes que codifican algún componente estructural de la bomba de expulsión o insertadas dentro del gen represor local en algunos aislados clínicos que sobreexpresan bombas de MDR. Algunas de estas IS poseen promotores o secuencias promotoras que pueden incrementar la expresión de los genes hacia el extremo 3' del gen de la bomba de expulsión de interés.

Los transportadores “multifármacos” al parecer se encuentran abundantemente en la naturaleza y, en muchos casos, se encuentran bajo una regulación global compleja. En algunos otros casos, responden a diferentes tipos de estrés y, en otros, son co-regulados por genes que no están relacionados con la resistencia a antibióticos (*Paulsen, 2003*).

Con excepción de las bombas de expulsión-MDR, un mecanismo de resistencia común sólo permite protección contra un antibiótico, o, a lo sumo, antibióticos de la misma clase. Por ejemplo, los factores determinantes de la resistencia que especifican la eritromicina-metil-transferasa (Erm) en una variedad de patógenos, son proteínas individuales que dan lugar a resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B: agentes estructuralmente únicos que comparten un blanco y mecanismo de acción común (*Alekshun, 2007*).

1.3. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son un grupo taxonómicamente diverso de cocos y bacilos Gram-positivos (**Figura 11**), anaerobios estrictos o aerotolerantes, generalmente inmóviles, no esporuladas ni pigmentados. Una característica común de las BAL es su capacidad de producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de hexosas. Como organismos fermentadores, carecen de sistemas de transporte de electrones mediado por citocromos y no poseen un ciclo de Krebs funcional (Korhonen, 2010).

Con base en los productos finales del metabolismo de la glucosa, las BAL se pueden dividir en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas.

Se pueden considerar como un grupo heterogéneo de bacterias que comprende unos 20 géneros dentro del *phylum Firmicutes*. Desde el punto de vista práctico, los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* han sido considerados como los principales de las BAL (Korhonen, 2010).

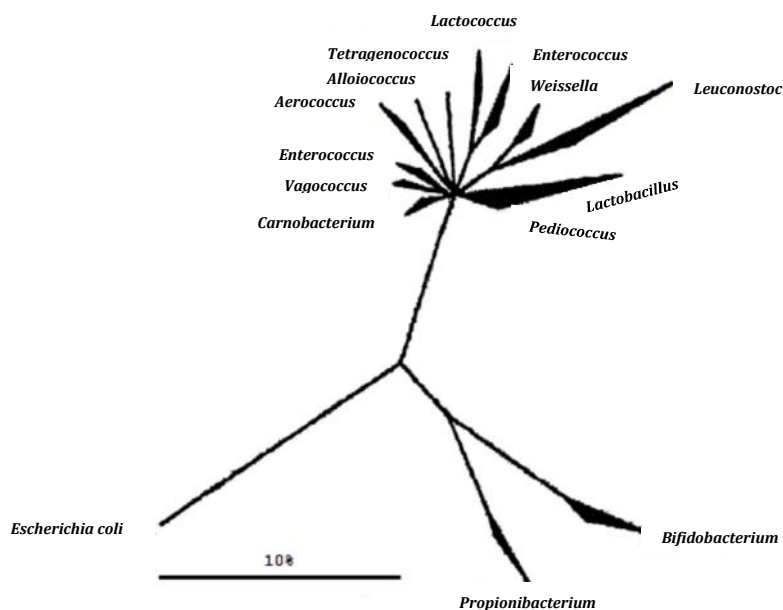


Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S del grupo de bacterias ácido lácticas (Flórez, 2007).

Las BAL son organismos ampliamente distribuidos que se pueden encontrar en muchos ambientes ricos en carbohidratos. Además, tienen una limitada capacidad biosintética, por lo que son muy exigentes nutricionalmente y requieren numerosos factores de crecimiento, incluyendo aminoácidos, vitaminas y precursores de los ácidos nucleicos. Por esta causa se encuentran en nichos ecológicos ricos en nutrientes como la superficie de las plantas y el material vegetal en descomposición (*Stiles, 1996*). Son también componentes destacados del tracto gastrointestinal y genitourinario de los vertebrados, donde cumplen un importante papel en el mantenimiento del equilibrio microbiano necesario para la salud (*Flórez, 2007*).

Estas bacterias tienen gran importancia aplicada porque se utilizan como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos fermentados como quesos, yoghurts, embutidos, encurtidos, etc., a los que imparten características sensoriales deseables y una buena capacidad de conservación (*Stiles, 1996*). En los últimos tiempos, diversas especies de este grupo se utilizan también como probióticos en hombres y animales para mantener el estado de salud o combatir las enfermedades intestinales.

El hombre ha consumido grandes cantidades de BAL con los productos fermentados desde tiempo inmemorial sin que aparecieran efectos adversos, por lo que estas bacterias se han considerado seguras desde el punto de vista de la salud.

Por otra parte, a excepción de los *Enterococcus* (*Asahara et al., 2003*), las BAL raramente producen infecciones y cuando lo hacen, se debe a que, por alguna causa subyacente, la inmunidad está severamente disminuida.

Algunas BAL se han aislado de infecciones de endocarditis, bacteremia e infecciones locales (*Ishibashi & Yamazaki, 2001; Cannon et al., 2005*). En la mayoría de los casos, la bacteria infecciosa ha demostrado provenir de la

microbiota natural del paciente. Sin embargo, hay algunos casos donde la infección ha sido asociada con el consumo de probióticos.

Uno de los aspectos de seguridad más importante de las BAL es su resistencia a los antimicrobianos y su potencial como reservorio de genes de resistencia que podrían ser transferidos a otros microorganismos, posiblemente patógenos, a través de la cadena alimenticia (Flórez, 2007).

1.3.1. Resistencia a antibióticos en BAL

Los estudios de resistencia a antimicrobianos en bacterias ácido lácticas no habían sido extensamente investigados hasta hace poco tiempo, en contraste con la situación de las especies patógenas y su resistencia a los antibióticos. Sin embargo, el interés en las bacterias ácido lácticas y sus resistencias a antibióticos recientemente ha ganado fuerza desde que se sabe que los determinantes de resistencia son capaces de transferirse entre especies bacterianas, también desde bacterias beneficiosas a las patógenas (Salyers et al., 2004).

La cadena alimenticia es considerada la principal ruta de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos, entre la población de bacterias en animales y en humanos (Aarestrup et al., 2008). Por lo anterior, en la actualidad, se ha incrementado la preocupación sobre la posible diseminación de los distintos determinantes de resistencia a los antimicrobianos por medio de la cadena alimenticia (Teuber et al., 1999).

En 1998 la organización para el proyecto de Reservorios de Resistencia a Antibióticos ROAR (por sus siglas en inglés *Reservoirs of Antibiotic Resistance*) se formó para promover los estudios de la selección y dispersión de la resistencia a antibióticos de bacterias no patógenas en el humano, durante la producción de alimentos y procesos de agricultura así como en el ambiente. Aunque muchas BAL asociadas con los alimentos han adquirido el estatus de “considerado generalmente como seguro” (por sus siglas en inglés *GRAS Generally Regarded as Safe*), el riesgo potencial para la salud debido a la transferencia de genes con resistencia a antibióticos de reservorios de BAL a bacterias nativas de la

microbiota del tracto gastrointestinal y, por lo tanto, a bacterias patógenas no ha sido completamente investigado (*Mathur & Singh, 2005*).

Dada su enorme distribución, el interés por conocer los niveles de resistencia a antibióticos en las bacterias lácticas y en otros grupos de microorganismos comensales ha aumentado en los últimos tiempos.

Las bacterias ácido lácticas no son excepción en cuanto a su capacidad de adquisición de material genético extracromosomal por medio de fenómenos de transferencia horizontal. Al respecto, los transposones son los elementos genéticos móviles más caracterizados en este tipo de microorganismos, seguido de los plásmidos de resistencia, e incluso, la descripción de sistemas de expulsión (*Teuber, 1999*).

El primer paso en la caracterización de especies de BAL como susceptibles o resistentes a antibióticos es determinar los perfiles de susceptibilidad/resistencia por métodos fenotípicos.

Cuando una cepa se desvía claramente de otras cepas de esa especie en particular, determinada con los métodos fenotípicos, su resistencia a antibióticos debe ser estudiada con métodos genotípicos. El potencial de transferabilidad de algunos genes en BAL se ha descrito en varios estudios y recientemente ha sido revisado por Ammor et al. (2007). Dos de los genes de resistencia más comúnmente encontrados en BAL, hasta ahora son: *tet(M)*, para la resistencia a la tetraciclina y *erm(B)* para resistencia a la eritromicina, seguido de los genes *cat*, que codifican la resistencia a cloranfenicol.

1.3.2. Perfiles de susceptibilidad a antibióticos en BAL

Tanto las metodologías como los perfiles de susceptibilidad a antibióticos están muy establecidas para la mayoría de los microorganismos patógenos. Existen medios y protocolos muy estandarizados y claros valores de corte para distinguir cepas sensibles de resistentes (*NCLS, 2004*).

Sin embargo, se ha dedicado menor atención a otros grupos bacterianos, entre los que podemos contar a las bacterias ácido lácticas (*Teuber et al., 1999*). Además, las BAL y las bifidobacterias no crecen bien en los medios y las condiciones de ensayo establecidas para los microorganismos de importancia clínica. Los estudios realizados hasta la fecha se han llevado a cabo utilizando una multiplicidad de métodos: difusión en disco, dilución en agar, Etest, microdilución, etc., lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos. Por estas razones, para la mayoría de los antibióticos no hay claros puntos de corte con los que separar cepas de BAL resistentes de susceptibles (*Flórez, 2007*).

Los perfiles de resistencia a antibióticos de *los Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium y Propionibacterium* son bastante distintos.

Por una parte, muchas especies son resistentes a metronidazol, ya que no tienen actividad de hidrogenasa. Todas, usualmente resultan resistentes a las sulfonamidas y trimetoprim. Estos microorganismos tienen actividades biosintéticas limitadas y carecen de la vía de síntesis del ácido fólico. Por lo tanto, son considerados como “intrínsecamente resistentes” a los agentes antimicrobianos que actúan sobre esta vía.

Por otra parte, las BAL y Bifidobacterias son susceptibles a piperacilina y piperacilina+tazobactam (*Ammor et al., 2007*).

Las especies de *Lactobacillus, Lactococcus y Leuconostoc* muestran resistencia a altos niveles de cefoxitina. Además, muchos *Lactobacillus, Pediococcus y Leuconostoc* son resistentes a altos niveles de vancomicina, mientras que muchos aislados de *Lactococcus* son muy susceptibles. En este caso, la resistencia se considera “intrínseca” en la mayoría de las BAL porque el blanco del antibiótico está ausente y no es comparable con la resistencia adquirida y transmisible a vancomicina codificada por plásmidos que se ha encontrado en especies de *Enterococcus*.

Algunas bacterias ácido lácticas de las que se tienen reportes sobre su resistencia antibiótica son (Teuber, 1999):

- Bifidobacterium:

Resistente a vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, ácido fusídico, trimetoprim, norfloxacin, ácido nalidixico, metronidazol, polimixina B y colistina (Mathur & Singh, 2005).

- Enterococcus:

Son intrínsecamente resistentes a cefalosporinas y a bajos niveles de aminoglicósidos y clindamicina. En este caso, cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas tanto de alimentos, como de pacientes son bastante variables en cuanto a sus perfiles de resistencia debido a distintos rasgos de resistencia adquirida. Una posible guía en este caso, es la cepa de *Enterococcus faecium* 68, la cual es utilizada como probiótico. Esta cepa fue aislada alrededor de 1920 en la era pre-antibiótica. Es resistente intrínsecamente a kanamicina, estreptomina y oxacilina (Mathur & Singh, 2005).

- Lactococcus

La especie más estudiada de este género es *L. lactis*. Es usualmente susceptible a los antibióticos con espectro para Gram-positivos (macrolidos, bacitracina, eritromicina, lincomicina, novobiocina, teicoplanina y vancomicina), a los antibióticos de amplio espectro (rifampicina y cloranfenicol) y a los beta-lactámicos (penicilina, ampicilina, amoxicilina, piperacilina, ticarcilina e iminipem). Presentan susceptibilidad variable a tetraciclinas, cefalotina, nitrofurantoina y cefotetan.

La mayoría de las especies de *Lactococcus* son resistentes a metronidazol, cefoxitina, trimetoprim, a los antibióticos con espectro para Gram-negativos y a los aminoglicósidos (gentamicina y kanamicina).

Algunas cepas de *L. lactis* han mostrado ser resistentes a cloranfenicol, clindamicina, estreptomina, eritromicina y tetraciclina. Con respecto a lo anterior, se han encontrado varios determinantes de resistencia a estos agentes antimicrobianos codificados en plásmidos (para tetraciclinas: *tet(S)*, *tet(M)*), además de otros para cloranfenicol y estreptomina) (Ammor et al., 2007).

Adicionalmente a los mecanismos de resistencia encontrados en dichos elementos genéticos móviles, los sistemas generales de detoxificación podrían contribuir a aumentar las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas susceptibles de *Lactococcus* (Ammor et al., 2007).

- *Lactobacillus*:

Con respecto a los inhibidores de síntesis de pared celular, los *Lactobacillus* usualmente son sensibles a penicilinas (piperacilina, ampicilina) e inhibidores de -lactamasas. Sin embargo, son resistentes a oxacilina y cefalosporinas (cefoxitina, ceftriaxona). El principal mecanismo de resistencia en estos casos parece ser la impermeabilidad de la pared, ya que las especies de este género carecen de un sistema de transporte de electrones mediado por citocromos, sin embargo, la cooperación de otros mecanismos “no-específicos”, como los transportadores multi-fármacos y la existencia de defectos en la autólisis de pared celular se deben de tomar en cuenta para las diferencias que existen en los niveles de resistencia/susceptibilidad entre las especies de este género (Ammor et al., 2007).

Se sabe que los *Lactobacillus* presentan altos niveles de resistencia a los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) ya que carecen del sitio blanco de los mismos (resistencia intrínseca). Generalmente son susceptibles a los antibióticos que inhiben la síntesis proteica (cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y tetraciclina) y son más resistentes a aminoglicósidos (neomicina, kanamicina, estreptomina y gentamicina) (Flórez, 2007).

Los lactobacilos son usualmente resistentes a la mayoría de los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (enoxacina, pefloxacina, norfloxacina, ácido nalidixico, sulfametoxazol y metronidazol) (Danielsen & Wind, 2003). Muchas de estas

resistencias parecen ser intrínsecas aunque se requieren más estudios para su caracterización.

Con respecto a la tetraciclina, se ha observado una resistencia variable en las distintas especies de *Lactobacillus*, probablemente debido a la extensa variabilidad de mecanismos que confieren distintos niveles de susceptibilidad a dicho antibiótico. Algunas especies de *Lactobacillus* resistentes a tetraciclina poseen el gen *tet(M)*, que codifica una proteína de protección ribosomal. Además de *tet(M)*, en otras cepas se han identificado otros genes como, *tet(K)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(36)*, *tet(O)* y *tet(Q)* que codifican proteínas secretoras o de protección ribosomal (Flórez, 2007).

- *Leuconostoc*:

Son resistentes a los glicopéptidos, cefoxitina y metronidazol. Usualmente son resistentes (o parcialmente resistentes) a ácido nalidixico, gentamicina, kanamicina, estreptomina, nitrofurantoina, sulfadiazina y trimetoprim. La mayoría de las especies de *Leuconostoc* son susceptibles a cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y tetraciclina (Ammor et al., 2007).

En la actualidad, la multiresistencia a antibióticos parece ser una característica poco común entre las especies de BAL, sin embargo, se ha incrementado el número de cepas aisladas que exhiben niveles atípicos de resistencia a dichos fármacos (especialmente a tetraciclina y eritromicina). Muchos de estos aislados poseen genes de resistencia a antibióticos que se piensa, han sido adquiridos por transferencia horizontal, aunque quedan muchos estudios por realizar para encontrar las bases genéticas y moleculares de estos microorganismos multiresistentes.

1.3.3. Bombas de expulsión de multirresistencia en BAL

A diferencia de las bacterias Gram-negativas, las bombas de multirresistencia en bacterias Gram-positivas usualmente no pertenecen a la familia RND. A menudo, son proteínas simples pertenecientes a las familias MFS, MATE, SMR o ABC.

En bacterias ácido lácticas, las bombas de expulsión de multirresistencia han sido poco estudiadas. El microorganismo más estudiado al respecto ha sido *Lc. lactis*, seguido de algunas especies del género *Lactobacillus*.

- *Lactococcus lactis*

Lc. lactis es una bacteria ácido láctica no-patogénica que sirve como organismo modelo para el estudio de las bombas MDR en bacterias.

El genoma de *Lc. lactis* contiene 40 probables genes que codifican para transportadores de agentes tóxicos, algunos de los cuales han sido caracterizados con detalle (*Li & Nikaido, 2009*).

En este microorganismo se pueden distinguir dos tipos de transportadores MDR que median la resistencia a cationes hidrofóbicos tóxicos y a antibióticos. El primero, es el transportador LmrP, un sistema antiporte de protones; el segundo está representado por los transportadores LmrA y LmrCD, que exportan compuestos tóxicos acoplados a la hidrólisis de ATP.

Cuando alguno de los dos tipos de transportadores es inactivado, la expresión del otro tipo de transportador se incrementa. Hasta ahora, los intentos por inactivar ambos tipos de transportadores no han sido exitosos, haciendo énfasis en la importancia de estas proteínas en la viabilidad de *Lc. lactis*, incluso en medios en donde no hay presencia de compuestos tóxicos (*Poelarends et al., 2002*).

LmrP

LmrP pertenece a la familia MFS de bombas de eflujo. Cataliza la excreción de compuestos catiónicos lipofílicos acoplado a un intercambio de protones y es responsable de la resistencia de *L. lactis* a una gran variedad de antibióticos, en particular, de aquellos pertenecientes al grupo de los macrólidos y tetraciclinas (*Konings et al., 2000*).

LmrA

LmrA pertenece a la familia ABC de bombas de expulsión. Tiene la mitad del tamaño del transportador humano MDR1 glicoproteína-P, el cual es un dímero heterólogo. La glicoproteína-P tiene un papel crucial en la resistencia de células cancerígenas contra agentes quimioterapéuticos. Sorprendentemente, el transportador LmrA presenta alrededor de 50% de similitud con cada mitad de la glicoproteína-P y funciona como un dímero homólogo. Estas observaciones demuestran que los transportadores MDR pertenecientes a la familia ABC han sido extensamente conservados tanto entre bacterias como en humanos. LmrA no solamente es estructuralmente homólogo a la glicoproteína-P, sino también funcionalmente, además de que expulsa el mismo tipo de sustratos y es sensible a moduladores similares a los de dicha glicoproteína (Konings *et al.*, 2000).

La expresión de LmrA resulta en un incremento en la resistencia a los aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos, quinolonas, estreptograminas, tetraciclinas y cloranfenicol (Putman *et al.*, 2000).

LmrCD

L. lactis desarrolla rápidamente un fenotipo de MDR después de una exposición prolongada a una gran variedad de compuestos tóxicos no relacionados estructuralmente como: daunomicina, Hoechst 33342, bromuro de etidio, rodamina 6G y colatos. Este fenotipo se debe a la expresión constitutiva de los genes *lmrCD*, que codifican para un transportador de MDR de la familia ABC, el cual excreta estos compuestos de la célula. La expresión de los genes *lmrCD* es controlada por un regulador transcripcional local llamado LmrR. LmrR actúa como un represor de la expresión de los genes *lmrCD* sensible a la presencia de compuestos tóxicos.

La mayoría de los reguladores transcripcionales involucrados en la MDR pertenecen a las familias AraC, MarR, MerR y TetR. Sin embargo, LmrR

pertenece a la familia PadR, una familia de proteínas regulatorias poco caracterizada involucrada en la regulación de mecanismos de detoxificación (Agustiandari et al., 2011).

El crecimiento de *L. lactis* en presencia de concentraciones crecientes de compuestos tóxicos resulta en un incremento del eflujo de dichos compuestos en un proceso dependiente de energía, sugiriendo que la expresión de estos transportadores se encuentra sobre-regulada (Poelarends et al., 2002).

En este contexto, ha sido observada una sobre-regulación de *ImrCD* en cepas resistentes, mientras que la delección de los genes *ImrCD* conlleva a la hiper-susceptibilidad de la cepa a una amplia gama de compuestos tóxicos, mientras que el fenotipo de resistencia puede restablecerse mediante la sobreexpresión de *ImrCD* desde un plásmido (Zaidi et al., 2008).

Mdt(A)

Originalmente descrito en *L. lactis*, es una bomba de eflujo codificada en un plásmido que confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y tetraciclinas. Se han identificado mutaciones en el gen *mdt(A)* en cepas susceptibles de *Lactococcus garvieae* (Li & Nikaido, 2009).

- *Lactobacillus*

Las especies de *Lactobacillus* constituyen uno de los principales grupos de BAL con un papel importante, principalmente, en la promoción de la salud intestinal y vaginal.

En este género, se ha encontrado que el transportador multifármacos perteneciente a la familia ABC, HorA, un homólogo de LmrA de *L. lactis*, está relacionado con la resistencia a compuestos del lúpulo (*Humulus lupulus*) en *Lactobacillus brevis*. Un transportador adicional no identificado, dependiente de

protones, también contribuye a la resistencia a estos compuestos (Li & Nikaido, 2009).

HorA

Las bacterias ácido lácticas fermentadoras de cerveza han mostrado poseer un mecanismo de resistencia a compuestos del lúpulo codificado en un plásmido, en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP (Ulmer et al., 2000).

La proteína responsable es HorA, un homólogo a transportadores de MDR de mamíferos; además, es un homólogo funcional y estructural del transportador LmrA de *Lc. lactis*. Incluso se ha encontrado que las secuencias de aminoácidos entre HorA y LmrA son 52% idénticas (Ulmer et al., 2002).

En un estudio, Sami, M., et al. (1997) investigaron la prevalencia del gen *horA* en 95 cepas de *Lactobacillus brevis* y encontraron que este mecanismo de resistencia es un prerrequisito que permite su crecimiento en la cerveza (Ulmer et al., 2000).

tet

En varias especies de *Lactobacillus* se ha observado resistencia a tetraciclina debido a la presencia de los genes de eflujo *tet(K)*, *tet(L)* o *tet(Z)* y a los genes de protección ribosomal *tet(M)* o *tet(W)*. En la especie tetraciclina-resistente, *Lactobacillus sakei*, se encontró la coexistencia de dos mecanismos diferentes de resistencia a tetraciclina: los genes de eflujo *tet(L)* portados en un plásmido y el gen *tet(M)* localizado en el cromosoma y asociado a un transposón (Li & Nikaido, 2009).

2. Justificación

Las bacterias ácido lácticas procedentes de alimentos fermentados forman parte de la dieta del hombre y de otros animales desde tiempo inmemorial. En los alimentos fermentados elaborados con leche cruda, estos microorganismos conviven con muchos otros tipos, incluyendo representantes patógenos. Especies de lactobacilos y bifidobacterias colonizan las mucosas del hombre y los animales superiores poco después del nacimiento, participando en el mantenimiento del equilibrio microbiano necesario para la salud.

La problemática de la resistencia a antibióticos en poblaciones comensales o beneficiosas no está bien estudiada (*Teuber et al., 1999; Salyers et al., 2004; Mathur y Singh, 2005*). De hecho, para muchas de estas bacterias no existen medios de cultivo apropiados en los que se puedan llevar a cabo los ensayos, ni procedimientos estandarizados que faciliten la comparación de los datos. Tampoco existen puntos de corte reconocidos para diferenciar los organismos resistentes de los sensibles.

Por otra parte, en la actualidad se encuentran en aumento los reportes de microorganismos resistentes y multirresistentes a antibióticos que no son necesariamente considerados clínicamente relevantes. El uso indiscriminado de dichos fármacos durante muchos años ha generado una presión selectiva sobre los microorganismos en distintas regiones del mundo, de acuerdo a la variedad de antibióticos más utilizados en cada punto geográfico. En muchas ocasiones, no es posible establecer la relación que existe entre la resistencia a antimicrobianos encontrada, con su origen. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las formas por las que los microorganismos se han vuelto resistentes son esencialmente debidas a la extraordinaria flexibilidad genética que poseen las bacterias que, entre otras cosas, involucra la transferencia horizontal de genes. Los flujos génicos que diseminan las resistencias entre microorganismos beneficiosos y patógenos no están del todo comprendidos.

Las bacterias utilizan distintos mecanismos para desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos (inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula). Estos mecanismos son bastante específicos para un antibiótico o alguna familia de antibióticos, sin embargo, hay otros mecanismos más generales de resistencia, en donde el acceso del antimicrobiano inalterado hasta su sitio de acción es prevenido por barreras de baja permeabilidad a fin de disminuir la entrada del antimicrobiano a la célula, o también mediante el bombeo del antimicrobiano fuera de la célula, estos últimos sistemas son conocidos como *bombas de expulsión*.

En su ambiente natural, las bacterias deben enfrentarse con moléculas tóxicas de origen natural (alcaloides de plantas, sales biliares), productos metabólicos nocivos, péptidos antimicrobianos y metabolitos secundarios como los antibióticos. Un mecanismo ampliamente distribuido para contrarrestar la acción de dichas moléculas es su secreción fuera de la célula por medio de transportadores de membrana de multirresistencia (MDR).

La sobre-expresión de bombas de expulsión de MDR disminuye la concentración intracelular de los compuestos, haciendo que estos se encuentren en sub-dosis tóxicas, provocando que la célula se adapte al compuesto y que, tras varias generaciones, se vuelva tolerante o resistente al mismo.

Además de la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal, es posible que la resistencia a los antibióticos que se utilizan en medicina humana y veterinaria sea un proceso mediado por bombas de expulsión, como subproducto de la función fisiológica de estas bombas que, en un medio de estrés (generado por una presión selectiva constante), su sobre-expresión podría ser benéfica para la supervivencia de algunas bacterias (*Piddock, 2006*).

Cuando se observa un fenotipo de multirresistencia a una gran cantidad de antibióticos, pertenecientes además a distintas familias, resulta poco probable (aunque no imposible) que dicho fenotipo esté relacionado a la adquisición de una

gran cantidad de genes de resistencia por medio de elementos genéticos móviles, involucrando varios eventos de transferencia horizontal de genes entre los microorganismos o un solo evento de transferencia horizontal con un elemento genético móvil portador de una gran cantidad de genes de resistencia. En estos casos puede ser factible que el mecanismo involucrado en la multirresistencia asociada esté mediado por sobreexpresión de bombas de expulsión.

En un estudio previo (*Trejo-Muñúzuri, 2010*) se propuso que la multirresistencia asociada a cepas aisladas de carnes destinadas al consumo humano, las cuales no presentaron elementos genéticos móviles (plásmidoR ó integrón1) podría estar mediada por un mecanismo de sobreexpresión de bombas de expulsión.

Por otra parte, Jimenez-Castellanos (2011) sugiere que hay una sobreexpresión de bombas de expulsión en presencia de bromuro de etidio (un sustrato para varias de las bombas de expulsión ampliamente distribuidas entre procariotes) en bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de distintos puntos de piel humana, las cuales carecen de elementos genéticos móviles.

La medición de la acumulación de antibióticos y la contribución de la actividad de eflujo ha demostrado ser importante para la comprensión de los mecanismos de resistencia a muchos antibióticos y de cómo las bacterias pueden volverse multirresistentes. Las bombas de multirresistencia a fármacos a menudo tienen una amplia gama de sustratos, este hecho permite la detección de su actividad mediante la medición de la acumulación de sustratos como antibióticos o una gama de sustratos fluorescentes, que pueden ser fácilmente utilizados como marcadores de actividad de eflujo (*Webber & Coldham, 2010*).

La espectroscopía de fluorescencia es un método que ofrece un panorama general del equilibrio entre la entrada y salida de un sustrato determinado como resultado de la actividad de eflujo de una o varias bombas de expulsión (*Paixão et al., 2009*).

Uno de los sustratos comúnmente utilizados en los métodos fluorométricos para la evaluación de la actividad de las bombas de eflujo es el bromuro de etidio, ya que se sabe que es un sustrato común para un gran número de bombas de expulsión.

La resistencia bacteriana al bromuro de etidio se conoce desde hace mucho tiempo. Los mecanismos de resistencia al bromuro de etidio son sistemas de eflujo que se encuentran localizados en la membrana y pueden ser divididos en dos grupos: a) polipéptidos que son transportadores secundarios, funcionando principalmente como sistemas de antiporte de protones y, b) transportadores primarios acoplados a la hidrólisis de ATP (*Bolhuis et al., 1994*).

Los sistemas de eflujo de bromuro de etidio de ambos grupos tienen diferente especificidad, sin embargo, *todos* confieren resistencia cruzada y/o catalizan la expulsión de varios compuestos tóxicos no relacionados estructuralmente (*Bolhuis et al., 1994*). Esta característica particular, hace del bromuro de etidio un sustrato conveniente para establecer una posible relación entre la actividad de los sistemas de eflujo y un fenotipo de multirresistencia a antibióticos.

Ha sido muy cuestionada si la asociación entre la multirresistencia a fármacos y la sobreexpresión de una bomba de expulsión es significativa en las bacterias resistentes a antibióticos que son comúnmente aisladas de humanos, animales y, actualmente, de microorganismos comensales o beneficiosos. Por consiguiente, es importante determinar la prevalencia de la sobreexpresión de sistemas de eflujo en aislados clínicos, de medicina veterinaria y de microorganismos comensales para que, entonces, la relevancia clínica de la multirresistencia a fármacos conferida por bombas de expulsión específicas pueda ser establecida.

De acuerdo a lo anterior y tomando en cuenta el hecho de que la cadena alimenticia es una de las principales fuentes de reservorio de microorganismos resistentes y multirresistentes a antibióticos, es posible que la multirresistencia asociada a bacterias ácido lácticas se encuentre mediada por mecanismos de sobreexpresión de dichos transportadores.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Establecer una relación entre el fenotipo de multirresistencia a antibióticos y la sobreexpresión de bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos en bacterias ácido lácticas de los géneros *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus*.

3.2. Objetivos particulares

- Examinar los perfiles de resistencia a antibióticos en las cepas de bacterias ácido lácticas en estudio.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de bromuro de etidio en las cepas de bacterias ácido lácticas en estudio.
- Evaluar la acumulación de bromuro de etidio en las cepas de bacterias ácido lácticas en estudio.
- Evaluar la sobreexpresión de bombas de expulsión de MDR en las cepas de bacterias ácido lácticas en estudio como posible mecanismo de multirresistencia a antibióticos.

4. Hipótesis

Es posible que el mecanismo que contribuye a la multirresistencia de muchas cepas de bacterias ácido lácticas frente a un gran número de antibióticos esté asociado a la sobreexpresión de bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos y compuestos tóxicos.

5. Materiales y métodos

5.1. Esquema general de trabajo



5.2. Obtención y activación de cepas

Las distintas cepas de bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus* se obtuvieron de la colección de cepas aisladas de pozol del laboratorio 324 del conjunto E de la facultad de Química de la UNAM. Las cepas control de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 6538 se obtuvieron del cepario de la Facultad de Química de la UNAM, edificio A, laboratorio 1-C. La cepa control de *S. aureus* ATCC 29213 se obtuvo del Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Las bacterias ácido lácticas de los géneros *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* se activaron en medio de cultivo líquido APT y se incubaron a 30°C. Los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* se activaron en medio de cultivo líquido MRS y se incubaron a 37°C. A las 24 h de crecimiento todas las cepas se colocaron en medio APT con 0.3% de agar y 0.5 g de CaCO₃ por litro para su conservación de 2 a 3 meses.

5.3. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Para las pruebas de sensibilidad a antibióticos se siguió el método descrito por Bauer-Kirby, siguiendo las recomendaciones del procedimiento protocolo 23 (NCCLS, 1984).

Las cepas de bacterias ácido lácticas se sembraron en forma masiva con hisopo en cajas de Agar MRS, a partir de muestras con crecimiento previo de 24 h ajustadas a 0.5 de turbidez en la escala de McFarland, posteriormente se colocaron multidiscos de antibiótico (Multibac-I.D.) correspondientes a bacterias Gram-positivas o, discos individuales (Bio-Rad) correspondientes a antibióticos no incluidos en los multidiscos. Las cajas de agar MRS de los géneros *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* se incubaron durante 24 h a 30°C, mientras que las cajas de agar MRS de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* se incubaron durante 24 h a 37°C.

Para las cepas control de *S. aureus* se siguió el procedimiento antes descrito. El medio de cultivo utilizado en estos casos fue Agar para antibióticos No.1. Las cajas de agar se incubaron durante 24 h a 37°C.

5.4. Tolerancia a bromuro de etidio

5.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de bromuro de etidio. Para ello, se inocularon tubos de ensayo con 50 µL de cepas de 24 h de crecimiento ajustadas a 0.5 de turbidez en la escala de McFarland y se adicionaron los volúmenes necesarios en cada caso para obtener concentraciones de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL y 80 µg/mL de bromuro de etidio en cada tubo. Se colocaron tubos no inoculados conteniendo únicamente el medio de cultivo adicionado de bromuro de etidio como controles negativos, también se inocularon tubos con medio de cultivo puro como controles positivos. Los tubos se incubaron

a 30°C o a 37°C, según el caso y se revisó el crecimiento (turbidez) a las 24 h, 48 h y 1 semana de incubación.

La CMI se definió como la menor concentración de bromuro de etidio en la que se observó completamente inhibido el crecimiento microbiano (ausencia de turbidez) después de 48 h de incubación como periodo máximo.

5.4.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Esta prueba se realizó para determinar si el bromuro de etidio producía un efecto bacteriostático o bactericida en las concentraciones empleadas, y, en este último caso, calcular la concentración mínima bactericida (CMB). Se inocularon por estría recta cajas de agar MRS o agar BHI, según el caso de las cepas empleadas, a partir de los tubos utilizados en la prueba de CMI con 24 h de incubación. Las cajas de agar se incubaron durante 24 h a 30°C o a 37°C, según el caso de las cepas empleadas.

La CMB se definió como la menor concentración de bromuro de etidio en la que no se observó crecimiento bacteriano en un medio de cultivo sólido.

5.5. Acumulación de bromuro de etidio

Para esta prueba se siguió un procedimiento modificado al descrito por Kaatz et al. (2000) y Patel et al. (2010). Se partió de cepas de crecimiento previo de 24 h, las cepas se ajustaron a una turbidez de 0.4 en la escala de McFarland. Una vez ajustadas se incubaron con una concentración de 10 µg/mL de bromuro de etidio durante 25 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a centrifugar para concentrar las células en una pastilla y eliminar el exceso de medio de cultivo con bromuro de etidio. La pastilla de células se resuspendió en 4 mL de medio de cultivo y se homogenizó. La intensidad de fluorescencia (en unidades relativas) de la suspensión formada se leyó en un espectrofluorómetro (Hitachi) durante un periodo de 30 min a una $\lambda_{excitación}=540$

nm y una λ análisis=545 nm con un nivel de sensibilidad de 4. Las pruebas se realizaron por duplicado.

El criterio empleado para tomar como una diferencia significativa de expresión de bombas de expulsión fue el sugerido por Patel et al. (2010). Bajo este criterio, debe existir una diferencia de al menos 20% en la intensidad de fluorescencia entre las cepas de prueba y las cepas control.

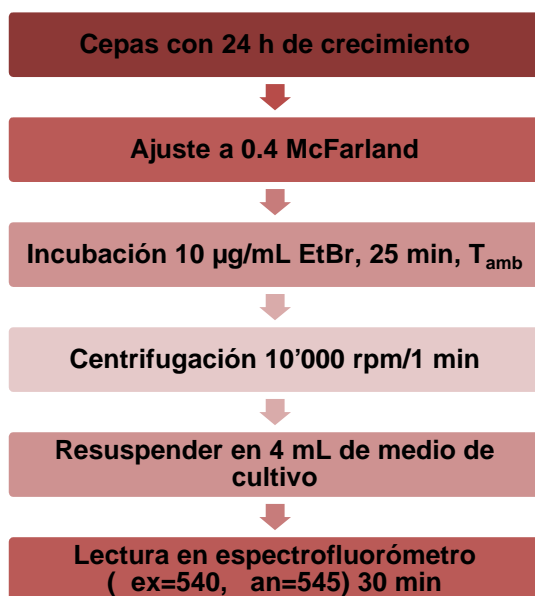


Figura 12. Esquema del procedimiento realizado para evidenciar la acumulación de bromuro de etidio por fluorometría.

5.6. Expresión de bombas de expulsión

5.6.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total se utilizó el sistema comercial “SV Total RNA Isolation System” de Promega. El procedimiento seguido para la obtención del ácido nucleico fue el siguiente:

- Se creció cada cultivo de BAL en tubos con 5 mL de medio MRS y se incubó toda la noche a 30°C. Al día siguiente, se sembraron los cultivos y se dejaron crecer el tiempo necesario hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.6-1.0.

Para las cepas control de *S. aureus* se siguió el procedimiento antes descrito. En este caso el medio de cultivo utilizado fue BHI y los tubos se incubaron a 37°C.

Nota: No se debe utilizar el cultivo de la noche anterior para el aislamiento de ARN.

- Se centrifugó 1 mL del cultivo a 14'000 r.p.m. durante 2 min.
- Se removió el sobrenadante cuidadosamente, secando lo más posible.
- Se resuspendió la pastilla obtenida en 100 µL de amortiguador TE (Tris base 1 M pH 7.6 y EDTA 0.5 M pH 7.5) recién preparado, adicionado de lisostafina (0.5 mg/mL) y lisozima (10 mg/mL). Se tapó el tubo y se mezcló (**Tabla 2**).

Tabla 2. Mezcla de incubación para romper pared celular.

	Volumen (~L)
Amortiguador TE	83
Lisozima (10 mg/mL)	12
Lisostafina (0.5 mg/mL)	5
TOTAL	100

- Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se agregaron 75 µL de “RNA Lysis Buffer”.
- Se agregaron 350 µL de “RNA Dilution Buffer” y se mezcló por inversión.
- Se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 1 min.
- Se agregaron 200 µL de etanol 95% al sobrenadante y se mezcló pipeteando 3 a 4 veces. Esta mezcla se transfirió a la canasta sobre la columna.
- Se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 1 min.
- Se tomó la canasta sobre la columna y se retiró el líquido del tubo de recolección. Se colocó nuevamente la canasta en el tubo de recolección.
- Se agregaron 600 µL de “RNA Wash Solution” a la canasta.
- Se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 1 min.
- Los residuos del fondo de la columna se desecharon y, se preparó al momento, por cada muestra, la “mezcla de incubación de DNAsa” (**Tabla 3**)

(en un tubo para centrifuga de 100 μL estéril) manteniéndola en baño de hielo.

Tabla 3. Mezcla de incubación de DNAsa.

	Volumen (~L)
“Yellow Core Buffer”	40
MnCl ₂ [0.09 M]	5
DNAsa 1	5
TOTAL	50

- Se aplicaron los 50 μL de la “mezcla de incubación de DNAsa” directamente en la membrana.
- Se dejó incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 15 min.
- Se agregaron 200 μL de “DNAsa Stop Solution” a la canasta.
- Se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 1 min, posteriormente se retiraron los desechos.
- Se agregaron 600 mL de “RNA Wash Solution” y se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 1 min.
- Se desecharon los residuos y se agregaron 250 μL de “RNA Wash Solution”, posteriormente se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 2 min.
- La canasta se colocó en un tubo para microcentrifuga nuevo y se añadieron 100 μL de “Nuclease Free Water”. Se dejó reposar de 1-2 min.
- Finalmente, se centrifugó a 14'000 r.p.m. durante 1 min y el sobrenadante se guardó a -70°C para su conservación.

5.6.2. Determinación de la concentración de ARN

La concentración de ARN obtenida se determinó por medio del espectrofotómetro automatizado NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para ello, se homogeneizaron las muestras de ARN obtenido por agitación previo a la lectura, se tomaron 2 μL de cada muestra y se colocaron en el equipo, obteniendo las lecturas de concentración correspondientes (ng/ μL). Las mediciones se realizaron por duplicado.

5.6.3. RT-PCR

Las cantidades aproximada de ARNm de los genes en estudio, para cada muestra, se determinaron mediante transcripción reversa en un solo paso con la utilización del equipo comercial “One Step RT-PCR Kit” de Qiagen. (**Tabla 4**)

Tabla 4. Mezcla de reacción para RT-PCR.

Reactivo	Volúmen (-L)	Concentración final
Agua libre de RNAsa	11	-
5x QIAGEN One Step RT-PCR Buffer	5	1x
dNTP Mix	1	400 µM de cada dNTP
Oligonucleótido R	1	1 µM
Oligonucleótido F	1	1 µM
QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix	1	-
ARN Templado	5	100 ng/reacción
TOTAL	25	

Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador de gradiente (“T personal” Biometra) para seleccionar la temperatura de alineamiento más adecuada para cada reacción (**Tabla 5**).

Tabla 5. Condiciones utilizadas en el termociclador para la reacción de RT-PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Transcripción reversa	50	30
Activación inicial PCR	95	5
Desnaturalización	95	1
Alineamiento	50-64	1
Extensión	72	1
	30 ciclos	
Extensión final	72	5
Pausa	4	-

Las temperaturas de alineamiento finalmente elegidas para cada uno de los genes en estudio fueron las siguientes (**Tabla 6**):

Tabla 6. Temperaturas de alineamiento determinadas para cada gen en estudio.

Microorganismo	gen	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>secY</i>	63.5
	<i>norA</i>	63.5
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>secY</i>	55
	<i>ImrD</i>	63.5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>secY</i>	60
	<i>ImrA</i>	52

El gen *secY* codifica para una proteína de membrana altamente conservada que forma parte del translocón de la vía de secreción Sec-dependiente. Los genes *secY* se eligieron como referencia, ya que se expresan en forma relativamente constante dentro de la célula.

Por otra parte, los genes *lmrD* y *lmrA* codifican para dos de las proteínas de eflujo mayormente asociadas con la multirresistencia a una gran variedad de agentes tóxicos dentro de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Las proteínas LmrD y LmrA corresponden a la familia ABC de bombas de eflujo de MDR y se encuentran codificadas en el cromosoma.

El gen *norA* codifica para la bomba de eflujo de MDR con mayor relevancia clínica de *S. aureus*. Pertenece a la familia MFS de bombas de expulsión con 12 segmentos transmembranales y se encuentra codificada en el cromosoma bacteriano.

Los productos de RT-PCR de cada una de las muestras en estudio se obtuvieron con oligonucleótidos gen-específicos con las siguientes características:

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (pb)
<i>secY</i>	F: ATCCCAAGGTTCTCAAGGT R: CACCTTGTTTTGCCATTCT	174
<i>norA</i>	F: TTATATCGCCGTTTGGTGGT R: TCGCTGACATGTAGCCAAAG	246

<i>Lactococcus lactis</i>		
Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (pb)
<i>secY</i>	F: GTGGTCAAACAAGGGGAAA R: TTGTTACCCATCCAAGTGA	217
<i>lmrD</i>	F: GGCAACTTCACATGCTGCTA R: AGAGGTGAAACGAGCAAGGA	232

<i>Lactobacillus plantarum</i>		
Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (pb)
<i>secY</i>	F: GCCGGGGTTATTCCTGTTAT	180
	R: GAACGTGAAGAGCACGATCA	
<i>ImrA</i>	F: CTAACGCTTTTCCGCAAGTC	184
	R: GCTAAAGCATCTTGGCGTTC	

Una vez concluido el programa de PCR, las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta la realización de geles de agarosa al 2%.

Se tomaron 3 μ L de cada reacción de RT-PCR y se mezclaron con glicerol/azul de bromofenol como cargador (1 μ L de cargador/5 μ L de reacción de RT-PCR).

Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (NEW ENGLAND Bio Labs DNA ladder 100 pb, 500 μ g/mL). Cada gel de electroforesis se dejó correr por 80 min a 70 V. Transcurrido el tiempo de corrida, las bandas se tiñeron con bromuro de etidio para ser visualizadas con luz UV.

Cada reacción de RT-PCR se cargó por duplicado en los geles de agarosa, en todos los casos, bajo las mismas condiciones.

5.6.4. Análisis de amplicones por densitometría

Las fotografías digitales de los geles de los productos de RT-PCR teñidos se tomaron bajo exposición a la luz UV usando un transluminador red® (Cell Biosciences, Inc.).

Los amplicones se determinaron como el área integrada (píxeles) de la intensidad de las bandas por análisis densitométrico con un software AlphaView SA v3.4.0 Protein Simple.

Los valores numéricos de las intensidades de las bandas (píxeles) resultantes de los genes de las bombas de eflujo en estudio, se compararon en proporción con los valores numéricos de las bandas del gen *secY* en cada género bacteriano, ya

que dicho gen se expresa a un nivel relativamente constante en las células y es comúnmente utilizado en sistemas de RT-PCR semicuantitativos para asegurar la eficiencia relativa de cada PCR individual.

Para poder comparar si hay un aumento o disminución de la expresión de los genes de las bombas de eflujo, los resultados se presentan como las relaciones o proporciones de los genes de las bombas de eflujo sobre *secY*.

$$\frac{\text{Píxeles de bomba de eflujo}}{\text{Píxeles de } secY} = \text{Relación de expresión}$$

Si la relación de expresión obtenida es equivalente a 1, los niveles de expresión de la bomba de eflujo de interés son iguales a los niveles de expresión de *secY*, un gen constitutivo. Valores mayores a 1 indican un aumento en la expresión comparada con niveles constitutivos.

6. Resultados

6.1. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

En la **Tabla 7** se muestran los resultados de los antibiogramas realizados a las cepas utilizadas como control y a las bacterias ácido lácticas de este estudio. Como se muestra en la tabla, se trabajó con 3 cepas control de *S. aureus* y 10 cepas distintas de BAL. Las cepas se evaluaron frente a un número total de 17 antibióticos pertenecientes a 10 familias distintas.

Tabla 7. Antibiogramas de cepas control y de bacterias ácido lácticas.

(S) Sensible, (R) Resistente, (I) Resistencia intermedia.

	1				2		3	4	5	6		7				8	9	10
	AM	PE	DC	CX	CFX	CF	CPF	CLM	E	TE	GE	NET	K	N	SXT	VA	C	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	I	S	R	I	S	S	
<i>S. aureus</i> ATCC6538	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	I	S	R	I	S	S	
<i>S. aureus</i> ATCC29213	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	I	I	R	I	S	S	
<i>Ent. italicus</i> (A)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	
<i>Ent. italicus</i> (B)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	
<i>Str. bovis</i>	R	R	S	I	S	R	R	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	
<i>W. confusa</i> (A)	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	R	R	R	R	S	
<i>W. confusa</i> (B)	S	R	R	R	S	R	R	R	S	I	R	S	R	S	I	R	S	
<i>Lb. plantarum</i> (A)	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	I	R	S	
<i>Lb. plantarum</i> (B)	S	S	R	R	I	R	R	R	S	I	R	S	R	S	R	R	S	
<i>Lc. lactis</i>	S	S	R	R	S	R	R	I	S	S	I	S	S	R	R	I	S	
<i>Ln. mesenteroides</i> (A)	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	I	S	R	S	R	R	S	
<i>Ln. mesenteroides</i> (B)	S	S	R	R	S	I	R	I	S	I	R	I	R	R	R	R	S	

FAMILIAS DE ANTIBIÓTICOS: (1) Penicilinas (2) Cefalosporinas (3) Quinolonas (4) Lincosaminas (5) Macrolidos (6) Tetraciclinas (7) Aminoglucósidos (8) Sulfonamidas (9) Glucopéptidos (10) Afenicoles

ABREVIATURAS DE ANTIBIÓTICOS: (AM) Ampicilina (PE) Penicilina (DC) Dicloxacilina (CX) Cloxacilina (CFX) Cefotaxima (CF) Cefalotina (CPF) Ciprofloxacina (CLM) Clindamicina (E) Eritromicina (TE) Tetraciclina (GE) Gentamicina (NET) Netilmicina (K) Kanamicina (N) Neomicina (SXT) Trimetoprim/Sulfametoxazol (VA) Vancomicina (C) Cloranfenicol

En la **Tabla 8** se muestra el número total de antibióticos a los que se mostraron resistentes cada una de las cepas, además del número de familias distintas en las que se encuentran distribuidos en cada caso. Para efectos prácticos y, considerando que para el caso de bacterias ácido lácticas no existen valores de corte claros para establecer la resistencia a antibióticos, se contabilizó el número total de antibióticos resistentes así como el número de familias distintas en las que se encuentran distribuidos, sin tomar en cuenta lo que podrían considerarse como “resistencias intermedias”.

Tabla 8. Número total de antibióticos y familias de antibióticos detectados con resistencia en las distintas cepas en estudio.

	RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (CON RI*)		RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (SIN RI*)	
	ANTIBIÓTICOS	FAMILIAS	ANTIBIÓTICOS	FAMILIAS
<i>S. aureus</i> ATCC25923	6	4	3	2
<i>S. aureus</i> ATCC6538	6	4	3	2
<i>S. aureus</i> ATCC29213	7	4	4	3
<i>Ent. italicus</i> (A)	3	2	3	2
<i>Ent. italicus</i> (B)	3	2	3	2
<i>Str. bovis</i>	11	6	9	5
<i>W. confusa</i> (A)	12	7	11	6
<i>W. confusa</i> (B)	11	8	9	6
<i>Lb. plantarum</i> (A)	10	7	9	6
<i>Lb. plantarum</i> (B)	11	8	9	7
<i>Lc. lactis</i>	9	7	6	5
<i>Ln. mesenteroides</i> (A)	7	5	6	5
<i>Ln. mesenteroides</i> (B)	12	8	8	5

*(RI) Resistencia Intermedia.

De manera general, se puede observar que las bacterias ácido lácticas presentan resistencia a un mayor número de antibióticos con respecto a las cepas control de *S. aureus* y que, además, estos antibióticos se encuentran distribuidos en más de 3 familias distintas (sin tomar en cuenta las resistencias intermedias) por lo que las BAL en estudio pueden ser consideradas como “multirresistentes”. Por otra parte,

las cepas del género *Enterococcus* son la excepción al exhibir bajos niveles de resistencia comparadas con el resto de las BAL.

En la **Figura 13** se muestran algunos resultados de los antibiogramas realizados con los respectivos halos de inhibición observados en distintas cepas. Los halos en BAL se observaron, generalmente, de menor tamaño que los observados en las cepas control.

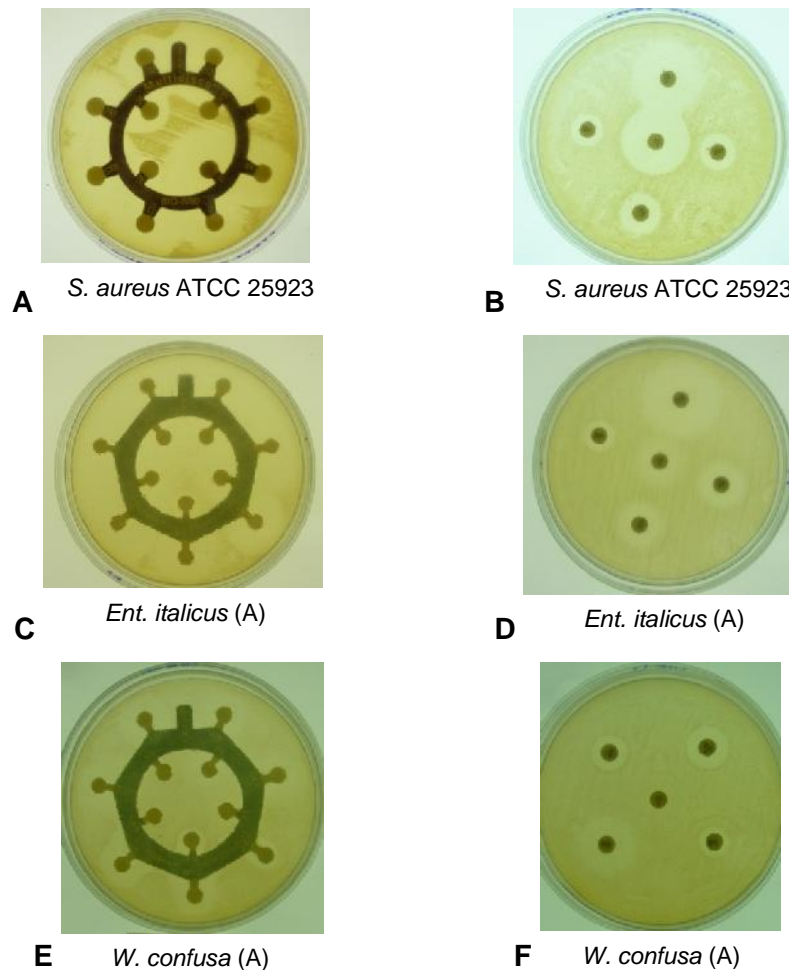


Figura 13. Ejemplos de algunos resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a antibióticos para una de las cepas control (Fig. 13 A y B), para una cepa del género *Enterococcus* (Fig. 13 C y D) y para una cepa de bacterias ácido lácticas del género *Weissella* (Fig. 13 E y F).

6.2. Tolerancia a bromuro de etidio

Una vez identificadas las cepas como multirresistentes a antibióticos se quiso conocer la tolerancia a bromuro de etidio, un sustrato conocido para la mayoría de

las bombas de eflujo de MDR. Se sabe que un incremento en la actividad de las bombas de multirresistencia lleva a incrementar la actividad de eflujo, por lo que la tolerancia a dicho agente tóxico consistió en el primer paso para la identificación de cepas con posible *fenotipo de eflujo*.

6.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

En la **Tabla 9** se presentan los resultados de la turbidez observada en los tubos con medio de cultivo adicionado de distintas concentraciones de bromuro de etidio. Es clara la capacidad de las bacterias ácido lácticas para crecer en un medio con altas concentraciones de bromuro de etidio (>80 µg/mL) comparada con las cepas de *S. aureus* utilizadas como control, que se limitan a desarrollar a concentraciones bajas (<10 µg/mL). Nuevamente, la excepción la presentan las cepas del género *Enterococcus*, además de los *Streptococcus*, que no desarrollaron turbidez en el medio de cultivo a ninguna concentración empleada de bromuro de etidio incluso después de 1 semana de incubación, por lo que su concentración mínima inhibitoria se debe encontrar por debajo de 5 µg/mL.

Tabla 9. Turbidez observada en el medio de cultivo adicionado de distintas concentraciones de bromuro de etidio después de los tiempos de incubación.

CEPAS	5 ~g/mL			10 ~g/mL			20 ~g/mL			40 ~g/mL			80 ~g/mL		
	24 h	48 h	1 sem	24 h	48 h	1 sem	24 h	48 h	1 sem	24 h	48 h	1 sem	24 h	48 h	1 sem
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC6538	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC29213	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ent. italicus</i> (A)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ent. italicus</i> (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Str. Bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. confusa</i> (A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>W. confusa</i> (B)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Lb. plantarum</i> (A)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Lb. plantarum</i> (B)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lc. Lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ln. mesenteroides</i> (A)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Ln. mesenteroides</i> (B)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Turbidez en el medio, (-) Sin turbidez en el medio.

En la **Figura 14** se muestran algunos resultados de la prueba para determinar la CMI. Se puede observar una coloración ligeramente rojiza y translúcida adquirida en los tubos control (sin inóculo) debida al bromuro de etidio y el contraste con la turbidez desarrollada en algunos de los tubos de prueba de las cepas que presentaron crecimiento a alguna concentración dada del agente intercalante.

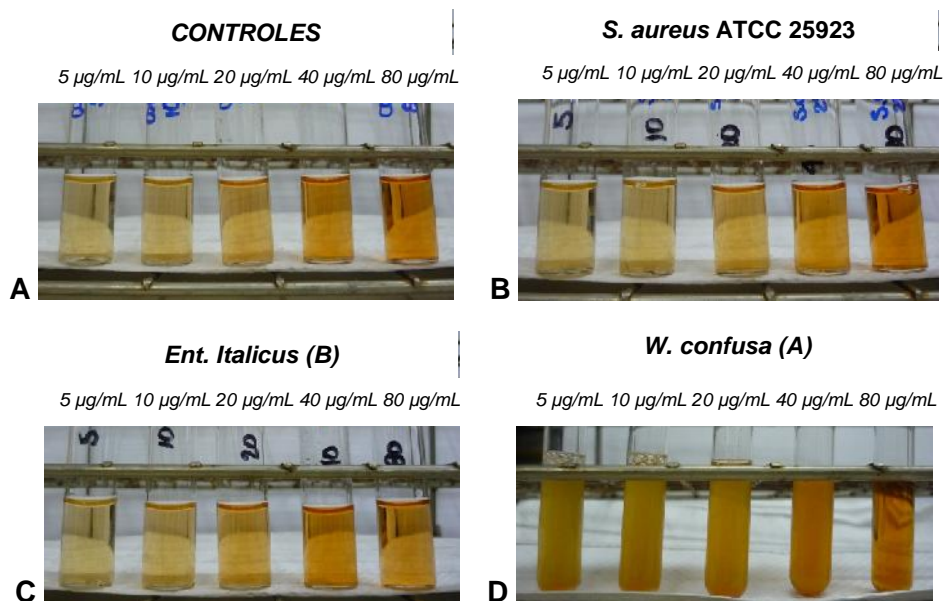


Figura 14. Ejemplos de algunos resultados obtenidos en las determinaciones de CMI. En la Fig. 14A se muestran los tubos control con medio de cultivo y diferentes concentraciones de bromuro de etidio sin inóculo, en la Fig. 14B se muestran los tubos de una de las cepas utilizadas como control, en la Fig. 14C se muestran los tubos correspondientes a una de las cepas del género *Enterococcus* y, en la Fig. 14D se muestran los tubos correspondientes a una de las cepas del género *Weissella*.

6.2.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

En la **Tabla 10** se muestran los resultados del crecimiento observado en cajas de agar luego de tomar una muestra con 24 h de crecimiento incubada con distintas concentraciones de bromuro de etidio. Al igual que la prueba de CMI, las bacterias ácido lácticas exhiben crecimiento abundante en altas concentraciones (>80 µg/mL), en algunos casos, el crecimiento se observa reducido gradualmente conforme se va aumentando la concentración del agente intercalante, es decir, se observa una reducción de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's). Sin embargo, hay crecimiento incluso en la concentración más alta utilizada para esta

prueba, por lo que la concentración mínima bactericida para BAL se debe encontrar por arriba de 80 µg/mL.

Por otra parte, las cepas de *S. aureus* utilizadas como control, así como las cepas del género *Enterococcus* y *Streptococcus*, se observaron más limitadas en cuanto a su capacidad de sobrevivir a concentraciones de bromuro de etidio mayores a 20 µg/mL y, para el caso particular de la cepa de *Enterococcus italicus A*, es posible notar que basta una concentración de 5 µg/mL para inhibir completamente el crecimiento de la célula bacteriana.

Tabla 10. Crecimiento observado en medio de cultivo sólido de muestras provenientes de un cultivo en medio líquido adicionado de bromuro de etidio a diferentes concentraciones.

CEPAS	5 ~g/mL	10 ~g/mL	20 ~g/mL	40 ~g/mL	80 ~g/mL
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+++	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC6538	+++	++	+	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC29213	+	+	+	-	-
<i>Ent. italicus</i> (A)	-	-	-	-	-
<i>Ent. italicus</i> (B)	++	+	-	-	-
<i>Str. bovis</i>	+	+	-	-	-
<i>W. confusa</i> (A)	+++	+++	+++	++	++
<i>W. confusa</i> (B)	+++	++	++	++	+
<i>Lb. plantarum</i> (A)	+++	+++	++	++	++
<i>Lb. plantarum</i> (B)	+++	+++	+++	+++	++
<i>Lc. Lactis</i>	+++	++	++	++	+
<i>Ln. mesenteroides</i> (A)	+++	+++	+++	++	++
<i>Ln. mesenteroides</i> (B)	+++	+++	+++	+++	++

+++ Crecimiento abundante ++ Crecimiento bueno + Crecimiento pobre - Sin crecimiento

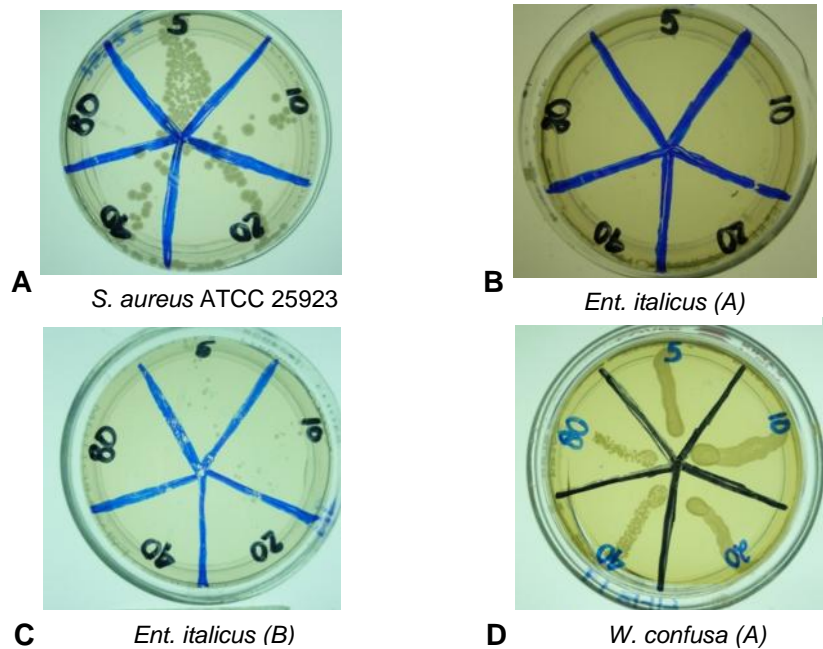


Figura 15. Ejemplos de algunos resultados obtenidos en las determinaciones de CMB. En la Fig. 10A se muestra el crecimiento observado en una de las cepas utilizadas como control, en las Fig. 10B y 10C se muestra el crecimiento observado en las cepas del género *Enterococcus* y, en la Fig. 10D se muestra el crecimiento observado en una de las cepas del género *Weissella*.

En la **Tabla 11** se resumen los resultados de las pruebas de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida encontrados para cada una de las cepas en estudio, incluyendo los controles.

Tabla 11. Resultados de la CMI y CMB encontradas para cada cepa en estudio

CEPAS	CMI	CMB
<i>S. aureus</i> ATCC25923	5 µg/mL	40 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC6538	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC29213	5 µg/mL	20 µg/mL
<i>Ent. italicus</i> (A)	< 5 µg/mL	< 5 µg/mL
<i>Ent. italicus</i> (B)	< 5 µg/mL	10 µg/mL
<i>Str. bovis</i>	< 5 µg/mL	10 µg/mL
<i>W. confusa</i> (A)	40 µg/mL	> 80 µg/mL
<i>W. confusa</i> (B)	40 µg/mL	> 80 µg/mL
<i>Lb. plantarum</i> (A)	> 80 µg/mL	> 80 µg/mL
<i>Lb. plantarum</i> (B)	> 80 µg/mL	> 80 µg/mL
<i>Lc. Lactis</i>	40 µg/mL	> 80 µg/mL
<i>Ln. mesenteroides</i> (A)	> 80 µg/mL	> 80 µg/mL
<i>Ln. mesenteroides</i> (B)	> 80 µg/mL	> 80 µg/mL

Es posible observar que los microorganismos utilizados como control, así como los *Enterococcus* y *Streptococcus* de este estudio son susceptibles a bajas concentraciones del agente intercalante empleado. En estos casos, basta aplicar una concentración mínima de 5 µg/mL (en algunos casos, posiblemente menor) para provocar algún efecto que interfiera directamente con el crecimiento y/o la viabilidad de dichos microorganismos. Por otra parte, el resto de las BAL exhiben, de manera general, una menor susceptibilidad al bromuro de etidio, necesitándose por lo menos, una concentración mínima de 40 µg/mL (8 veces mayor al resto de los microorganismos en estudio) para provocar algún efecto de inhibición.

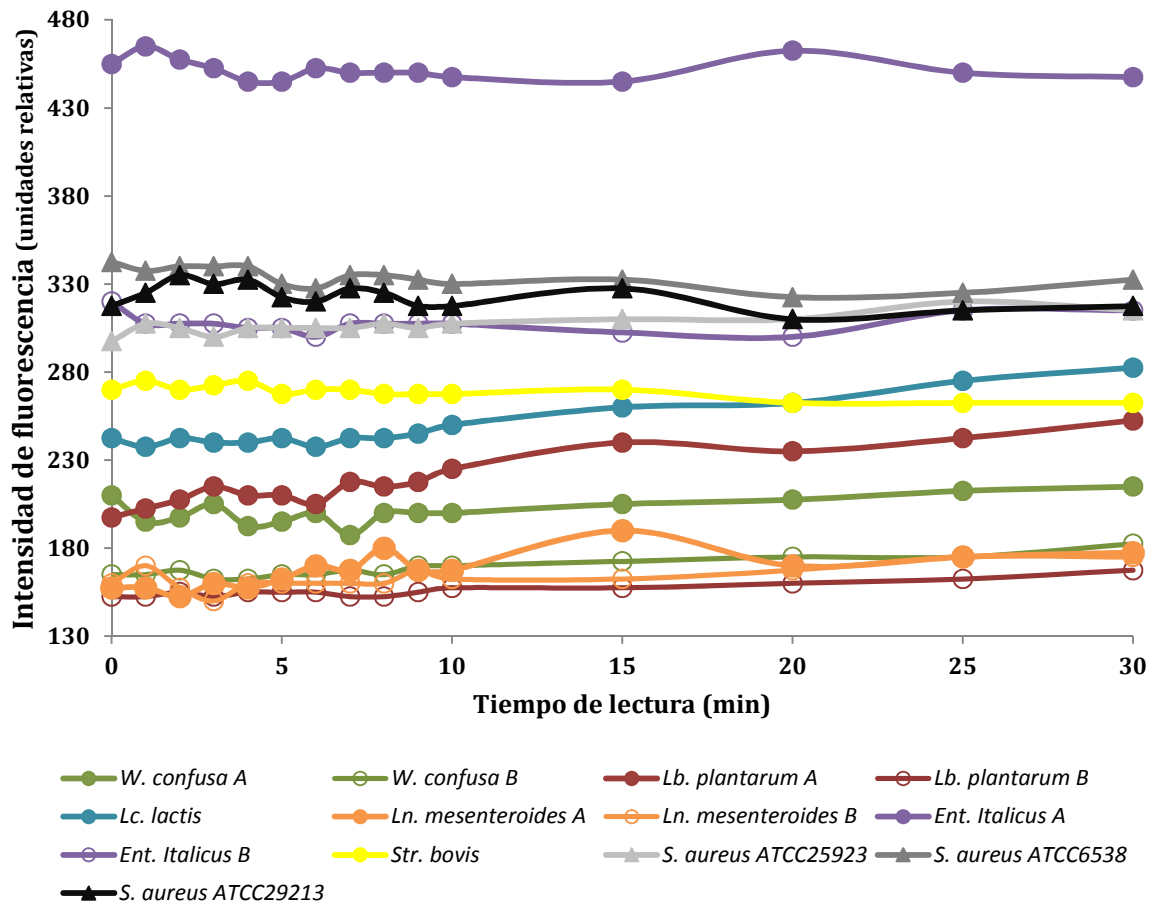
6.3. Acumulación de bromuro de etidio

El principio de esta prueba se basa en el hecho de que el bromuro de etidio, al acumularse dentro de las células, se intercala con el ADN y cambia su longitud de onda óptima de fluorescencia (excitación a análisis), por lo tanto, la fluorescencia exhibida corresponde a un marcador de la acumulación intracelular del agente intercalante. Las diferencias en la actividad de las bombas entre distintas cepas se reflejan en una mayor o menor acumulación intracelular del agente tóxico de acuerdo a la actividad de eflujo presente en cada una de ellas (*Webber & Coldham, 2010*).

En la **Figura 16** se muestra la respuesta de las distintas cepas de bacterias ácido lácticas a la exposición a una concentración conocida de bromuro de etidio (10 µg/mL) por un periodo determinado (30 min), medida como la intensidad de fluorescencia emitida por el agente intercalante. En esta gráfica es posible notar que las cepas de *Enterococcus italicus B*, así como *Streptococcus bovis*, aunque se encuentran por debajo de las cepas de *S. aureus* utilizadas como control, no presentan un diferencia significativa (mayor al 20%) en la intensidad de fluorescencia con respecto a dichas cepas control. Por otra parte, se observa que la cepa de *E. italicus A* se encuentra muy por arriba de las cepas control de *S. aureus* en cuanto a su intensidad de fluorescencia, lo que sugiere un flujo

abundante de bromuro de etidio hacia el interior de la célula bacteriana, mucho mayor que en el resto de las cepas en estudio.

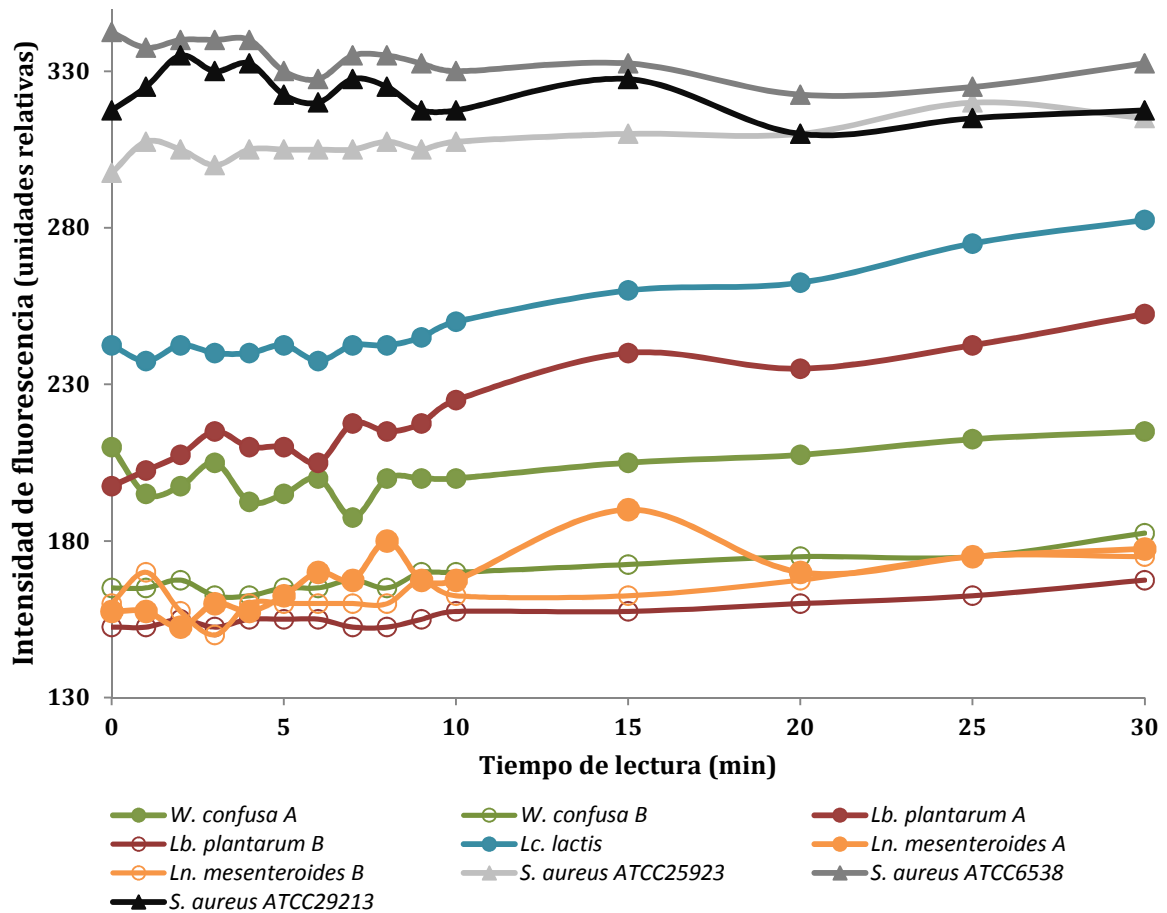
Figura 16. Ensayo de acumulación de bromuro de etidio a la célula de la totalidad de cepas en estudio.



Con respecto al resto de las bacterias ácido lácticas, todas presentan valores de intensidad de fluorescencia por debajo de los microorganismos control, con diferencias consideradas como significativas (mayores al 20%).

En la **Figura 17** se muestran únicamente las cepas que representan diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia, con respecto a las cepas utilizadas como control.

Figura 17. Ensayo de acumulación de bromuro de etidio a la célula de las cepas en estudio que representan diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia.



Se observa que *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* fueron los géneros de BAL con diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia con respecto a los microorganismos control. Sin embargo, dada la escasa caracterización sobre bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos presentes en distintos géneros de BAL, se seleccionaron las cepas de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* para su posterior análisis de expresión, ya que, éstos representan los géneros de BAL con mayor información disponible sobre este tipo de transportadores.

Por otra parte, se eligió a la cepa control de *S. aureus* ATCC 6538 para continuar con los análisis de expresión.

6.4. Expresión de bombas de expulsión

El análisis de expresión de las bombas de expulsión se llevó a cabo bajo dos condiciones experimentales: **a)** la expresión de los transportadores incubando a las cepas en el medio de cultivo óptimo para su crecimiento y **b)** la expresión de los transportadores incubando a las cepas en el mismo medio de cultivo adicionado de bromuro de etidio [EtBr] a una concentración de 10 µg/mL.

6.4.1. RT-PCR

En las **Figuras 16, 17 y 18**, se presentan los productos de RT-PCR que corresponden a las bombas de expulsión de multirresistencia a fármacos evaluadas en cada especie microbiana, así como los correspondientes productos de los genes utilizados como control (*secY*). Para cada uno de los genes se observan dos bandas, que corresponden a un duplicado de los productos de RT-PCR cargado en todos los casos.

En algunas imágenes, es posible observar ciertas diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas; sin embargo, cada una de las bandas observadas en estos geles se analizó posteriormente por densitometría. Finalmente, mediante el resultado de este análisis, se determinó si existieron o no, diferencias significativas respecto a la expresión de los distintos genes.

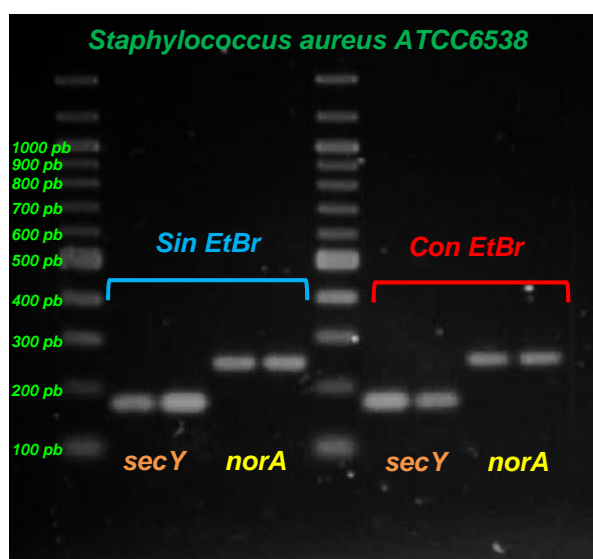


Figura 18. Gel de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos para la cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

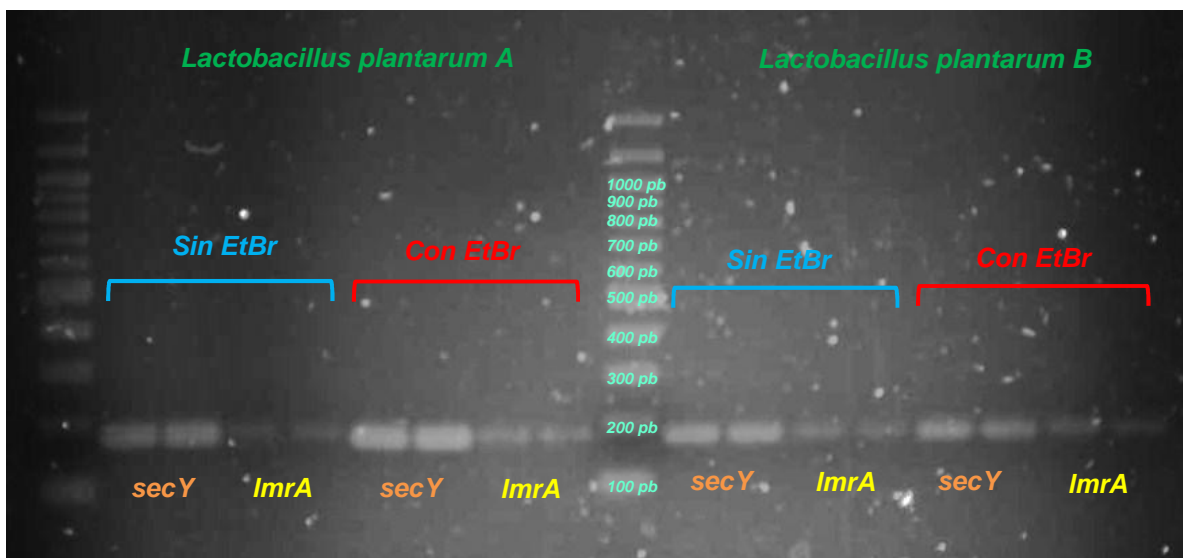


Figura 19. Gel de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos para las cepas del género *Lactobacillus*.

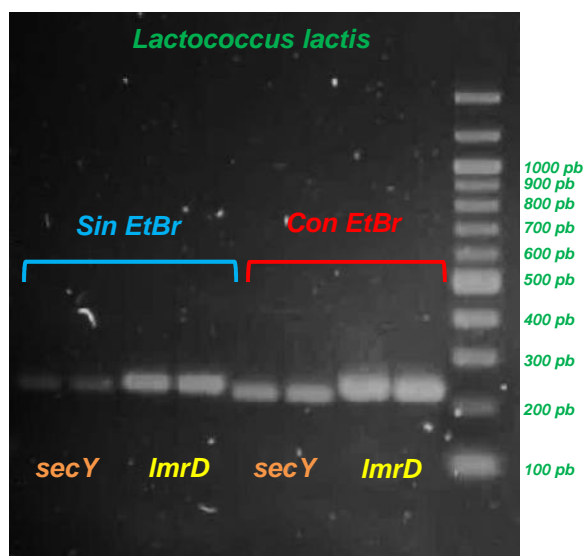
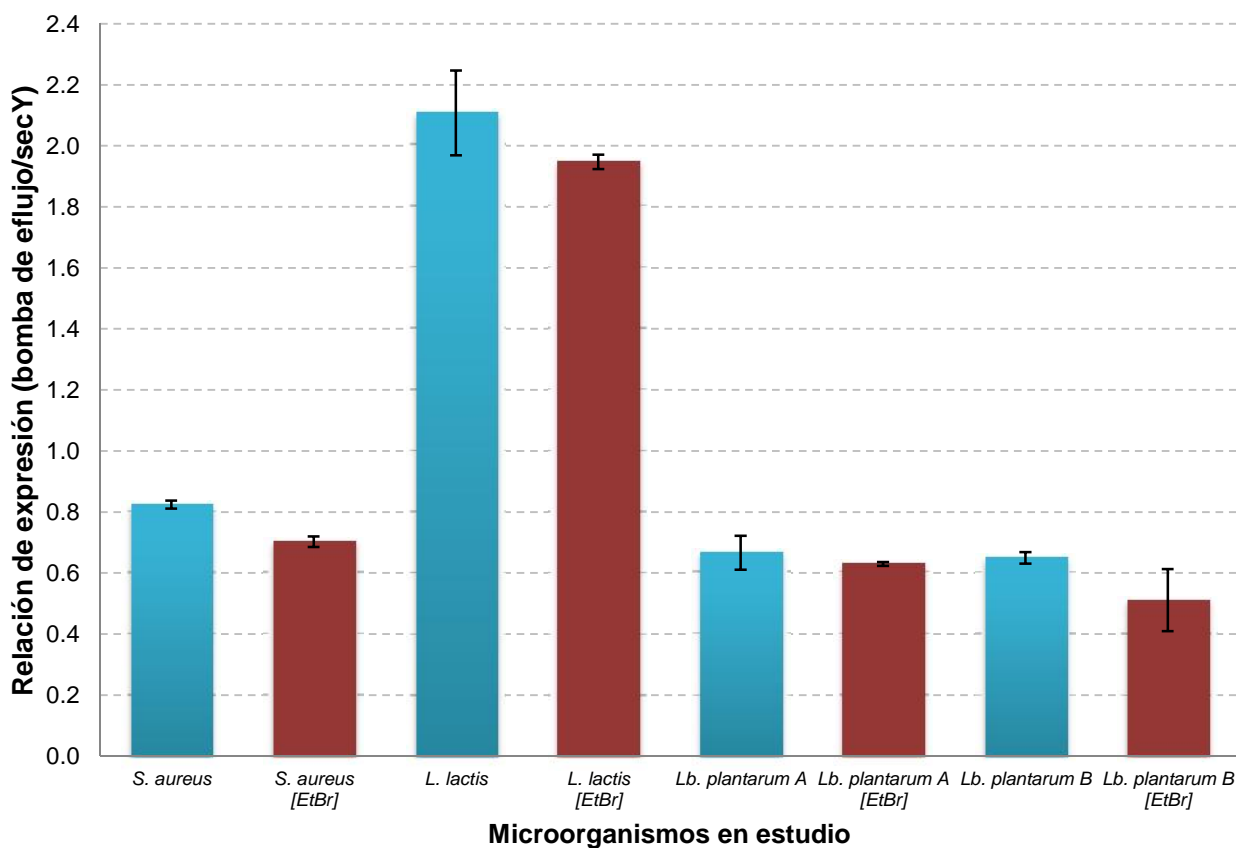


Figura 20. Gel de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos para *Lactococcus lactis*.

6.4.2. Análisis de amplicones por densitometría

En la **Figura 21** se muestra la relación de la expresión de los genes de las bombas de eflujo en estudio con respecto a la expresión del gen *secY*, para ambas condiciones experimentales (incubación con y sin bromuro de etidio en el medio de cultivo).

Figura 21. Expresión de ARNm que codifican para bombas de expulsión particulares de cada género bacteriano en estudio. Las líneas sobre las barras representan las desviaciones estándar.



Los resultados indican que la presencia de bromuro de etidio en el medio de cultivo no es un factor que influya en la sobre-expresión de las bombas de eflujo, ya que, en ninguno de los casos se observan diferencias significativas de expresión bajo ambas condiciones experimentales.

En el caso de las cepas estudiadas de *Lactobacillus plantarum*, se observa una expresión relativamente similar a la que presenta la cepa utilizada como control de

S. aureus, todas, con niveles de expresión por debajo de los constitutivos (valor menor a 1) dados por el gen *secY*.

Por otra parte, *Lc. lactis* exhibe un notable aumento en la expresión de la bomba evaluada con respecto a la cepa control de *S. aureus* y a las cepas de *Lb. plantarum*. Este aumento, como se mencionó, es independiente de la presencia de bromuro de etidio en el medio de cultivo.

Los niveles bajos de expresión observados de la cepa control de *S. aureus* resultan congruentes con lo esperado, dado que este microorganismo no se consideró multirresistente, aunado a su alta susceptibilidad a bromuro de etidio. Probablemente en esta cepa susceptible, las bombas de eflujo de MDR no representan una defensa principal contra agentes tóxicos y esto se refleja en los niveles de expresión observados.

7. Discusión

Como primer paso en este estudio, se examinaron los perfiles de resistencia a antibióticos en BAL.

En cuanto a las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en BAL, a la fecha es difícil realizar una comparación directa de los resultados obtenidos en cada estudio debido a la diversidad de métodos, medios y condiciones de cultivo empleadas en cada caso. Todo esto aunado a la falta de regulación y falta de existencia de estándares claros a seguir en este tipo de microorganismos (*Ammor, 2007*).

Tomando en cuenta lo anterior, las pruebas de susceptibilidad realizadas para obtener los perfiles de resistencia en este estudio se hicieron con la finalidad de fijar un límite entre los microorganismos sensibles y resistentes, que permitiera establecer un criterio para identificar microorganismos multirresistentes (con resistencia simultánea a 3 o más familias diferentes de antibióticos), utilizando como base los puntos de corte clínicos reportados (*NCCLS*).

Los perfiles de resistencia de las BAL estudiadas se han presentado en la **Tabla 7**, en donde se muestran los antibióticos evaluados distribuidos en las distintas familias a las que pertenecen.

En esta tabla, se observan resultados para microorganismos de los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, todos integrantes del grupo de las bacterias ácido lácticas, además de cepas de *S. aureus* (no multirresistentes) utilizadas como control.

El género *Enterococcus* es el grupo más controvertido de bacterias ácido lácticas. Los enterococos se encuentran comúnmente en alimentos fermentados y como parte de la microbiota del tracto gastro-intestinal de humanos y animales. Sin

embargo, son controversiales debido a que muchas especies portan una serie de factores de virulencia (p. ej. hemolisinas y citolisinas) que se han asociado con un gran número de infecciones en humanos (*Foulquié-Moreno et al., 2006*).

Los *Enterococcus* generalmente son susceptibles a vancomicina y a eritromicina en ambientes clínicos. Los enterococos resistentes a vancomicina son comúnmente asociados con infecciones nosocomiales. De hecho, se ha reportado que la resistencia de estos microorganismos a vancomicina es transferible.

Las especies más importantes clínicamente son *E. faecalis* y *E. faecium*. La primera es muy común en infecciones humanas y la segunda podría representar una mayor amenaza en términos de resistencia.

Tanto en estas especies, como en muchas otras del género, el desarrollo evolutivo de resistencia a antimicrobianos ha sido atribuido, principalmente, a la adquisición de elementos genéticos móviles, como plásmidos conjugativos y transposones (p. ej. pAm 1 o Tn916) (*Teuber et al., 1999*).

Por otra parte, hoy en día los enterococos se utilizan como probióticos en algunos alimentos, sin embargo, continúan causando controversia en cuanto a su uso para aplicaciones probióticas por su potencial patógeno y su capacidad de adquirir con facilidad determinantes de resistencia para los antibióticos de uso común.

En los perfiles de resistencia obtenidos en este estudio, con respecto a los *Enterococcus* se observa susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos evaluados, incluyendo vancomicina y eritromicina. Únicamente se encontró resistencia a dos aminoglucósidos (gentamicina y neomicina) y a la combinación de trimetoprim/sulfametoxazol. En este caso, la susceptibilidad antimicrobiana en los *Enterococcus* difiere del resto de las BAL estudiadas ya que únicamente presentan resistencia a 2 familias distintas de antibióticos por lo que, al igual que las cepas control, no se les consideró como multirresistentes.

Como se mencionó anteriormente, la resistencia a los antibióticos de uso común asociada a especies de enterococos, generalmente es de tipo adquirida y frecuentemente asociada a la presencia de plásmidos o transposones. En este caso, es posible que los enterococos estudiados no presentaran los elementos genéticos con determinantes de resistencia que comúnmente se describen en especies de enterococos resistentes, dada la alta susceptibilidad a la mayor parte de los antimicrobianos probados.

Por otra parte, el grupo de los *Streptococcus* figura entre las BAL más típicas, aunque, de manera particular, se considera a la especie *Streptococcus thermophilus* como la única con relevancia tecnológica y es, por lo tanto, la más estudiada dentro de este grupo. *St. thermophilus* se utiliza junto con *Lb. delbueckii* en la fermentación de yogurt y es un componente habitual de los fermentos de los quesos de pasta cocida junto con otras especies de lactobacilos.

En nuestro estudio, se trabajó con una especie de *Streptococcus* distinta, aislada de un producto fermentado tradicional mexicano (pozol): *Streptococcus bovis*.

St. bovis es una bacteria ácido láctica que normalmente habita en el tracto gastrointestinal de animales rumiantes, como ganado vacuno y ovino. También es un patógeno humano que se asocia a infecciones como endocarditis, sepsis, gastroenteritis, meningitis, endoftalmitis y al cáncer gastro-intestinal (*Abdelgadir et al., 2008*).

Los aislados clínicos de *St. bovis* son generalmente susceptibles a penicilina. Existen pocos reportes sobre la susceptibilidad antimicrobiana de la especie *St. bovis*. Se ha sugerido utilizar antibióticos del grupo de los macrólidos (eritromicina, principalmente) y otros con acción similar, como tratamiento de elección cuando el paciente es alérgico a las penicilinas. Sin embargo, se han identificado cepas de *St. bovis* resistentes a eritromicina aisladas de cultivos en sangre (*Hörner et al., 2010*).

En las bacterias Gram-positivas se han considerado dos mecanismos principales para el desarrollo de resistencia a eritromicina: la modificación del sitio blanco y el eflujo del antimicrobiano.

La modificación del sitio blanco generalmente da como resultado lo que se conoce como el fenotipo de resistencia “macrólido-lincosamida-estreptogramina (MLS)”. Este mecanismo es mediado por la acción de metilasas codificadas por los genes *erm* (Hörner et al., 2010). El segundo mecanismo está dado por el transporte del antimicrobiano fuera de la célula utilizando sistemas de eflujo y, generalmente se asocia a fenotipos de multirresistencia.

La cepa de *St. bovis* de este estudio presentó susceptibilidad variable a la familia de las penicilinas. Por una parte, fue resistente a la penicilina natural y a la ampicilina (una penicilina de amplio espectro), sin embargo, por otra parte, fue susceptible a la acción de las penicilinas isoxazólicas (dicloxacilina y cloxacilina). Dentro de la familia de las penicilinas, las penicilinas isoxazólicas se consideran como parte de las llamadas “penicilinas resistentes a penicilinasas”, que permiten una mayor eficacia contra microorganismos productores de penicilinasas. Sin embargo, tienen un espectro más estrecho de actividad comparado con la acción de otras penicilinas. Por otra parte, se sabe que las penicilinas de tipo natural presentan mayor actividad contra especies de estafilococos, estreptococos y neumococos. Por lo que, los resultados indicarían un perfil de susceptibilidad a penicilinas, de acuerdo a lo publicado para este tipo de microorganismos.

Adicionalmente, el *St. bovis* estudiado no presenta el fenotipo MLS, ya que se observó susceptibilidad a eritromicina, sin embargo se detectaron niveles de resistencia intermedia a clindamicina (de la familia de las lincosamidas). También se observó resistencia simultánea a la familia de las quinolonas y las sulfonamidas, además, fue el único microorganismo en el estudio que presentó resistencia a los 4 antibióticos evaluados de la familia de los aminoglucósidos (gentamicina, netilmicina, kanamicina y neomicina). Estas observaciones sugieren que probablemente este microorganismo porte determinantes de resistencia

específicos para los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos y determinantes específicos para resistir la acción de los aminoglucósidos, ya que la resistencia parece ser particular para este tipo de compuestos.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores sobre dos géneros de bacterias ácido lácticas controversiales, a continuación, se hace una discusión sobre la resistencia a los distintos antibióticos y familias de antibióticos encontrada en el resto de las bacterias ácido lácticas (exceptuando al grupo de los *Enterococcus* y *Streptococcus*).

Con respecto a las penicilinas evaluadas, todas las BAL fueron resistentes a las penicilinas de tipo isoxazólicas (cloxacilina y dicloxacilina). Por otra parte, prácticamente todas resultaron susceptibles a las penicilinas de amplio espectro (ampicilina) y penicilinas naturales. Los resultados concuerdan con muchos reportes sobre la susceptibilidad a dicha familia de antibióticos, la cual se puede considerar como variable, dependiendo del tipo de penicilina empleada, además del género y especie de BAL en estudio. Algunos autores mencionan que las BAL, generalmente son susceptibles a antibióticos del tipo β -lactámicos, sin embargo, en muchos casos se ha observado menor susceptibilidad a oxacilina, una penicilina de tipo isoxazólica (Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Flórez, 2007; Mathur & Singh, 2005).

Con respecto a la familia de las cefalosporinas, los perfiles arrojan resultados variables entre las BAL. Todas, con excepción del género *Leuconostoc*, resultaron resistentes a cefalotina, una cefalosporina de primera generación. Sin embargo, los perfiles fueron más variados entre los mismos géneros frente a cefotaxima, una cefalosporina de tercera generación, en donde en la mayoría de los casos los microorganismos fueron susceptibles.

Como se mencionó, la mayoría de las BAL generalmente son susceptibles a antibióticos inhibidores de la síntesis de pared celular, como los β -lactámicos.

Incluso, varias especies de *Lactococcus* se han encontrado sensibles a cefalosporinas de 1era generación y, se encuentran casos con mayor resistencia frente a cefalosporinas de segunda y tercera generación, sobre todo en especies de *Lactobacillus* (Mathur & Singh, 2005). En un estudio realizado por Liu et al. (2009), se aislaron un total de 41 cepas de BAL procedentes de alimentos y aditivos para alimentos, en este estudio, el total de aislados se encontró susceptible cefalotina (primera generación), lo que habla de la alta incidencia sobre la susceptibilidad reportada para este tipo de antibióticos.

En nuestros resultados, se encuentra una mayor resistencia a cefalosporinas de primera generación con respecto a lo que previamente se ha reportado, independientemente del género de BAL. Ammor et al. (2007), proponen que existe una cooperación de mecanismos “no específicos” de resistencia, como las bombas de multirresistencia a fármacos, que contribuyen a la variación en la resistencia a este tipo de antibióticos entre las distintas cepas.

Examinando la familia de las quinolonas, se encontró que todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina. Con respecto a los géneros de *Weissella* y *Leuconostoc*, no existen reportes que indiquen el comportamiento frente a este tipo de antibióticos. Por otra parte, para el caso de *Lactococcus*, se ha reportado que presentan menor susceptibilidad de la que normalmente se observa en otros microorganismos (Mathur & Singh, 2005), mientras que para los *Lactobacillus* se ha visto que exhiben altos niveles de resistencia, en general, a los antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos. Se menciona que la resistencia en estos casos pudiera ser intrínseca, aunque no se indica el mecanismo bioquímico o molecular, por lo que se requieren más estudios que permitan su caracterización (Ammor, Flórez, & Mayo, 2007).

Generalmente, las BAL son susceptibles a los antibióticos que actúan sobre algún nivel de la síntesis proteica. En nuestros resultados, todas las cepas de BAL resultaron sensibles a eritromicina (macrólidos), tetraciclina y cloranfenicol

(afenicoles). Lo anterior concuerda con otros estudios sobre la susceptibilidad a este tipo de antibióticos en BAL (*Liu et al., 2009*).

Existen reportes en donde se han identificado BAL resistentes a tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol. En otros casos, incluso, se observa resistencia simultánea a este tipo de antibióticos en la misma cepa, lo que se ha denominado el fenotipo “macrólido-lincosamida-estreptogramina (MLS)”. Ammor et al. (2008) analizaron las concentraciones mínimas inhibitorias en cepas de BAL identificadas como resistentes a estos antibióticos y, de acuerdo a la distribución estadística encontrada, sugirieron que la resistencia a este tipo de antibióticos era de tipo adquirida. Esto ha sido confirmado por reportes sobre la presencia de genes que confieren resistencia específica a estos antimicrobianos en distintos géneros de BAL, principalmente localizados en plásmidos, p.ej. *msrC*, que codifica para una bomba de eflujo de resistencia a eritromicina; los genes *tet* y *erm*, que confieren resistencia a tetraciclina y eritromicina, respectivamente; *cat*, que confieren resistencia a cloranfenicol y *mdt(A)*, que codifica para una bomba de eflujo que proporciona un aumento en la resistencia a macrólidos, lincosamidas y tetraciclinas.

Continuando con los inhibidores de la síntesis proteica, nuestros resultados indican una menor susceptibilidad a la clindamicina, perteneciente a la familia de las lincosamidas, encontrándose solamente una cepa del género *Leuconostoc* susceptible a este antimicrobiano. Esto sugiere que las BAL de este estudio no presentan alguno de los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente, dados por la adquisición de genes específicos de resistencia, debido a que, por una parte, presentan alta susceptibilidad a macrólidos, tetraciclinas y afenicoles; mientras que, por otra parte, se observan claras resistencias y menor susceptibilidad frente a lincosamidas. Se ha mencionado que, la resistencia a macrólidos, lincosamidas y tetraciclinas generalmente se da de forma simultánea, probablemente debido a que, todos ellos actúan en fases tardías de la síntesis proteica y, todos ejercen un mismo efecto de tipo bacteriostático. En este caso, posiblemente se encuentre funcionando algún mecanismo menos específico de

protección contra agentes tóxicos, p.ej. alguno perteneciente a los sistemas generales de detoxificación, que contribuya a la resistencia y/o menor susceptibilidad a las lincosamidas.

Analizando los perfiles correspondientes a la familia de los aminoglucósidos, que también actúan sobre la síntesis de proteínas, se observan más variaciones en cuanto a la susceptibilidad encontrada en las distintas especies de BAL. Esta familia de antibióticos, a diferencia de los antibióticos antes mencionados, actúa en fases tempranas de la síntesis proteica provocando un efecto bactericida.

Por una parte, la mayoría de las BAL resultaron resistentes a gentamicina y kanamicina, a excepción de la cepa de *Lc. lactis*, que fue sensible a kanamicina y presentó resistencia intermedia a gentamicina. Respecto a esto, existen reportes que indican que muchas especies de *Lactococcus* son sensibles precisamente a antibióticos de amplio espectro como gentamicina y kanamicina (Flórez, 2007; Mathur & Singh, 2005) aunque, por otra parte, otros estudios indican que muchos *Lactococcus* son resistentes a los aminoglucósidos (principalmente gentamicina y kanamicina) (Ammor, Flórez & Mayo, 2007). Resulta evidente, que la resistencia en estos casos es variable y, seguramente dependiente del origen, especie, subespecie y probablemente otras características de la cepa en cuestión.

Por otra parte, prácticamente todas las cepas resultaron resistentes a netilmicina y se presentaron resultados completamente variables con respecto a neomicina.

Con los resultados obtenidos y la información que existe en la literatura científica, queda claro que la resistencia a los aminoglucósidos resulta extremadamente variable en las BAL, seguramente bastante influenciada por la especie en cuestión y los mecanismos más, o menos específicos de detoxificación que porte, así como, por las diferencias en la estructura química de los distintos aminoglucósidos que se evalúen.

La combinación de trimetoprim/sulfametoxazol no causó efectos adversos en las BAL evaluadas, observándose resistencia en mayor o menor medida (intermedia)

en todos los casos. En el estudio realizado por Liu et al., (2009) se reportó que la mayoría de las cepas de BAL aisladas, presentaron resistencia a la combinación de trimetoprim/sulfametoxazol, sin embargo, no se detectaron determinantes específicos para la resistencia a estos antimicrobianos, por lo que se consideró que la resistencia era de tipo intrínseca. Otros estudios han respaldado esta idea (Ayeni et al., 2011; Clementi & Aquilanti, 2011; Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Flórez, 2007). Se explica que la resistencia se debe a que, este tipo de microorganismos tiene una capacidad biosintética limitada y esto implica que, entre otras cosas, carecen de la vía para la síntesis del ácido fólico (sitio blanco de las sulfonamidas y el trimetoprim) (Ammor, Flórez & Mayo, 2007).

Finalmente, todas las cepas se encontraron resistentes a vancomicina, antibiótico perteneciente a la familia de los glucopéptidos. *Lc. lactis* se consideró una excepción, ya que, aunque presentó menor susceptibilidad (resistencia intermedia), no se consideró resistente. Respecto a esto, se reporta que BAL de los géneros *Lactobacillus* pertenecientes al grupo de los heterofermentadores, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Pediococcus* son intrínsecamente resistentes a este antibiótico debido a una modificación en el peptidoglicano de su pared celular: el cambio del dipéptido D-alanina-D-alanina por D-alanina-D-lactato. Esto provoca que el antibiótico no reconozca su blanco de acción y falle (Vay et al., 2007). De manera adicional, se han encontrado genes de resistencia a vancomicina en algunas especies de *Lactobacillus*, principalmente el gen *vanX*, que se requiere para desarrollar altos niveles de resistencia al antibiótico (Liu et al., 2009).

Por otra parte, la mayoría de los autores usualmente reporta a las especies de *Lactococcus* como susceptibles a vancomicina (Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Flórez, 2007; Mathur & Singh, 2005).

Si se toman en conjunto los resultados de los perfiles de resistencia a antimicrobianos en BAL y se observa la distribución de familias de antibióticos a las que pueden considerarse resistentes, en todos los casos, se cae en fenotipos que pueden clasificarse como de multiresistencia (**Tabla 8**). Resulta interesante el hecho de que, al parecer, las BAL de este estudio no presentan alguno de los

determinantes de resistencia más comúnmente descritos y, sin embargo, la resistencia a antibióticos se puede considerar bastante amplia. En algunos casos y, para géneros en particular, se indica que la resistencia es intrínseca debido a la ausencia del blanco de acción del antimicrobiano. Sin embargo, en otros casos simplemente se especula sobre una resistencia de tipo intrínseca, dado que no se encuentran determinantes específicos.

Se ha explicado que la resistencia a antibióticos y a otros agentes citotóxicos puede ser de tipo intrínseca o adquirida. Dentro de los factores involucrados en la resistencia de tipo intrínseca se encuentran: la ausencia del blanco o la presencia de blancos con baja afinidad, baja permeabilidad al compuesto tóxico, inactivación del compuesto y la presencia de mecanismos de eflujo. La actividad de estos mecanismos puede conducir a resistencia específica hacia algún agente o alguna clase particular de agentes tóxicos (por transportadores específicos de resistencia, SDR) o a la aparición perfiles de resistencia más amplios en donde se involucra a una gran variedad de compuestos tóxicos no relacionados (por transportadores de multirresistencia, MDR). Se ha sugerido que la sobre-expresión de estos mecanismos lleva al desarrollo de altos niveles de resistencia, dando como resultado un fenotipo de multirresistencia (*Ammor et al., 2008*). Es claro que las bombas de expulsión de multirresistencia juegan un papel muy importante en la resistencia intrínseca de muchos microorganismos a una gran variedad de compuestos tóxicos.

El eflujo es un mecanismo importante de resistencia a agentes antimicrobianos en muchos microorganismos. Un incremento en la actividad de las bombas de multirresistencia lleva a incrementar la actividad de eflujo, esto conduce a la aparición de un fenotipo que se conoce como *fenotipo de eflujo*. Un método sencillo que permite identificar cepas que poseen un fenotipo de eflujo (como consecuencia del funcionamiento de alguna o algunas bombas de expulsión de multirresistencia) es la medición de la concentración mínima inhibitoria de algún sustrato de dichos transportadores en las cepas que se estudian (*Patel et al., 2010*). El bromuro de etidio es un sustrato conocido para muchas de las bombas

de eflujo, por lo tanto, un microorganismo que presente un fenotipo de eflujo requerirá de concentraciones más altas del compuesto para causar daño a la célula.

Con base en lo anterior, se llevó a cabo la determinación tanto de la concentración mínima inhibitoria (CMI), como de la concentración mínima bactericida (CMB) de bromuro de etidio en las cepas de BAL estudiadas.

En la **Tabla 11**, se presentan las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas encontradas en cada caso. Los géneros de *Enterococcus* y *Streptococcus*, presentaron CMI's muy bajas ($< 5 \mu\text{g/mL}$), incluso, menores a las que se pudieron detectar en los microorganismos control; por otra parte, en las cepas de *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, fueron requeridas concentraciones mucho más altas de bromuro de etidio para inhibir el crecimiento bacteriano (más de 8 veces con respecto a los controles).

En este punto del estudio, se observa una clara división que permite clasificar a las BAL en dos grupos, de acuerdo a su respuesta frente a bromuro de etidio.

El primer grupo lo integran los *Enterococcus* y *Streptococcus*. En todos los casos, la CMI exacta no pudo ser detectada, ya que la mínima concentración evaluada de bromuro de etidio fue de $5 \mu\text{g/mL}$ y, bajo estas condiciones, ninguna cepa de este grupo presentó crecimiento, por lo menos, no dentro de los parámetros establecidos para definir la CMI.

En un estudio previo realizado por Patel et al. (2010) se realizaron experimentos similares con bromuro de etidio para la detección de cepas que presentaran fenotipo de eflujo. En este estudio, se define como una cepa con fenotipo de eflujo a aquella que presenta una CMI de bromuro de etidio mayor a $25 \mu\text{g/mL}$, mientras que un resultado negativo para este fenotipo serían aquellas cepas con CMI menor a $12 \mu\text{g/mL}$. De acuerdo con esto y con los resultados obtenidos, se puede considerar que los integrantes de este primer grupo no presentan dicho fenotipo.

Por otra parte, el segundo grupo lo integran *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. En este grupo, las CMI más bajas detectadas correspondieron a los géneros de *Weissella* y *Lactococcus*, ambos con 40 µg/mL, lo que ya fue considerado como notablemente mayor con respecto a lo detectado, tanto en los microorganismos control, como en los microorganismos clasificados en el primer grupo.

Lactobacillus y *Leuconostoc* presentaron un incremento mucho mayor (CMI >80 µg/mL), necesitándose más del doble de bromuro de etidio para inhibir el crecimiento microbiano, con respecto a *Weissella* y *Lactococcus* y un aumento de más de 15 veces a lo necesario para inhibir el crecimiento de *Enterococcus* y *Streptococcus*.

De acuerdo a las definiciones antes descritas y a los resultados en este segundo grupo de microorganismos, se puede considerar que todos los integrantes, aún con sus diferencias, presentan CMI's lo suficientemente altas como para clasificarlos como portadores de un fenotipo de eflujo.

Con respecto a las concentraciones mínimas bactericidas, en todos los casos se observó un aumento de por lo menos el doble de la correspondiente CMI. Las menores CMB's detectadas correspondieron a los microorganismos clasificados dentro del grupo uno con 10 µg/mL. Una excepción fue observada en una cepa del género *Enterococcus* (*Enterococcus italicus* A), que se encontró notablemente susceptible al agente tóxico. En esta cepa no fue posible detectar exactamente, tanto su CMI como su CMB, que seguramente se deben encontrar por debajo de 5 µg/mL, ya que no se observó crecimiento en ninguna de las pruebas y bajo ninguna de las condiciones evaluadas.

Como se mencionó anteriormente, la detección de la CMI correspondiente a algún sustrato conocido para las bombas de expulsión de multirresistencia es una prueba rápida y sencilla para detectar posibles cepas con un fenotipo de eflujo. El segundo paso, consiste en comprobar si realmente existe este fenotipo. Para ello

se llevó a cabo un ensayo fluorométrico, en donde se aprovechan las propiedades del bromuro de etidio para emitir fluorescencia bajo la excitación de luz UV.

El bromuro de etidio emite fluorescencia débil cuando se encuentra fuera de la célula y fluoresce con mayor intensidad cuando aumenta su concentración en el citoplasma, debido a su unión con los componentes celulares. Tal unión debe ser débil si se pretende que el agente sirva como una sonda útil del eflujo, ya que una vez intercalado con el ADN, resulta en una fuerte unión que impide cualquier disociación y, consecuentemente se impide el eflujo (*Paixão et al., 2009*).

Un microorganismo que presenta fenotipo de eflujo, permitirá una menor acumulación del agente intercalante dentro de la célula, por lo tanto, al exponer a las células a radiación UV, debería encontrarse una baja emisión de fluorescencia. Caso contrario a lo que ocurriría en un microorganismo que no presente dicho fenotipo.

Tomando como base lo anterior, se llevó a cabo la medición de la acumulación de bromuro de etidio dentro de las células. Los resultados de esta prueba se presentan en la **Figura 16**. En esta gráfica se observan los resultados de la totalidad de las cepas en estudio, incluyendo a los microorganismos control.

En el estudio de Patel et al. (2010) se recomienda que se tomen como incrementos o disminuciones significativas en el eflujo, a aquellas cepas que presenten una diferencia de por lo menos un 20% en la intensidad de fluorescencia con respecto a las cepas utilizadas como control. Siguiendo estos lineamientos, se presentan en la **Figura 17** aquellas cepas del estudio en las que se observaron estas diferencias significativas.

En esta gráfica, se descartaron los microorganismos antes clasificados en el grupo 1 (*Enterococcus* y *Streptococcus*). En principio, las CMI de estos microorganismos no sugerían la presencia de un fenotipo de eflujo y, esto fue confirmado por la prueba de acumulación de bromuro de etidio, en donde no se encontraron

diferencias mayores al 20% en la intensidad de fluorescencia con respecto a los microorganismos utilizados como control (**Figura 16**). Cabe destacar el comportamiento de la cepa *Enterococcus italicus A*, que presenta una intensidad de fluorescencia muy por arriba del resto de los microorganismos, incluyendo los controles (**Figura 16**). Esto sugiere que hay una acumulación notable del agente intercalante dentro de la célula, lo cual es totalmente congruente con la carencia de un fenotipo de eflujo. Sin embargo, esta cepa en particular fue la más susceptible en las pruebas de CMI y CMB, sin presentar desarrollo en alguna de las pruebas, lo cual indica que podría tratarse de una cepa hiper-susceptible a la acción de compuestos tóxicos.

Es importante destacar que, la acumulación de bromuro de etidio en las células, medida como la intensidad de fluorescencia emitida, no tiene una relación directamente proporcional a la cantidad de antibióticos y/o CMI de bromuro de etidio detectadas en este estudio. Esto se debe a las distintas clases y cantidad de transportadores que se encuentran funcionando en cada especie en particular.

Por otra parte, en la **Figura 17** se observa que todas las cepas de los géneros *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, presentaron diferencias de más del 20% en la intensidad de fluorescencia con respecto a los microorganismos control. Esto confirma lo que se había sugerido para las BAL que clasificadas en el grupo 2, como probables portadoras de un fenotipo de eflujo.

Un incremento en la actividad de eflujo puede deberse a varios factores. Por ejemplo, a un incremento en la expresión de los genes que codifican para bombas de expulsión de MDR (*Patel et al., 2010*) y/o a un incremento en la eficiencia catalítica en el transporte de los compuestos tóxicos (*Bolhuis et al., 1994*).

Una vez detectado el fenotipo de eflujo, se quiso establecer si este se encontraba relacionado a un incremento en la expresión de genes que codifican para bombas de expulsión de MDR. Para ello se realizaron reacciones de RT-PCR buscando los

niveles de expresión para bombas específicas en cada microorganismo que mostró fenotipo de eflujo.

Como se aclaró en la sección de métodos, debido a la escasa caracterización de bombas de expulsión de MDR en BAL, solamente fue posible buscar niveles de expresión en bombas específicas y caracterizadas de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Durante la última década, *Lc. lactis* se ha convertido en una de las especies más importantes para estudiar los transportadores de MDR en bacterias Gram-positivas. Actualmente, 5 transportadores de MDR han sido descritos en este microorganismo. LmrA, LmrB y el transportador heterodimérico LmrCD, que pertenecen a la familia ABC de bombas de expulsión; mientras que, LmrP, es un transportador secundario dependiente del antiporte de protones y Mdt(A), es un transportador que comparte algunas secuencias homólogas con el transportador secundario LmrP y otras con los transportadores del tipo ABC. LmrB y Mdt(A) son proteínas codificadas por plásmidos, mientras que LmrA, LmrP y LmrCD son codificadas en el cromosoma.

LmrA y LmrP se han implicado en el fenotipo de MDR. Sin embargo, algunos análisis de inactivación de varios probables genes de bombas de MDR sugieren que la resistencia intrínseca de *Lc. lactis* a un gran número de agentes tóxicos es debida, principalmente, a la expresión del transportador LmrCD (*Agustiandari et al., 2008*). Con base en lo anterior, para los *Lactococcus* se eligió evaluar los niveles de expresión del gen *lmrD*, que forma parte del dímero del transportador LmrCD.

En la **Figura 21**, se presentan los resultados de los niveles de expresión encontrados para los genes de distintas bombas de eflujo. *Lc. lactis* fue el único microorganismo que presentó un notable aumento en la expresión de la bomba LmrD, independientemente de la condición experimental en la que fue evaluada.

Esto claramente indica que en esta cepa existe una sobre-expresión del transportador y ésta no es inducida por la presencia del agente tóxico.

Existen reportes que indican que *Lc. lactis*, en presencia de concentraciones crecientes de compuestos tóxicos, incrementa la expulsión de dichos compuestos, en un proceso dependiente de energía, sugiriendo que la expresión de los transportadores correspondientes se encuentra sobre-regulada (*Poelarends et al., 2002*).

Por otra parte, se sabe que la respuesta inmediata de *Lc. lactis* a la exposición a muchos agentes tóxicos es la sobre-regulación de los genes *ImrCD*, resultando rápidamente en un incremento en la expulsión del agente tóxico en cuestión. Esta sobre-regulación involucra la intervención de un represor transcripcional que, interactúa directamente con el sustrato tóxico para liberar la represión de los genes *ImrCD* (*Zaidi et al., 2008*).

LmrR actúa como represor de los genes *ImrCD* en *Lc. lactis*. LmrR pertenece a una familia de reguladores transcripcionales muy poco caracterizada, la familia PadR, involucrada en la regulación de mecanismos de detoxificación celular. En esta familia de reguladores, la expresión de los genes de detoxificación es típicamente inducida por la presencia de compuestos tóxicos en el medio, vía interacción directa con el regulador. De hecho, se ha demostrado que LmrR se une a muchos de los sustratos conocidos para *ImrCD* (*Agustiandari et al., 2011*).

Hay dos condiciones que se sabe provocan un aumento en la expresión de los genes *ImrCD*. Por una parte, la inducción por compuestos tóxicos en el medio y por otra parte, un regulador LmrR disfuncional. Se ha observado que en el último caso, el incremento en la expresión de los genes *ImrCD* es más notable con respecto a los casos provocados por inducción (*Agustiandari et al., 2011*).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre los niveles de expresión de *ImrD* en *Lc. lactis* sugieren que la sobre-expresión observada probablemente esté

relacionada a algún defecto en la proteína reguladora LmrR, ya que como se mencionó, el aumento en la expresión es independiente a la presencia del compuesto tóxico en el medio, por lo que la sobre-expresión por inducción debe descartarse.

Las proteínas represoras de la familia PadR (a la que pertenece LmrR) comparten una organización común de dominios con los represores MarR (involucrados también en la MDR) que comprende un extremo N-terminal con un motivo de unión al ADN hélice-giro-hélice, que a través de una región conservada de tipo bisagra se encuentra conectado a un dominio C-terminal altamente divergente. Se ha postulado que esta última región es la que se encuentra involucrada en la unión a sustratos. Curiosamente, en muchas cepas de *Lc. lactis* que presentan MDR, el gen *ImrR* contiene una mutación de corrimiento del marco de lectura o, una mutación puntual (T821 en la región conservada que forma la bisagra). Esto sugiere que la sobre-regulación de *ImrCD* observada en cepas con estas características está relacionada a la presencia de un represor LmrR defectuoso (Agustiandari et al., 2008).

Tomando en cuenta la cantidad de antibióticos a los que *Lc. lactis* presentó resistencia y la notable baja susceptibilidad observada frente a bromuro de etidio, claramente la cepa estudiada de *Lc. lactis* representa a un microorganismo con fenotipo de eflujo hacia compuestos tóxicos. La base bioquímica de este fenotipo, probablemente se encuentre mediada por la presencia de un represor defectuoso, lo cual conduce a una expresión incrementada y constitutiva del transportador de MDR, LmrCD.

Aunque estudios previos han descrito a LmrCD como el principal determinante de la resistencia a fármacos y compuestos tóxicos en *Lc. Lactis* (Lubelski et al., 2006; Zaidi et al., 2008; Agustiandari et al., 2011), continúa en discusión si otros posibles transportadores de MDR contribuyen a la resistencia, dado que el fenotipo de MDR cubre tanto a compuestos aniónicos como catiónicos.

El genoma de *Lc. lactis* contiene 40 genes probables para el transporte de compuestos tóxicos, de los cuales sólo algunos han sido caracterizados a detalle (Zaidi et al., 2008). De manera interesante, el transportador LmrA fue el primer transportador de la familia ABC encontrado en bacterias, que confiere un fenotipo de MDR.

LmrA es un homólogo funcional y estructural de la glicoproteína-P, que juega un papel crucial en la resistencia de células cancerígenas a los agentes quimioterapéuticos en células mamíferas. Este transportador expulsa y es sensible a los mismos sustratos que la glicoproteína-P (Konings et al., 2000).

Algunos experimentos indican que la expresión de LmrA en *E. coli* confiere resistencia a 17 de 21 de los antibióticos más utilizados en clínica, incluyendo antibióticos de la clase de los aminoglucósidos, cefalosporinas, macrólidos, penicilinas, quinolonas, estreptograminas y tetraciclinas. Considerando esto, LmrA presenta la más amplia especificidad de sustratos reportada para transportadores de MDR (Konings et al., 2000).

En otras BAL del género *Lactobacillus* (*Lb. brevis* y *Lb. plantarum*) se ha encontrado un homólogo de LmrA, que confiere resistencia, principalmente, a los ácidos del lúpulo, presentes durante el proceso natural de elaboración de la cerveza. Dicho homólogo es codificado por el gen *horA*, el cual se encuentra localizado en un plásmido de resistencia.

Se sabe que algunas bombas de MDR de bacterias Gram-positivas, como las Lmr (dependientes de ATP y pertenecientes a la familia de transportadores ABC), son homólogas a las bombas de eflujo que inhiben la acción de agentes quimioterapéuticos en células eucariotas, por lo que podrían compartir en muchos casos, su espectro de sustratos (Hogan & Kolter, 2009).

Para evaluar la expresión en los *Lactobacillus* se buscaron genes que codificaran para bombas de eflujo ubicados en el cromosoma, aquí se encontró el gen *ImrA* que codifica para una bomba de eflujo de la familia ABC y al hacer un

alineamiento de secuencias por BLAST, se encontró que está presente en el genoma de todas las especies de *Lb. plantarum* incluidas en la base de datos. En los resultados correspondientes a la expresión del transportador de MDR en los *Lactobacillus*, se observa que no hay un incremento en la expresión de *ImrA* independientemente de la presencia del agente tóxico en el medio. Incluso, *ImrA* se encuentra expresado a niveles ligeramente por debajo de los correspondientes al gen constitutivo, al observarse un ratio de expresión con valor menor a 1.

Estos resultados ofrecen, por lo menos, dos posibles explicaciones. Por una parte, se podría considerar que de manera particular *LmrA* no es el principal transportador implicado en la respuesta de *Lb. plantarum* frente a agentes tóxicos ya que la expresión de dicho transportador no se vio modificada en las dos condiciones experimentales evaluadas. Lo anterior no implica que otro tipo de transportadores (que no fueron evaluados en este estudio) pudieran estar relacionados tanto con la respuesta a la presencia de agentes tóxicos en el medio, como al fenotipo de eflujo observado en estas cepas.

Por otra parte, se sugiere que debido a los medios en los que se desarrollan las BAL, deben portar una serie de mecanismos que les permitan sobrevivir a muchas condiciones adversas. Por ejemplo, a las condiciones que son sometidas durante los procesos industriales en los que se les utiliza, a las condiciones desfavorables que impone un proceso de fermentación, a las condiciones adversas propias de la flora gastrointestinal o vaginal, a compuestos tóxicos secretados por plantas, etc. (*Van de Guchte et al., 2002*).

Debe considerarse el hecho de que al igual que *Lc. lactis*, *W. confusca* y *Ln. Mesenteroides*, *Lb. plantarum* presentó resistencia a un número considerable de antibióticos distribuidos en distintas familias, lo que permitió clasificarlo como multiresistente. Además, la baja susceptibilidad hacia bromuro de etidio fue sobresaliente, lo cual indica que estos microorganismos necesariamente deben portar mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos, probablemente mucho más eficientes que otro tipo de bacterias.

Respecto a lo anterior, se sabe que las bombas de eflujo de MDR no se limitan a tareas de detoxificación. Muchas moléculas tóxicas son sustrato para más de una bomba de eflujo en un mismo organismo; por lo tanto, si la detoxificación fuera la única función de las bombas de eflujo, no sería necesario portar un gran número parálogos de bombas de MDR en el cromosoma.

Además de las funciones de detoxificación, las bombas de expulsión de MDR contribuyen a la adaptación a diferentes medios y condiciones. Entre estas funciones se encuentran: la resistencia a metales tóxicos, a solventes, la función de permitir interrelaciones con otros organismos (p. ej. plantas, nemátodos y protozoarios), la intervención en los procesos de colonización y virulencia, la comunicación célula a célula y, en general, el mantenimiento de la homeostasis celular (*Martinez et al., 2009*).

Con frecuencia, las llamadas bombas de MDR expulsan fármacos y/o otros compuestos tóxicos sólo cuando se sobre-expresan, sin embargo, no tienen un papel en la MDR a niveles de expresión fisiológicos (*Martinez et al., 2009*).

Parte del mantenimiento de la homeostasis bajo las condiciones que enfrentan las BAL, por ejemplo, durante un proceso de fermentación podría involucrar la expresión y/o funcionamiento simultáneo de distintos mecanismos de defensa (no exclusivamente bombas de eflujo de MDR). Si esta es la situación que ocurre en *Lb. plantarum* podría ser también la razón por la que no se encuentra sobre-expresada una bomba en particular, ya que pudiera estar cumpliendo su papel fisiológico en el organismo al nivel de expresión observado, que en conjunto con el funcionamiento de otros sistemas, permiten la aparición del fenotipo de eflujo observado en este microorganismo.

De manera interesante, se ha propuesto que la expresión en conjunto de los transportadores de MDR en un organismo es monitoreada a detalle y cuando los niveles de algún sistema son alterados, se producen cambios compensatorios en los niveles de otro sistema. Esto refuerza la percepción de que la expresión de

diferentes sistemas de MDR en las bacterias debe ser coordinada con la finalidad de mantener la homeostasis en cualquier situación (*Martinez et al., 2009*).

8. Conclusiones

Los antibióticos son la principal herramienta utilizada por la industria del cuidado de la salud para combatir las infecciones bacterianas. Décadas de consecuente uso y “mal-uso” de estos agentes han dado como resultado la aparición de la resistencia bacteriana, complicando en muchas ocasiones el tratamiento de infecciones comunes.

Por mucho tiempo, los estudios sobre la selección y diseminación de la resistencia a antibióticos se habían enfocado principalmente a las especies clínicamente relevantes. Sin embargo, el desarrollo y adquisición de mecanismos o determinantes de resistencia no es exclusivo de especies patógenas y con relevancia clínica, es por ello que recientemente muchos investigadores han puesto atención al estudio de las bacterias comensales, incluyendo al grupo de las bacterias ácido lácticas (*Mathur & Singh, 2005*).

La cadena alimenticia ha sido reconocida como la principal ruta de transmisión de la resistencia antibiótica entre animales y las poblaciones bacterianas de humanos. Más específicamente, los productos fermentados que no reciben un tratamiento térmico antes de su consumo, proveen un vehículo para la transmisión de determinantes de resistencia desde la microbiota natural de los animales hacia las bacterias del tracto gastrointestinal en humanos (*Mathur & Singh, 2005*).

Agregadas como iniciadores o presentes en las materias primas, las bacterias ácido lácticas participan en la manufactura y preservación de alimentos fermentados y otros productos alimentarios. Las BAL también se encuentran comúnmente asociadas con las bifidobacterias, dentro de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales. Tienen un potencial considerable como probióticos basado en su larga historia de uso seguro y a la evidencia creciente que respalda sus efectos de promoción de la salud. Sin embargo, actualmente se ha puesto más atención a las BAL comensales ya que se ha propuesto, que éstas

pueden actuar como reservorio de genes de resistencia similares a los genes encontrados en microorganismos patógenos y contribuir a su diseminación en matrices alimentarias y dentro del tracto gastrointestinal (*Ammor et al., 2008*).

Las bombas de expulsión de MDR difieren de los clásicos determinantes de resistencia a antibióticos en muchos aspectos. Principalmente en el concepto de que los genes de resistencia a antibióticos han sido originados a partir de los microorganismos productores de antibióticos y que han sido diseminados entre las bacterias por eventos de transferencia horizontal. En contraste, se sabe que la mayoría de los genes que codifican para bombas de expulsión de MDR se encuentran en el cromosoma y exhiben estructuras altamente conservadas, además de una expresión finamente regulada.

Las bacterias portadoras de bombas de MDR no se encuentran limitadas a ambientes en donde hay presencia de antibióticos. Estas características sugieren que las bombas de eflujo de MDR codificadas en el cromosoma no son genes de resistencia a antibióticos recientemente adquiridos por patógenos bacterianos en respuesta a la terapia con antimicrobianos, más bien, parecen ser elementos antiguos que han ido evolucionando y que resultan altamente relevantes en el comportamiento ecológico y fisiología de todos los seres vivos, incluyendo a las bacterias (*Martinez et al., 2009*).

En este estudio se evaluó la susceptibilidad de algunas cepas de bacterias ácido lácticas a distintas familias de antibióticos. Se encontró que de manera general, presentan perfiles de resistencia bastante amplios. En todos los casos la resistencia abarcó simultáneamente más de 3 familias distintas de antibióticos, por lo que las BAL fueron consideradas como portadoras de un fenotipo de multiresistencia (a excepción de los enterococos). Adicionalmente, el fenotipo de multiresistencia también se asoció a un fenotipo de eflujo en microorganismos de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*.

Sin embargo, solamente en el caso de *Lc. lactis* fue posible establecer una relación entre los fenotipos de multiresistencia y de eflujo y la sobreexpresión de una bomba de expulsión de MDR, provocada, probablemente por una proteína represora defectuosa.

Salvo el caso de *Lc. lactis*, no parece haber una relación directa entre la sobreexpresión de bombas de eflujo y el fenotipo de multiresistencia a antibióticos asociado a las bacterias ácido lácticas. Los resultados de este estudio sugieren que la resistencia en estas bacterias, podría estar mediada principalmente por otros mecanismos de resistencia intrínseca como la ausencia de blanco del antibiótico y diversas modificaciones en el sitio blanco, entre otras. Aunque no debe descartarse la posibilidad de que otras bombas de eflujo de MDR, no evaluadas en este estudio se encuentren funcionando como un mecanismo importante y/o contribuyan al fenotipo de eflujo observado en todos los casos.

Sin embargo, es necesario hacer un estudio más extenso, abarcando un mayor número de microorganismos ácido lácticos, además de evaluar los niveles de expresión en bombas de eflujo de MDR alternativas para poder generalizar los resultados observados.

Se ha demostrado que los transportadores de MDR en *Lc. Lactis* casi no han cambiado desde hace más de 70 años, incluso desde antes del inicio de la era de los antibióticos y antes de que algunos de los antimicrobianos y compuestos citotóxicos que son sustrato para dichos transportadores fueran sintetizados. Esto sugiere que los transportadores de MDR tienen una importante función fisiológica, probablemente relacionada a su medio ambiente natural (*Flórez et al., 2006*).

Es necesario impulsar la realización de más estudios sobre la resistencia antibiótica en BAL como respuesta a la creciente necesidad de establecer valores de corte claros y específicos que permitan separar a las bacterias ácido lácticas susceptibles de aquellas resistentes, de distinguir entre formas intrínsecas y adquiridas de resistencia en estos microorganismos y de estudiar los mecanismos

moleculares involucrados en el mantenimiento y función de la resistencia entre la comunidad de bacterias ácido lácticas (*Ammor et al., 2008*).

9. Perspectivas

Este trabajo representa una pequeña contribución a los estudios sobre el papel que desempeñan las bombas de expulsión en la multirresistencia a antibióticos encontrada en bacterias ácido lácticas. Además, da pauta a continuar realizando estudios que complementen y enriquezcan los resultados aquí obtenidos.

Algunos estudios que se sugieren son:

Ampliar los experimentos realizados con un número mayor de cepas de BAL, para poder generalizar las observaciones en distintos géneros de BAL o atribuir ciertas características a algún género o especie en particular, según sea el caso.

Evaluar los niveles de expresión de genes de bombas de eflujo alternativas que pudieran estar involucradas a los altos niveles de resistencia observados.

Comprobar si existen defectos en el represor LmrR de la bomba LmrD de la cepa de *L. lactis* estudiada, tal como sugieren los resultados obtenidos (p. ej. Mediante el uso de enzimas de restricción o por medio de secuenciación).

Evaluar si el fenotipo de eflujo observado se extiende de manera cruzada a otro tipo de compuestos tóxicos (p. ej. daunomicina, rodamina u otros compuestos).

Determinar los valores de las CMI de distintas clases de antibióticos en cepas de BAL. Establecer si existe una relación entre un posible aumento en los valores de las CMI, la multirresistencia asociada y los fenotipos de eflujo.

Estudiar los patrones de resistencia en BAL dados por la expresión/sobreexpresión de bombas de expulsión codificadas por elementos genéticos móviles (p. ej. plásmidos o transposones).

10. Referencias

1. Aarestrup, F., Wegener, H., Collingnon, P. **Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies.** Expert Review of Anti-infective Therapy. **6**(5): 733-750, 2008.
2. Abdelgadir, W., et al. **A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius subsp. Infantarius*.** International Journal of Food Microbiology. **127**: 215-219, 2008.
3. Agustindari, H., et al. **LmrR is a transcriptional repressor of expression of the multidrug ABC transported LmrCD in *Lactococcus lactis*.** Journal of Bacteriology. **190**(2): 759-763, 2008.
4. Agustindari, H., et al. **LmrR-mediated gene regulation of multidrug resistance in *Lactococcus lactis*.** Microbiology. **157**: 1519-1530, 2011.
5. Alekshun, M., Levy, S. **Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.** Cell. **128**: 1037-1050, 2007.
6. Ammor, M.S., Flórez, A.B. and Mayo, B. **Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria.** Food Microbiology. **24**: 559-570, 2007.
7. Ammor, M.S., et al. **Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria.** Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. **14**: 6-15, 2008.
8. Asahara, T., et al. **Assessment of safety of *Lactobacillus* strains based on resistance to host innate defense mechanisms.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. **10**: 169-173, 2003.
9. Ayeni, F., et al. **Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine.** International Journal of Food Microbiology. **147**: 97-104, 2011.
10. Barbosa, T.M., Levy, S.B. **The impact of antibiotic use on resistance development and persistence.** Drug Resistance Updates. **3**: 303-311, 2000.
11. Bolhuis, H., et al. **Proton motive force-driven and ATP-dependent drug extrusion systems in multidrug-resistant *Lactococcus lactis*.** Journal of Bacteriology. **176**(22): 6957-6964, 1994.
12. Borges-Walmsley, M., et al. **Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs.** Biochemical Journal. **376**: 313-338, 2003.
13. Bronzwaer, S.L., et al. **A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance.** Emerging Infectious Diseases. **8**: 278-82, 2002.

14. Calvo, J., Martínez-Martínez, L. **Mecanismos de acción de los antimicrobianos.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **27**: 44-52, 2009.
15. Cannon, J.P., Lee, T.A., Bolanos, J.T. and Danziger, L.H. **Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. **24**: 31-40, 2005.
16. Cavallieri, S., et al. **Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.** University of Washington. Seattle, Whashington, 2005.
17. Clementi, F. and Aquilanti, L. **Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria.** Anaerobe. **17**(6): 394-8, 2011.
18. Cordiés, L., et al. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.** Acta Médica. **8**(1): 13-27, 1998.
19. D'Aimmo, M., Modesto, M. and Biavati, B. **Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium spp.* Isolated from dairy and pharmaceutical products.** International Journal of Food Microbiology. **115**: 35-42, 2007.
20. Danielsen, M., Wind, A. **Susceptibility of *Lactobacillus spp.* To antimicrobial agents.** International Journal of Food Microbiology. **82**: 1-11, 2003.
21. Davies J. **Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes.** Science. **264**: 375-382, 1994.
22. Ernst, R., et al. **Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps – first come, first served?.** FEBS Journal. **277**: 540-549, 2010.
23. Federici, L., et al. **New structure model for the ATP-binding cassette multidrug transporter LmrA.** Biochemical Pharmacology. **74**: 672-678, 2007.
24. Flórez, A., Delgado, S. and Mayo, B. **Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment.** NRC Research Press Web site <http://cjm.nrc.ca>, Marzo 2005.
25. Flórez, A., et al. **Ubiquity and diversity of multidrug resistance genes in *Lactococcus lactis* strains isolated between 1936 and 1995.** FEMS Microbiology Letters. **263**: 21-25, 2006.
26. Flórez, A., et al. **Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of new susceptibility-resistance cut-off values.** The Journal of dairy research. **74**(3): 262-268, 2007.
27. Flórez, A.B. **Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia.** TESIS DOCTORAL, UNIVERSIDAD DE OVIEDO, Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, 2007.

28. Floyd, J., et al. **LmrS Is a Multidrug Efflux Pump of the Major Facilitator Superfamily from *Staphylococcus aureus***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**(12): 5406-5412, 2010.
29. Franz, C.M., et al. **Enterococci in foods- a conundrum for food safety**. *International Journal of Food Microbiology*. **88**: 105-122, 2003.
30. Galun, E. **Bacterial insertion sequences**. In: *Transposable elements* (2003). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
31. García, J.M. **Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos**. *Actualidad, Sociedad Española de Microbiología*. **28**: 18-22, 1999.
32. Georgopapadakou, N.H. **Beta-lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets**. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. **13**: 1307-1318, 2004.
33. Granizo, J., et al. ***Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and β -lactam consumption in Spain (1979-1997)**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **46**: 767-773, 2000.
34. Hawkey, P.M. **Mechanisms of resistance to antibiotics**. *Intensive Care Medicine*. **26** Suppl 1:S9-13, 2000.
35. Hernández-Castañeda, S. **Investigación de Resistencia a antimicrobianos en cepas de bacterias lácticas aisladas de pozol**. Informe de actividades del servicio social. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, 2007.
36. Hogan, D. and Kolter, R. **Why are bacteria refractory to antimicrobials?**. *Contributions to Science*. **5**(1): 85-90, 2009.
37. Hörner, R., et al. **Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Streptococcus bovis*: case report and review of the literature**. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **14**(3): 294-296, 2010.
38. Hummel, A., Hertel, C., Holzapfel, W. and Franz, C. **Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of Lactic Acid bacteria**. *Applied and environmental microbiology*. **73**(3): 730-739, 2007.
39. Huys, G., et al. **Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility testing methods for bifidobacteria and nonenterococcal Lactic Acid bacteria**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**(6): 2567-2574, 2010.
40. Ishibashi, N. and Yamazaki, S. **Probiotics and safety**. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **73**:465S-470S, 2001.
41. Jay, J.M. **Fermentation and fermented dairy products**. In *Modern Food Microbiology* ed. Anonymous pp. 113-130. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. (2000).

42. Jiménez-Castellanos, JC. **Presencia de bacterias multirresistentes a antibióticos en piel sana de individuos jóvenes asintomáticos.** Reporte de estancia, Laboratorio de Microbiología molecular, Facultad de Química UNAM, 2010.
43. Kaatz, G., et al. **Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **44(5)**: 1404-1406, 2000.
44. Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. **Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. **71**: 477-494, 2007.
45. Konings, W., et al. **The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria.** Antonie van Leeuwenhoek. **71**: 117-128, 1997.
46. Konings, W., Kok, J., Kuipers, O. and Poolman, B. **Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium.** Current Opinion in Microbiology. **3**: 276-282, 2000.
47. Korhonen, J. **Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria.** Dissertations in Forestry and Natural Sciences, Publications of the University of Eastern Finland, Department of Biosciences, 2010.
48. Kushiro, A., et al. **Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth microdilution method and Etest.** International Journal of Food Microbiology. **132**: 54-58, 2009.
49. Li, Xian-Zhi, Nikaido, H. **Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update.** Drugs. **69(12)**: 1555-1623, 2009.
50. Liu, C., et al. **Antibiotic resistance of probiotic strains of Lactic Acid bacteria isolated from marketed foods and drugs.** Biomedical and environmental sciences. **22**: 401-412, 2009.
51. Lomovskaya, O., et al. **Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **45**: 105–116, 2001.
52. Lubelski, J., et al. **LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*.** Molecular Microbiology. **61(3)**: 771-781, 2006.
53. Markham, P.N., and A. Neyfakh. **Inhibition of the multi-drug transporter norA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **40**:2673–2674, 1996.
54. Martínez, J., et al. **Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems.** FEMS Microbiology reviews. **33**: 430-449, 2009.
55. Mathur, S., Singh, R. **Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review.** International Journal of Food Microbiology. **105**: 281-295, 2005.

56. Mazel, D., Davies, J. **Antibiotic resistance in microbes.** Cellular and Molecular Life Sciences. **56**: 742-754, 1999.
57. Mella, S., et al. **Aminoglucósidos-aminociclitolos: características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia.** Revista Chilena de Infectología. **21**(4): 330-338, 2004.
58. Molenaar, D., et al. **The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*.** Journal of Bacteriology. **174**(10): 3118-3124, 1992.
59. Morlon-Guyot, J., et al. ***Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation.** International Journal of Systematic Bacteriology. **48**: 1101-1109, 1998.
60. NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (approved Standard M2-A4) Villanova, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1984.
61. Nikaido, H. **Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux.** Science. **264**: 382-388, 1994.
62. Nikaido, H. **Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria.** Journal of Bacteriology. **178**(20): 5853-5859, 1996.
63. Nikaido, H. **Multidrug resistance in bacteria.** Annual Review of Biochemistry. **78**: 119-146, 2009.
64. Núñez, B., et al. **Programa: Uso racional de antibióticos,** Bristol-Myers Squibb.
65. Oethinger, M., W. V. Kern, A. S. Jellen-Ritter, L. M. McMurry, and S. B. Levy. **Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **44**: 10-13, 2000.
66. Orman, B. **La resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión.** Revista de la Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. **21**(50/51): 13-19, 2006.
67. Paixão, L., et al. **Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*.** Journal of Biological Engineering. **3**: 18, 2009.
68. Patel, D., et al. **Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **54**(12): 5070-5073, 2010.
69. Paulsen, I. **Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution.** Current Opinion in Microbiology. **6**: 446-451, 2003.

70. Perreten, V., Schwarz, F.V., Teuber, M., Levy, S.B. **Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus***. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*. **4**:273-294, 2001.
71. Piddock, L. **Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria**. *Clinical Microbiology Reviews*. **19**(2): 382-402, 2006.
72. Piddock, L. **Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance**. *Nature*. **4**: 629-636, 2006.
73. Pinilla, G., et al. **Presencia de Integrones Clase 1 en Aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* de las unidades de neonatología del Instituto Materno Infantil de Bogotá**. *Nova-Publicación científica*. **4**(6): 55-59.
74. Poelarends, G.J., et al. **Multidrug transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis***. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1555**: 1-7, 2002.
75. Poole, K. **Efflux mediated antimicrobial resistance**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**: 20–51, 2005.
76. Putman, M., et al. **Antibiotic resistance: era of the multidrug pump**. *Molecular Microbiology*. **36**(3): 772-774, 2000.
77. Robredo, B., et al. **Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food**. *International Journal of Food Microbiology*. **54**: 197-204, 2000.
78. Roe, M.T., Pillai, S.D. **Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria**. *Journal of Poultry Science*. **82**: 622-626, 2003.
79. Rodríguez-Alonso, P., et al. **Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making**. *Journal of Food Science*. **74**(6): M284-M293, 2009.
80. Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. **Resistance gene capture**. *Current Opinion in Microbiology*. **2**: 483-488, 1999.
81. Saier, M., et al. **Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria**. *The FASEB Journal*. **12**: 265-274, 1998.
82. Saier, M. and Paulsen, I. **Phylogeny of multidrug transporters**. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. **12**: 205–213, 2001.
83. Sainz, T., et al. **Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food**. *International Journal of Food Microbiology*. **71**: 169-176, 2001.
84. Salyers, A., Gupta, A., Wang, Y. **Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes**. *Trends in Microbiology*. **12**(9): 412-416, 2004.

85. Stermitz, F., et al. **Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor.** PNAS. **97**(4): 1433-1437, 2000.
86. Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. **Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.** International Journal of Food Microbiology. **36**:1-29, 1997.
87. Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. **Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food.** Antonie van Leeuwenhoek. **76**: 115-137, 1999.
88. Thomas, C. **Paradigms of plasmid organization.** Molecular Microbiology. **37**(3): 485-491, 2000.
89. Trejo-Muñúzuri, T. **Estudio del comportamiento de bacterias multiresistentes a antibióticos aisladas de alimentos para consumo humano frente a agentes naturales con efecto biocida.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
90. Ulmer, H., Ganzle, M., & Vogel, R. **Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460.** Applied and Environmental Microbiology. **66**(9): 3966-3973, 2000.
91. Ulmer, H., et al. **Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*.** Applied and Environmental Microbiology. **68**(3): 1088-1095, 2002.
92. Van Banbeke, F., Balzi, E. and Tulkens, P. **Antibiotic Efflux Pumps.** Biochemical Pharmacology. **60**: 457-470, 2000.
93. Van de Guchte, M., et al. **Stress responses in lactic acid bacteria.** Antonie van Leeuwenhoek. **82**: 187-216, 2002.
94. Van Veen, H.W., et al. **Structure—function analysis of multidrug transporters in *Lactococcus lactis*.** Biochimica et Biophysica Acta. **1461**: 201-206, 1999.
95. Vay, C., et al. **Antimicrobial susceptibility of non-enterococcal intrinsic glycopeptide-resistant Gram-positive organisms.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **57**: 183-188, 2007.
96. Venter, H., et al. **An ABC transporter with a secondary-active multidrug translocator domain.** Nature. **426**: 866-870, 2003.
97. Walsh, C.T. **Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance.** Nature. **406**: 775-781, 2000.
98. Webber, M and Coldham, N (2010). Chapter 13: Measuring the activity of active efflux in Gram-negative bacteria. En Gillespie, S. and McHugh, T. (eds.) Antibiotic resistance protocols, Series: Methods in molecular biology, Vol 642, pp. 173-180, 2nd ed.

99. Zaidi, A., et al. **The ABC-type multidrug resistance transporter LmrCD is responsible for an extrusion-based mechanism of bile acid resistance in *Lactococcus lactis*.** *Journal of Bacteriology*. **190**(22): 7357-7366, 2008.