



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PARTICIPACIÓN DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN EN LA RESISTENCIA
DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBIÓTICOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANA KAREN AVILA ALVARADO

MÉXICO, D.F.

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**

VOCAL: **Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa**

SECRETARIO: **Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Luciano Hernández Gómez**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Química

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

SUSTENTANTE:

Ana Karen Avila Alvarado

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Fernando Montiel por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A la M. en C. Raquel Ortega Muñoz por brindarme su apoyo en cualquier momento.

A Juan Jiménez Castellanos por brindarme todo su apoyo y su tiempo durante el desarrollo experimental del estudio.

A mis padres por brindarme su cariño, paciencia y los recursos necesarios para finalizar el presente trabajo.

A Allan Lozano Romero por ser aquella persona especial que estuvo y estará conmigo en todo momento.

A mis tíos por sus consejos y por brindarme su apoyo.

A mis amigos por estar acompañándome durante todo el tiempo que dura la carrera, especialmente Adán Barrios Rivera.

ABREVIATURAS

ABC ATP-binding cassette transporter

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ATP Adenosine Triphosphate

CCCP Cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EPIs Efflux Pump Inhibitors

EtBr Bromuro de Etidio

DME Drug/Metabolite Efflux

IMP Integral Membrane Protein

MATE Multidrug and toxic compound extrusion

MDR Multidrug-resistant efflux pumps

MF Major Facilitator

MFS Major Facilitator Superfamily

MFP Membrane Fusion Protein

MIC Minimum Inhibitory Concentration

MRP Multidrug Resistance Protein

MRSA Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

OMF Outer Membrane Factor

P-gp P-glycoprotein

PCR Polymerase Chain Reaction

RT-PCR Reverse Transcription-PCR

SDS Dodecilsulfato de sodio.

SLS Laurilsulfato de sodio.

SMR Small Multidrug Resistance

RND Resistance/Nodulation/Cell Division

5-MHC 5-metoxihidnocarpim.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 CONTEXTO HISTÓRICO.....	10
1.2 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	11
1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	13
1.4 BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	14
1.5 BOMBAS DE EXPULSIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	17
1.5.1 MECANISMOS DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	18
1.5.2 TIPOS DE BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	21
1.5.3 SUSTRATOS DE BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	27
1.6 SOBREENPRESIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	29
1.7 DETECCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	30
1.7.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	31
1.7.2 MÉTODO FLUOROMÉTRICO.....	32
1.7.2.1 SUSTRATOS FLUORESCENTES.....	35
1.7.2.2 MÉTODO FLUOROMÉTRICO UTILIZANDO ETBR.....	36
1.7.2.2.1 BROMURO DE ETIDIO.....	37
1.7.3 OTROS MÉTODOS.....	38
1.8 INHIBIDORES DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	38
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
3. HIPÓTESIS.....	44
4. OBJETIVO GENERAL.....	45

4.1	OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1	CEPAS BACTERIANAS.....	46
5.2	REACTIVOS.....	46
5.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	47
5.4	FLUOROMETRÍA.....	48
6.	RESULTADOS	
6.1	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	50
6.2	EXPULSIÓN DEL BROMURO DE ETIDIO.....	51
7.	DISCUSIÓN.....	55
8.	CONCLUSIÓN.....	58
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Adquisición de resistencia a antibióticos.....	13
Figura 2. Estructura de la P-gp.....	15
Figura 3. Clasificación de los cuatro sitios de unión del fármaco en la P-gp...16	
Figura 4. Representación esquemática de la topología de las bombas de expulsión impulsadas por protones.....	19
Figura 5. Representación esquemática de la topología de las bombas de expulsión impulsadas por Na ⁺	20
Figura 6. Representación esquemática de la topología de los transportadores que pertenecen a la superfamilia ABC.....	20
Figura 7. Representación esquemática de la topología de los transportadores MF.....	23
Figura 8. Representación esquemática de la topología de los transportadores SMR.....	24
Figura 9. Modelo de bomba de expulsión RND.....	25
Figura 10. Comparación del modelo de bomba de expulsión MATE contra MFS.....	26
Figura 11. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	32
Figura 12. E-test.....	32
Figura 13. Diagrama de Jablonski.....	33
Figura 14. Espectro de fluorescencia y excitación del EtBr.....	36
Figura 15. Estructura plana del bromuro de etidio.....	37
Figura 16. Mecanismos generales de inhibición de las bombas de expulsión.....	39

Figura 17. Plantas medicinales productoras de 5-MHC inhibidor de bombas de expulsión.....	41
Figura 18. Formulas estructurales de sustratos e inhibidores de la bomba de expulsión NorA.....	41
Figura 19. Acumulación de bromuro de etidio en cepa control de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	52
Figura 20. Expulsión de bromuro de etidio en cepa alfa de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	53
Figura 21. Expulsión de bromuro de etidio en cepa beta de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	53
Figura 22. Expulsión de bromuro de etidio en cepa gama de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	54
Figura 23. Acumulación (control) y expulsión de bromuro de etidio en cepas de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bombas de Expulsión: Sus orígenes y sustratos.....	27
Tabla 2. Diluciones de bromuro de etidio.....	47
Tabla 3. Turbidez de cada tubo en diferentes concentraciones de EtBr.....	50
Tabla 4. Fluorescencia a través del tiempo de cada cepa.....	51

RESUMEN

Las bombas de expulsión son proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana citoplasmática de las células, capaces de transportar una o varias clases de estructuras de distintos componentes usando un gradiente de iones o ATP como energía. En sí, su papel fisiológico es la expulsión de sustancias tóxicas para mantener bajas concentraciones de éstas dentro de las células. Éstas son parte de la resistencia intrínseca de las bacterias debido a que se encuentran naturalmente presente en ellas.

La resistencia bacteriana se ha ido desarrollando desde el descubrimiento y uso irracional de antibióticos. Hoy en día la resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con implicaciones sociales y económicas.

La mayoría de estas bombas de expulsión parecen apartarse de las leyes del transporte convencional que rigen la selectividad de las proteínas, es decir, se oponen al famoso modelo de la llave y la cerradura. Sus sustratos casi no tienen nada en común excepto que son moderadamente hidrofóbicos. Algunos sustratos de las bombas de expulsión son los componentes orgánicos monocationicos como el SDS, otros como acriflavina, bromuro de etidio y CCCP. Estudios anteriores muestran que el bromuro de etidio es uno de los sustratos que comparten la mayoría de las bombas de expulsión.

Patel, D et al., 2010 por medio de RT-PCR han demostrado que *S. aureus* adquiere altos niveles de resistencia debido a la exposición frecuente y prolongada de sustratos como los compuestos catiónicos, un ejemplo el SDS, los cuales pueden incrementar la expresión de genes que codifican las bombas de expulsión.

En el presente trabajo se estudiaron cepas de *Escherichia coli* DH5 α tratadas anteriormente con SDS comprobando que este compuesto genera una mayor expulsión de agentes tóxicos como EtBr suponiendo la sobreexpresión de los genes que codifican para las bombas de expulsión ocasionando resistencia a antibióticos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto Histórico

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 y su comercialización en las décadas de 1940 se fue desarrollando una gran variedad de muchos otros antibióticos⁴⁷. Hoy en día, grandes cantidades de antibióticos han sido usados para el tratamiento de infecciones en humanos y en animales y como promotores del crecimiento en animales; resultando, por presión selectiva, la aparición de diversas clases de resistencia a ellos en múltiples bacterias.²⁷

Un ejemplo que ofrece lecciones sobre la evolución de la resistencia es la bacteria *Staphylococcus aureus*; cepas de esta bacteria son resistentes a bencilpenicilina y algunas lo son a meticilina, gentamicina o ambas; algunas otras también son resistentes a desinfectantes.¹⁴

MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, por sus siglas en inglés) es uno de los mayores problemas en los hospitales, debido a que regularmente se encuentra en estos lugares ocasionando infecciones muy severas. En el 2002 en EUA se encontraron cepas de MRSA que también son resistentes a vancomicina, tradicionalmente considerada como la última opción para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo.⁷⁰

En México se ha visto que la prevalencia de cepas MRSA se ha incrementado rápidamente en los hospitales durante los últimos años. Se estima que ha cambiado del 7% al 30%. En un estudio realizado en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Siglo XXI-IMSS, se encontró que la frecuencia de cepas MRSA varió del 17% al 23% de 1997 a 2001.⁶

Por otra parte, la resistencia simultánea a múltiples fármacos como penicilinas y cefalosporinas¹¹ se descubrió en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* a finales de la década de 1950 y comienzos de la década de 1960.⁴⁷

Hoy en día la resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con implicaciones sociales y económicas enormes dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, aumento de los costos de los tratamientos y de las largas estancias hospitalarias generadas. Varios son los factores que han contribuido a su aparición⁵:

- La presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes tomando en cuenta la flora local de cada institución o comunidad.

1.2 Resistencia a Antibióticos

La resistencia a antibióticos es la capacidad que tienen los microorganismos de soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlos. Esta puede ser clasificada como⁴⁹:

- Resistencia fisiológica (natural). Por medio de biopelículas o de manera intrínseca.

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Las bacterias que presentan este tipo de crecimiento son difíciles de erradicar con tratamiento antibiótico. Bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* puede adoptar esta forma de biopelícula causando infecciones de pulmón en pacientes con fibrosis quística.¹²

La resistencia intrínseca significa que cada miembro de una especie de bacteria sea resistente sin tener alguna alteración genética. Ejemplo de

esto es *Mycoplasma sp.*, microorganismo que es siempre resistente a antibióticos β -lactámicos debido a que no posee peptidoglicano en su pared celular.⁴⁹

Pseudomonas aeruginosa ejemplifica un organismo con alta resistencia intrínseca. Se ha demostrado que la alta resistencia en este organismo surge de la combinación inusual de la permeabilidad de la membrana externa y otros mecanismos de resistencia naturales tales como las bombas de expulsión dependientes de energía.⁶¹

- Resistencia adquirida. Es una característica propia de ciertas cepas, cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutación de un gen implicado en el modo de acción de un antibiótico o transferencia génica horizontal; por ejemplo adquisición de genes a través de plásmidos, transposones (cromosomal o integrado en plásmidos) o integrones (cassettes de ADN transmisibles).⁴⁹

En general esta adquisición de genes o intercambio se lleva a cabo a través de tres procesos: transducción vía bacteriófagos, conjugación vía plásmidos y transformación (Figura 1).¹

Los plásmidos pueden contener varios genes para resistencia; tienen replicación independiente y pueden ser caracterizados por sus orígenes de replicación. Múltiples plásmidos pueden existir dentro de una sola bacteria donde sus genes son añadidos al genoma total del organismo.⁶⁸

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden existir en plásmidos o integrados dentro otros transposones.⁶²

Los integrones contienen una colección de genes generalmente clasificados de acuerdo a su secuencia de proteína (integrasa). Tienen la habilidad de integrarse dentro de regiones de ADN, donde intercambian múltiples genes particularmente de resistencia.³⁶

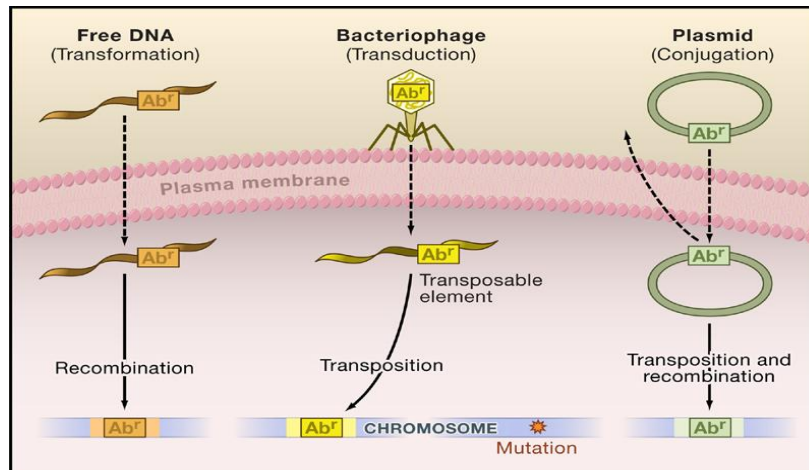


Figura 1. Adquisición de resistencia a antibióticos; de izquierda a derecha transformación, transducción vía bacteriófagos, conjugación vía plásmidos o transposones. Tomado de Alekshun, M and Levy, S., 2007⁽¹⁾

La resistencia también puede llegar a ocurrir por el incremento de la expresión de genes propios.

1.3 Mecanismos de Resistencia a Antibióticos

Los mecanismos bioquímicos y moleculares por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico son debidos a la:

- Menor captación del antibiótico.
- Expulsión del antibiótico.
- Modificación del sitio blanco.
- Modificación del antibiótico.

Cabe resaltar que los cuatro mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y difieren dependiendo de las especies bacterianas.¹³

1.4 Bombas de Expulsión

Las bombas de expulsión han sido estudiadas durante la segunda mitad del siglo XX, un ejemplo de ello es el estudio de los transportadores ABC, los cuales son una familia de proteínas transmembranales que median el transporte de sustratos a la célula como EtBr, fluoroquinolonas y esteroides. Sin embargo, a pesar de esta diversidad de sustratos, la mayoría de los transportadores ABC muestran una especificidad fuertemente restringida.²⁹

Una excepción es la P-gp (P-glycoprotein, por sus siglas en inglés) que pertenece a esta familia y se encuentra en eucariontes y procariontes⁴⁶; la cual puede interactuar con un gran número de sustratos que son estructural o funcionalmente diferentes.²⁰ Estos sustratos casi no tienen nada en común, excepto que la mayoría de ellos llevan una carga eléctrica positiva y todos ellos son moderadamente hidrófobos.⁴⁶ Estas bombas de expulsión de multifármacos parecen desobedecer las leyes de transporte convencional que rigen la selectividad de las proteínas y las enzimas.⁷

La P-gp es codificada por el gen *mdr1*, dentro del organismo en humanos se expresa en el tracto gastrointestinal, hígado, riñón, cerebro, corazón y células de la línea hematopoyética, entre otros.⁶⁵ La localización tisular de Pgp sugiere que la proteína desempeña un papel fisiológico en la protección de los órganos sensibles como el cerebro, testículos y el oído interno de xenobióticos tóxicos, la secreción de metabolitos y xenobióticos en la bilis, orina, y la luz del tracto gastrointestinal; y posiblemente el transporte de hormonas de la glándula suprarrenal y el epitelio uterino.¹⁰ Sus sustratos endógenos son citoquinas como IL-2 e IL-4 y glucocorticoides como el cortisol y aldosterona; mientras que dentro de los exógenos se han identificado gran cantidad de fármacos de uso habitual en la clínica médica,

como antineoplásicos, glucósidos cardíacos, antibióticos, inmunosupresores, antirretrovirales, antiepilépticos, corticoides, etc.⁶⁵

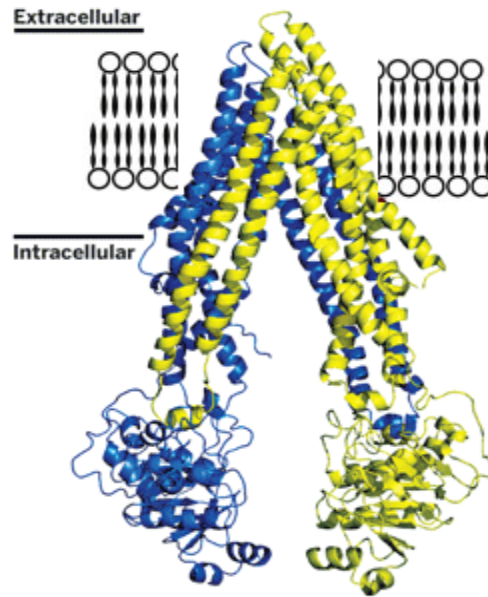


Figura 2. Estructura de la P-gp. Tomado de Everts, S, 2009.⁽¹⁸⁾

Algunos homólogos de P-gp como el producto del gen *mdr2* en mamíferos y la proteína STE6 en levaduras no comparten esta propiedad.⁴⁶

La sobreexpresión de P-gp en células cancerosas causa multiresistencia a medicamentos que da como resultado el fracaso de la quimioterapia.²⁴

Además del descubrimiento de la multiresistencia causada por P-gp a medicamentos usados comúnmente contra el cáncer, lo controversial fue la interacción de P-gp con un gran número de diversos compuestos oponiéndose a la famosa hipótesis de la llave y cerradura en la cual se explica que la unión de proteínas a sustratos es muy específica.⁸²

Algunos estudios han tratado de resolver esta incógnita investigando el número de sitios que puedan existir en la proteína, su proximidad y locación, así como la variedad de sustratos que pueden interactuar con esta proteína y sus moduladores.³⁹

Uno de estos estudios menciona que un alto número de sustratos y moduladores conocidos interactúan con P-gp sugiriendo la presencia de más de un sitio de unión. La presencia de más de cuatro interacciones de distintos sustratos con los sitios de unión de P-gp fueron detectados creando el siguiente diagrama:

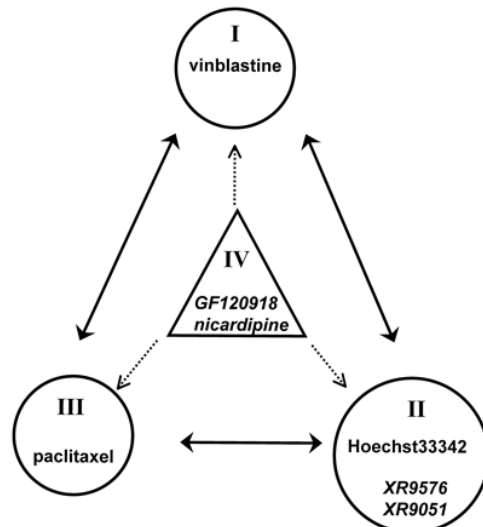


Figura 3. Clasificación de los cuatro sitios de unión del fármaco en la P-gp.

Tomado de Martin, C et al., 2000.⁽³⁹⁾

Basándose en interacciones encontradas, los ligandos se pueden clasificar en cuatro sitios de unión en la P-gp. Sin embargo pueden existir más sitios de unión de fármacos en la proteína. Los compuestos que se encuentran en cursiva son moduladores. Las flechas indican la comunicación entre los cuatro sitios.³⁹

Estos sitios se dividen en dos categorías: transporte, en el que la translocación de fármaco puede ocurrir a través de la membrana, y sitios reguladores, que modifican la función de la P-gp. Sin embargo, algunos moduladores interactúan con la P-gp en el sitio de transporte en lugar del sitio regulador. Así mismo estudios farmacológicos han demostrado que los moduladores son capaces de cambiar la afinidad de ambos sitios. Los múltiples sitios en la P-gp muestra las complejas interacciones alostéricas de la proteína.³⁹

1.5 Bombas de Expulsión y Resistencia a los Antibióticos

La presencia de bombas de expulsión localizadas en la superficie de las células es una característica clave en el fenotipo de resistencia que se encuentra ampliamente en las células y microorganismos.⁷

La expulsión de antibióticos fue descrita por primera vez en 1980 cuando fue descubierta como mecanismo de resistencia a la tetraciclina en bacterias Gram-negativas.⁴⁷ A través de los años, el papel que juegan los mecanismos de expulsión en la resistencia en bacterias han sido demostrados en casi todos los antibióticos.³⁵

Este mecanismo es mediado por bombas de expulsión que son proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana citoplasmática de la células capaces de transportar una o varias clases de estructuras de distintos componentes, usando un gradiente de iones o ATP como energía.⁴⁷ Expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de componentes tóxicos, entre ellos, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos.⁸³ Estas proteínas son llamadas en inglés multidrug-resistant efflux pumps (MDR).⁵⁴ Las fluoroquinolonas y los componentes orgánicos monocatiónicos como acriflavina y bromuro de etidio son algunos de los sustratos de estas bombas.³⁰

El principal papel de este mecanismo es mantener bajas o nulas⁸³ concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula.²⁴

El análisis de cepas de *S. aureus* que son resistentes a múltiples bactericidas y que fueron adquiridas en hospitales contenían plásmidos que codificaban para QacA, bomba de expulsión que pertenece a una de las cuatro familias de transportadores secundarios, llamada MFS (major

facilitator superfamily, por sus siglas en inglés), la primera bomba de expulsión identificada en bacterias.⁵⁶

1.5.1 Mecanismos de las Bombas de Expulsión

La clave para la comprensión de cómo funcionan estas bombas implica la determinación de sus estructuras representativas y el esclarecimiento de los cambios conformacionales que acompañan a la translocación de sus sustratos.³

El proceso de las bombas de expulsión es en un principio, muy simple. En general se requiere la unión del sustrato, el suministro de energía, la translocación de sustrato a través de la membrana y la reposición del transportador.⁷

Existen tres mecanismos de transporte utilizados por las bombas de expulsión:

- Antiporte mediado por protones. En procariontes la expulsión de fármacos y otros compuestos citotóxicos es en gran parte conferida por las bombas de expulsión, en el que el proceso está acoplado a la entrada de un protón (H^+). Dentro de este transporte se encuentran varias familias: MF (major facilitator), SMR (small multidrug resistance), RDN (resistance/nodulation/cell división) y DME (drug/metabolite efflux)²⁶; esta última familia se ha estudiado hace poco por lo que aun no se tiene la suficiente información sobre ella, pero se ha demostrado que posee una cierta semejanza a la familia de SMR.²⁸

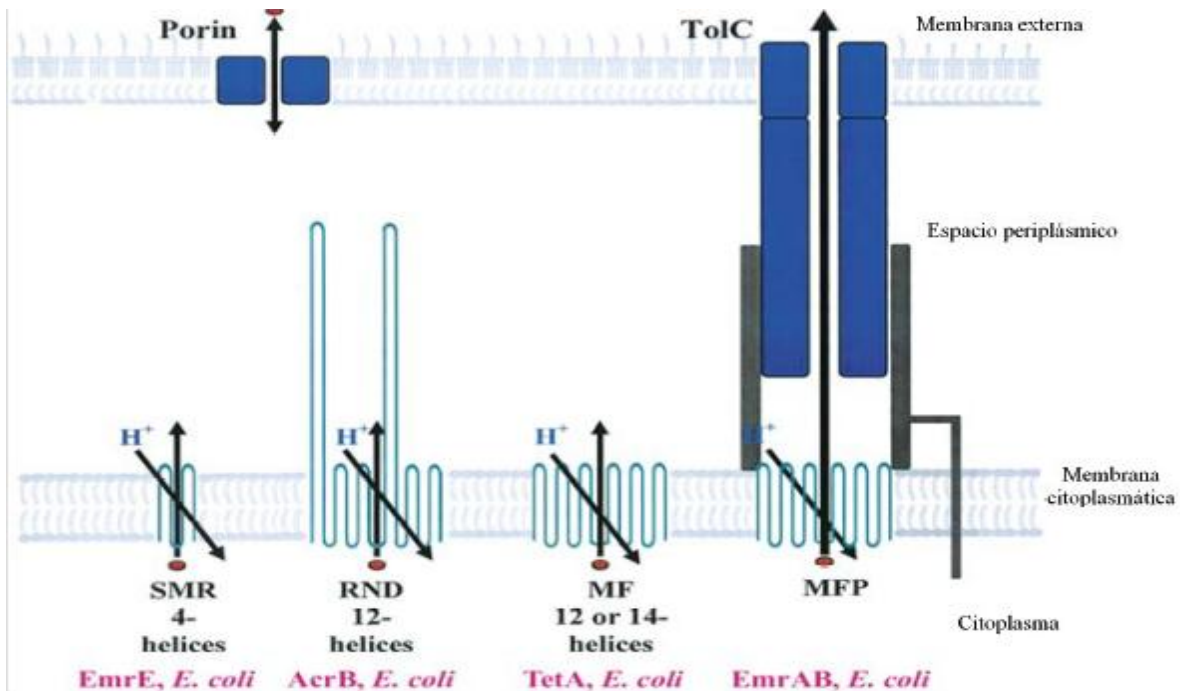


Figura 4. Representación esquemática de la topología de las bombas de expulsión impulsadas por protones en la membrana de bacterias Gram-negativas. Tomado de Borges-Walmsley, M., McKeegan, K., & Walmsley, A, 2003⁽³⁾

Las hélices de las bombas se muestran en verde. Las tres clases de antiporters se muestran: SMR 4-hélices, RND, MF 12 - y 14-hélices. Estos transportadores se muestran utilizando la fuerza protón-motriz generada por la respiración para expulsar antibióticos y otros sustratos en el espacio periplásmico, entre las membranas interior y exterior. Los transportadores de MF y RND pueden actuar en conjunto con una MFP y una OMP, como TolC, que traslada fármacos a través de las membranas internas y externas, expulsándolos de la célula. TolC actúa como un canal que no sólo se extiende por la membrana externa, sino que posiblemente también abarca el periplasma. El papel exacto de la MFP sigue siendo desconocido, pero puede actuar como una proteína para la translocación de las drogas entre el transportador de membrana interna y el canal helicoidal de TolC.³

- Antiporte mediado por Na^+ . En este mecanismo se encuentra un grupo de proteínas de transporte que se han descrito recientemente, llamadas MATE (multidrug and toxic compound extrusion, por sus siglas en inglés). Este grupo de proteínas se acopla al flujo de salida de Na^+ .⁴²

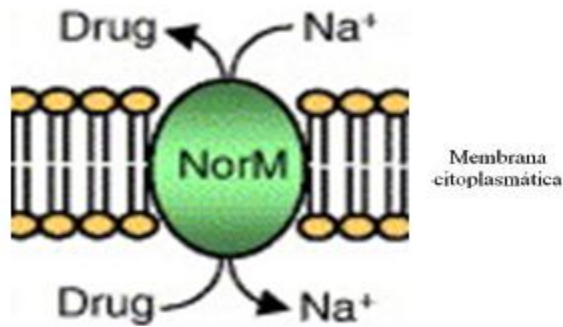


Figura 5. Representación esquemática de la topología de las bombas de expulsión impulsadas por Na^+ . Tomado de Kumar, A. and Schweizer, H⁽³²⁾

- Transporte mediado por ATP. Este grupo de transportadores que están presentes en células procariotas y eucariotas, son los transportadores ABC. Esta superfamilia de proteínas cataliza el flujo de fármacos mediante la utilización de la energía liberada en la hidrólisis de ATP.³

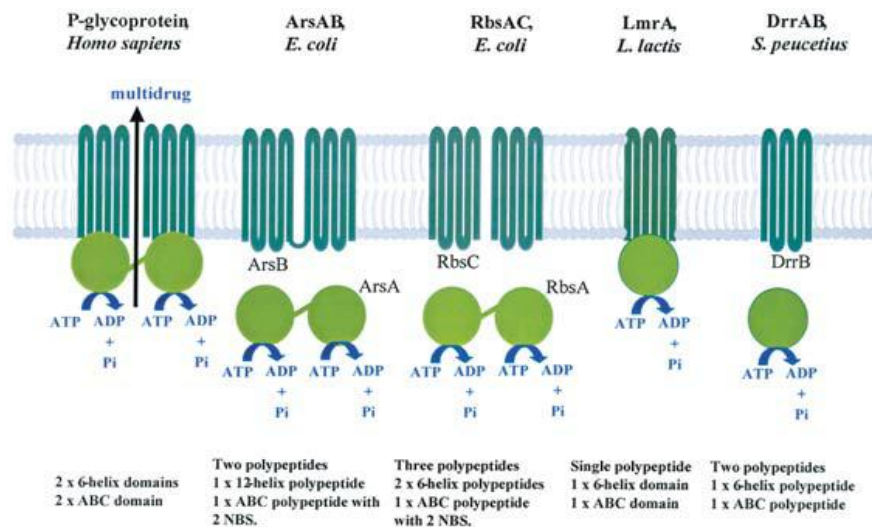


Figura 6. Representación esquemática de la topología de los transportadores que pertenecen a la superfamilia ABC en la membrana bacteriana. Tomado de Borges-Walmsley M, McKeegan K, and Walmsley A, 2003.⁽³⁾

1.5.2 Tipos de Bombas de Expulsión

Filogenéticamente, las bombas de expulsión pertenecen a cinco superfamilias que se pueden clasificar en dos tipos de mecanismos distintos: transportadores primarios que utilizan la hidrólisis de ATP y transportadores secundarios energizados por gradientes electroquímicos ya sea de protones o iones de sodio.⁸³

- Transportadores Primarios. También son llamados transportadores ABC los cuales utilizan la hidrólisis de ATP como sustrato energético y se encuentran en procariontes y eucariontes. Todos los transportadores ABC tienen dos dominios de unión de nucleótidos y dos dominios transmembranales.⁴⁵

Miembros de esta familia de transportadores incluyen a la P-gp que se encuentra en mamíferos y es muy similar a LmrA de *Lactococcus lactis*⁸³ y a MRP (multidrug resistance protein, por sus siglas en inglés).³⁴

P-gp es codificada por el gen *mdr1*. La sobreexpresión de este transportador es una de las principales causas de resistencia a los fármacos dirigidos contra el cáncer.⁷⁸

LmRA es un mediador de la resistencia a los antibióticos, mediante la expulsión de compuestos anfifílicos de la pared interna de la membrana citoplasmática.⁷⁵ Estudios experimentales han expresado LmrA en células fibroblásticas de los pulmones de humanos.⁷⁸

Las células fibroblásticas del pulmón que expresan la proteína LmRA tipo silvestre muestran una resistencia 10-60 veces mayor a una variedad de productos naturales y fármacos quimioterapéuticos sintéticos que son sustratos típicos de P-gp¹⁷: antraciclinas como

daunomicina y doxorubicina; alcaloides de la vinca tales como vinblastina que es un antineoplásico; y agentes tóxicos como bromuro de etidio y colchicina. Las características farmacológicas de LmrA y P-gp expresadas en células fibroblásticas del pulmón son muy similares, y las afinidades de ambas proteínas para vinblastina y magnesio-ATP son indistinguibles; demostrando que LmrA bacterial y P-gp de humano son funcionalmente intercambiables y que este tipo de MDR son conservados en bacterias y en el hombre.⁷⁸

Otros transportadores relacionados se encuentran en un gran número de hongos patógenos, helmintos y protozoarios, donde confieren resistencia a fármacos antimicrobianos. Por ejemplo, P-gpA, un homólogo de MRP, es una bomba de arsénico/antimonio que es responsable de la resistencia al medicamento antimonial estibogluconato sódico conocido como Pentostam en *Leishmania*.³³

MacB es otro más de este tipo de transportadores, el cual se encuentra en *E. coli* y le confiere la resistencia a macrólidos.

- Transportadores Secundarios. Utilizan un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. Estos transportadores están clasificados de la siguiente manera.
 - MF. Los transportadores MF son una superfamilia que comprende un gran número de subfamilias.³ Típicamente se compone de aproximadamente 400 aminoácidos organizados en 12 hélices con dominios periplásmicos entre la hélice 6 y 7.⁶³

Estos transportadores han sido clasificados dentro de dos subfamilias: 12-hélice y 14-hélice; por ejemplo, TetA(B) y TetA(K).

La clase B y clase K son transportadores de tetraciclina de *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.³

Se creía originalmente que estos transportadores funcionaban principalmente en la absorción de azúcares. Estudios posteriores revelaron que los sistemas de expulsión de metabolitos del ciclo de Krebs pertenecen a esta familia.⁵³

Los compuestos que son transportados por MF incluyen azúcares simples, oligosacáridos, inositoles, fármacos, aminoácidos, nucleósidos, ésteres organofosforados, metabolitos del ciclo de Krebs.⁸⁰ Así también expulsan activamente compuestos monocationicos, otros agentes como bromuro de etidio y reconocen uno o un limitado número de clases de antibióticos.⁴⁷

Algunos ejemplos de estos transportadores son EmrB de *E. coli* el cual confiere resistencia a inhibidores como el CCCP (cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona) y antibióticos como el ácido nalidíxico; NorA de *S. aureus* confiere resistencia a fluoroquinolonas, colorantes catiónicos e inhibidores catiónicos incluida la puromicina; LmrP de *Lactococcus lactis* el cual expulsa compuestos como colorantes catiónicos, tetraciclinas y macrólidos.^{47, 83}

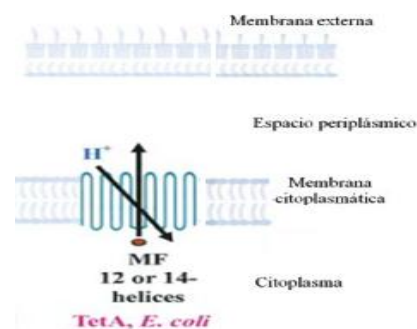


Figura 7. Representación esquemática de la topología de los transportadores MF. Tomado de Borges-Walmsley, M., McKeegan, K., & Walmsley, A, 2003⁽³⁾

- SMR. Son las más pequeñas de las bombas de expulsión.⁸³ Se compone normalmente de alrededor de 100 aminoácidos en cuatro hélices.⁵⁵ Primero fueron descubiertas codificadas en algunos plásmidos presentes en *S. aureus*, después se encontró que son codificadas en cromosomas de bacterias Gram-negativas. Expulsan componentes como biocidas de aminas cuaternarias o etidio. Un ejemplo de este tipo de transportadores es el EmrE de *E. coli*⁴⁷, un transportador que contribuye a la resistencia a EtBr.⁸⁰

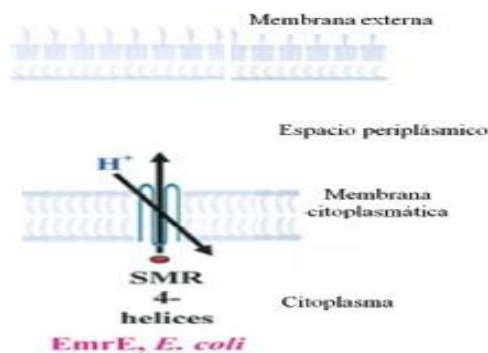


Figura 8. Representación esquemática de la topología de los transportadores SMR. Tomado de Borges-Walmsley, M., McKeegan, K., & Walmsley, A, 2003⁽³⁾

- RND. Son transportadores, es decir, bombas de expulsión mucho mayores que los transportadores MF; se componen normalmente de aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos y adoptan una estructura helicoidal similar de 12 hélices.⁷² Sin embargo, a diferencia de los transportadores MF, poseen grandes dominios periplásmicos o extracitoplásmicos entre las hélices 1 y 2 y entre las hélices 7 y 8.³

Estos transportadores están implicados en mecanismos generales de detoxificación y señalización intercelular. Por ejemplo, el sistema AcrAB de *E. coli* que expulsa sales biliares y los sistemas MexAB-OprM y MexEF-OprN de *P. aeruginosa* que

son capaces de expulsar el autoinductor del sistema de señalización de *quórum sensing* 3-oxo-C₁₂-homoserin lactona.⁶⁴

Muestran un gran espectro de sustratos lipofílicos y anfifílicos.⁸³ Esta súper familia de bombas de expulsión juega un importante papel en la producción de multiresistencia en bacterias Gram-negativas; esto es porque estas bombas están compuestas por un sistema complejo de proteínas de transporte. Generalmente, este sistema de transporte consta de un transportador IMP (integral membrane protein, por sus siglas en inglés), una MFP (membrane fusión protein) que es una proteína del periplasma como AcrA de *E. coli* y MexA de *P. aeruginosa*, y una OMF (outer membrane factor) que es un canal de membrana externa ejemplificado por TolC de *E. coli*.^{47, 59} Esta asociación permite la exportación directa de compuestos al medio externo en lugar del espacio periplásmico.⁴⁷

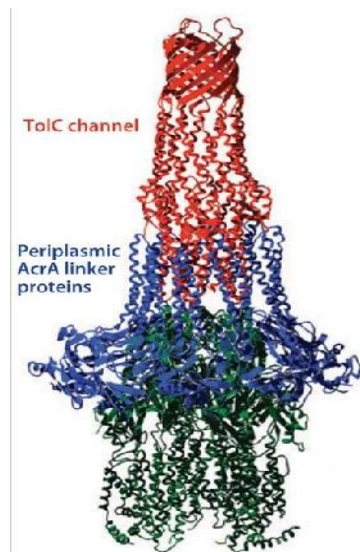


Figura 9. Modelo de bomba de expulsión RND. Tomado de Nikaido, H 2009⁽⁴⁷⁾

Complejo que exporta fármacos directamente al medio externo. El dominio transmembranal de la bomba AcrB (verde) se encuentra incrustado en la membrana citoplasmática, mientras que su dominio periplásmico está conectado al canal TolC a través de AcrA.⁴⁷

MATE. A diferencia de las demás que utilizan protones, esta bomba utiliza el transporte de Na^+ como sustrato energético.⁸³ Los transportadores MATE son similares en tamaño a los MF, y se componen típicamente de aproximadamente 450 aminoácidos dispuestos en 12 hélices. Sin embargo, no tienen ninguna similitud de secuencia con los miembros de la superfamilia de MF.²⁸

Esta familia fue identificada recientemente con la caracterización de NorM en 1998, una bomba acoplada al transporte de Na^+ de *Vibrio parahaemolyticus*, la cual expulsa fluoroquinolonas y bromuro de etidio⁴³; una bomba similar fue encontrada en *Bacteroides fragilis*.

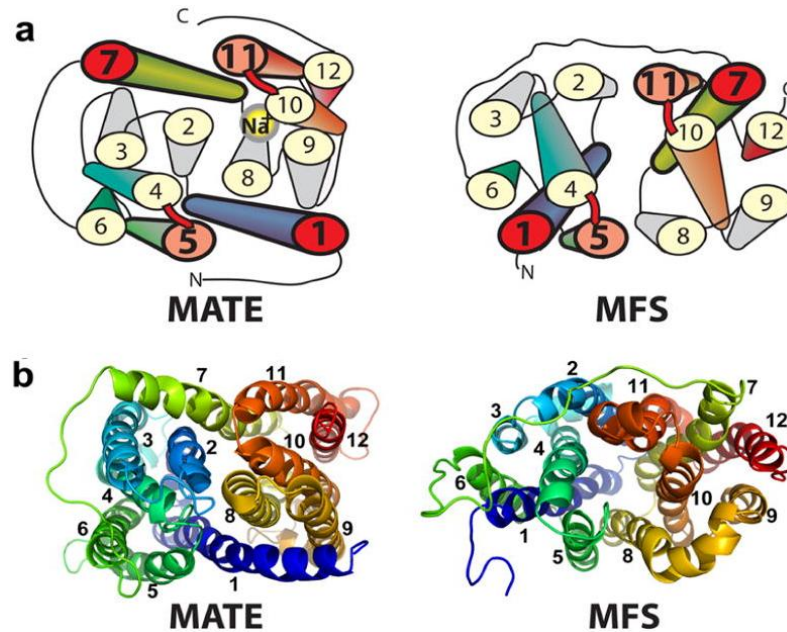


Figura 10. Comparación del modelo de bomba de expulsión MATE contra MFS. Tomado de He et al., 2010 ⁽²⁶⁾

(a) Comparación Topológica entre transportadores MATE y MFS desde el lado citoplásmico. En transportadores MATE; TM1 está entre TMs 5 y 8, y TM7 está entre TMs 3 y 11. En contraste, el MFS tiene TM1 entre TMs 4, 5 y 6; del mismo modo, TM7 está entre TMs 10, 11 y 12. (b) Estructura tridimensional de NorM y MFS.²⁶

1.5.3 Sustratos de Bombas de Expulsión

Transportador	Organismo	Sustratos/Ligandos moduladores
SMR		
Smr/OaC	<i>S. aureus</i>	EtBr, CV, QA, MV, TPP+
EmrE	<i>E. coli</i>	EtBr, AC, MV, TPP+
AbrAB	<i>B. subtilis</i>	EtBr, AC, PY, SO, TPP+
YkkCD	<i>B. subtilis</i>	EtBr, PF, CV, PY, MV, CPC, CP, SM, TC, PM, TPP+
Tbsmr	<i>M. tuberculosis</i>	AC, EtBr, MV
Pasmr	<i>P. aeruginosa</i>	AC, EtBr, MV
QacE	Bacterias Gram-negativas	EtBr, QA, SU
QacE Δ 1	Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas	Cip, EtBr, GM, QA, SU, TC
MF		
TetA	<i>E. coli</i>	TC
EmrB	<i>E. coli</i>	CCCP, NA, TL, CHH
EmrD	<i>E. coli</i>	CCCP
MdfA/Cmr/Cm	<i>E. coli</i>	EtBr, PM, TC, Ery, neomycin, Nor, CP, ITG, TPP+, R6G, DAR, DXR, QA, RP, TC, PM.
FarB	<i>N. gonorrhoeae</i>	Fatty acids
NorA	<i>B. fragilis</i>	Ery, Nor, PM
VceB	<i>V. cholerae</i>	CCCP, NA, Cip, Ery, PhMA, DOC
TetK	<i>S. aureus</i>	TC
NorA	<i>S. aureus</i>	EtBr, AC, QA, FQ, R6G, TPP+, PM, CP
QacA	<i>S. aureus</i>	EtBr, QA, CH, PI
Brm	<i>B. subtilis</i>	EtBr, AC, QA, FQ, R6G, TPP+, PM, CP
LmrP	<i>L. lactis</i>	EtBr, DM, H33342, TPP+/VP, nicardipin, quinne, TX100
MdrL	<i>L. monocytogenes</i>	EtBr, Ery, cefolaxime
Tap	<i>M. tuberculosis</i>	TC
Mrr	<i>M. tuberculosis</i>	EtBr, AC, ErY, TPP+, SO, PY
Tap	<i>M. fortuitum</i>	TC, gentamicin, 2-N' - y 2-n'ethylnetilmicin , SM
LfrA	<i>M. smegmalis</i>	EtBr, CV, QA, FQ
CaMDR1	<i>C. albicans</i>	FZ, NQO, benomyl, methotrexate
RDN		
AcrB	<i>E. coli</i>	EtBr, AC, CV, SDS, TX100, sales biliares, β - lactamas, Nov, Ery, Fus, TC, CP, MMC, FQ, NA, solventes organicos, NBD-PC
AcrB	<i>H. influenzae</i>	EtBr, CV, Ery, RP, Nov
MexB	<i>P. aeruginosa</i>	AZ, Cip, CV, RP, TX100
SmeE	<i>S. maltophilia</i>	EtBr, Ery, TC
AcrB	<i>S. typhimurium</i>	AC, DOC, Cip, Ery, Fus, NA
ArpB	<i>P. putida</i>	Nor, Nov, RP, SDS, TC
MtrD	<i>N. gonorrhoeae</i>	Cip, Ery, Nov, TC, TX100, β - lactamas, azitromicin, peptidos antimicrobianos, espermicidas.

Transportador	Organismo	Sustratos/Ligandos moduladores
MATE		
BexA	<i>B. thetalotamicron</i>	AC, EtBr, MV
NorM	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP, EtBr, Nor
YdhE	<i>E. coli</i>	AC, Cip, KM, Nor, SM, TPP+
VcmA	<i>V. cholerae</i>	Nor, Cip, DAR, DXR, SM, KM, EtBr, H33342
YdhE	<i>B. fragilis</i>	Nor, Cip, EtBr
NorM	<i>N. gonorrhoeae</i>	AC, EtBr, berberina, Cip, Nor
NorM	<i>N. meningitidis</i>	AC, EtBr, berberina, Cip, Nor
ABC		
		DAR, DXR, R6G, R123G, H33342, NBD-PE, NBD-PC, PM, VC, VB, CC, taxol, dexametasona, esteroides, VP, nicardipina, IS, CA
P-gp	<i>H. sapiens</i>	
MRP	<i>H. sapiens</i>	Similar a P.gp.
		R6G, R123G, RB, FZ, DAR, DXR, QM, CP, NBD-PE/VB, VX, CP, CC, taxol, esteroides
Pdr5	<i>S. cerevisiae</i>	
Cdr1	<i>C. albicans</i>	FZ, KZ, MZ, esteroides
Pfmdr1	<i>P. falciparum</i>	cloroquinona
		EtBr, R6G, R123G, DAR, DXR, VB, VC, DM, CC, TPP+, H33342, CA, IS
LmrA	<i>L. lactis</i>	
DnrAB	<i>S. peuceitius</i>	DXR, DAR
MacB	<i>E. coli</i>	AZ, CL, OL, Ery
YvcC	<i>B. subtilis</i>	homologos a P-gp
PGPA	<i>Leishmania spp.</i>	pentostam
Pst	<i>M. smegmatis</i>	FQ

Tabla 1 Bombas de Expulsión: Sus orígenes y sustratos. Tomado de Borges-Walmsley, M., McKeegan, K., and Walmsley, A. (2003).⁽³⁾

Abreviación de sustratos y ligandos: AC, Acriflavina; AZ, azitromicina; CC, colchicina; CCCP, cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona; CH, clorhexidina; CHH, clorhidrato de 2-clorofenilhidrazina; Cip, ciproflaxacin; CL, claritromicina; CP, cloranfenicol; CPC, cloruro de cetilpiridinio; CV, Cristal Violeta; DAR, daunorubicina; DM, daunomicina; DOC, desoxicolato; DXR, doxorubicina; Ery, eritromicina; FQ, fluoroquinolonas; Fus, ácido fusídico; FZ, fluconazol; GM, gentamicina; H33342, Hoechst 33342; IPTG, β isopropílico -D-tiogalactosidasa; IS, sulfona indolizina (por ejemplo, SR33557); KM, kanamicina; KZ, ketoconazol; LTC4, cisteinil leucotrienos; MMC, mitomicina; MV, metil viológeno; MZ, miconazol; NA, ácido nalidíxico; NBD-PC, 7 - nitrobenz-2-oxa-1, 3 - diazolfosfatidilcolina; NBD-PE, 1-miristoil-2-[6 (NBD) aminocaproil] fosfatidiletanolamina; Nor, norfloxacin; Nov, novobiocina; NQO, 4-nitroquinolina-N-óxido; OL, oleandomicina; OM, oligomicina; PF, proflavina;

PhMA, acetato de fenilmercurio; PI, pentamidina isotionato; PM, puromicina, PY, pironina Y; QA, compuestos de aminas cuaternarias (incluyendo cloruro de benzalconio y el bromuro de cetiltrimetilamonio); R123G, rodamina 123G; RB, rodamina B; RP, rifampicina; SO, safranina O; SM, estreptomicina; SP, espiramicina; SU, sulfonamidas; TC, tetraciclina; TL, tiolactomicin; TX100, Triton X-100; VB, vinblastina; VC, vincristina; VP, verapamilo.³

1.6 Sobreexpresión de Bombas de Expulsión

Se ha demostrado por medio de RT-PCR que *S. aureus* adquiere altos niveles de resistencia debido a la exposición frecuente y prolongada de sustratos de fluoroquinolonas y compuestos catiónicos, los cuales pueden incrementar la expresión de genes que codifican las bombas de expulsión, alterando la regulación proteica o seleccionando mutaciones.⁵⁴

Por ejemplo existen algunas instituciones hospitalarias y educativas donde compuestos catiónicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS) son utilizados como agentes de limpieza incrementando la expresión de las bombas de expulsión.⁵⁴

El SDS también conocido como laurilsulfato de sodio (SLS) es un tensoactivo iónico empleado en diversos productos de higiene personal como jabones de baño, shampoo, cosméticos, detergentes textiles y agentes de limpieza.⁴ Debido al extenso uso que tiene este agente, una gran parte de la población está expuesta a él de manera crónica y por lo tanto las bacterias que coexisten en este medio todos los días, también están provocando así el incremento de la expresión de bombas de expulsión.⁴¹

1.7 Detección de la Sobreexpresión de Bombas de Expulsión

Los transportadores de múltiples fármacos han sido tradicionalmente estudiados en células completas o como componentes de vesículas de membrana derivadas de las células alteradas. Estos sistemas sin duda son útiles, pero pueden surgir problemas debido a la presencia de otras proteínas o mediante la interferencia de los procesos celulares.

Con el fin de caracterizar completamente a las proteínas que funcionan como bombas de expulsión, tanto estructural como bioquímicamente, un número de métodos han sido desarrollados, los cuales permiten la purificación y reconstitución funcional de proteínas de membrana en los liposomas. Una serie de pasos pueden hacer que la reconstitución sea problemática. En primer lugar la proteína de la membrana tiene que ser correctamente sobreexpresada; en segundo lugar, la proteína tiene que ser extraída de la membrana, por lo general mediante el uso de un detergente adecuado o en algunos casos de disolventes orgánicos; y en tercer lugar, el complejo proteína purificada-detergente tiene que ser funcionalmente reconstituido en forma activa.⁶⁰

Algunos ensayos efectivos que se utilizan, pueden clasificarse como pruebas cualitativas y cuantitativas; dentro de las cualitativas se realiza un ensayo para encontrar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de bromuro de etidio con diferentes concentraciones de este mismo, compuesto que es sustrato de diferentes bombas de expulsión⁴⁰. Dentro de las cuantitativas se utilizan los ensayos fluorométricos o radiométricos donde puede observarse la sobreexpresión de las bombas de expulsión utilizando especialmente un espectrofluorómetro.⁵⁴

Uno de los sistemas de ensayo adecuado para las bombas de expulsión que permite medir la función del transportador, son las sondas

fluorescentes; herramientas que se utilizan a menudo en este tipo de estudios.⁴⁸

1.7.1 Concentración Mínima Inhibitoria

Se define la MIC (mínimum inhibitory concentration, por sus siglas en inglés) como la mínima concentración de un compuesto que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado.¹⁹

La determinación de la MIC puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial) y la MIC se expresa en $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁷¹

- Dilución en caldo. Consiste en exponer algún microorganismo de interés a diferentes concentraciones de un agente antimicrobiano en particular un medio líquido (caldo de cultivo).¹⁹

La concentración mínima inhibitoria de crecimiento es evaluada observando la turbidez del medio después de un determinado tiempo de incubación.⁴⁶

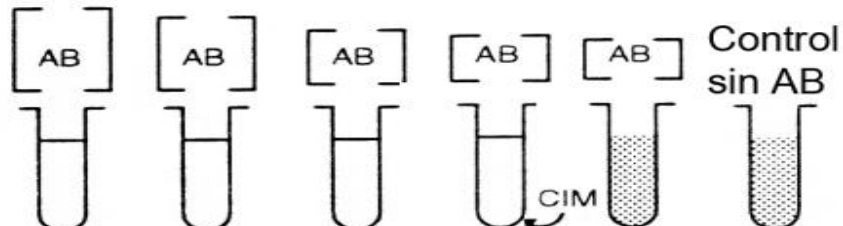


Figura 11. Determinación de la concentración mínima inhibitoria. Tomado de Ferraro, M. 2001⁽¹⁹⁾

- Dilución en agar. En este método el agente antimicrobiano es incorporado en cada placa de agar. Cada placa contiene una concentración diferente del agente antimicrobiano.⁷¹

- E-test. Utiliza tiras de plástico que contiene concentraciones crecientes del agente antimicrobiano y una escala numérica que indica las concentraciones. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la concentración inhibitoria mínima puede ser leída directamente.²¹

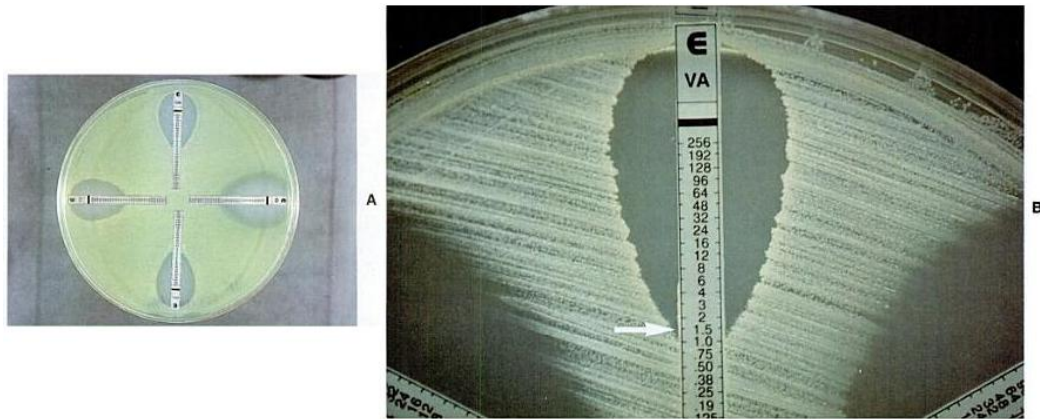


Figura 12. E-test. Tomado de Ferraro, M. 2001⁽²¹⁾

En el E-test se usa el principio de un gradiente antimicrobiano predefinido sobre una tira de plástico para generar un valor de MIC. Se procesa como la difusión con discos. A, se colocan las tiras con cada antimicrobiano sobre la superficie sembrada del agar. B, después de la incubación se lee la MIC en el punto en que el límite de crecimiento/inhibición corta la tira graduada.²¹

1.7.2 Método fluorométrico

El método fluorométrico capta la fluorescencia de diversos compuestos. La fluorescencia es un fenómeno electrónico de emisión molecular que se presenta inmediatamente después de aplicarle al analito un fotón como energía de excitación.⁵¹

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas que ocurre en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) que se denominan fluoróforos.⁷⁴ La siguiente figura ilustra el proceso mediante un diagrama de Jablonski muy simplificado.

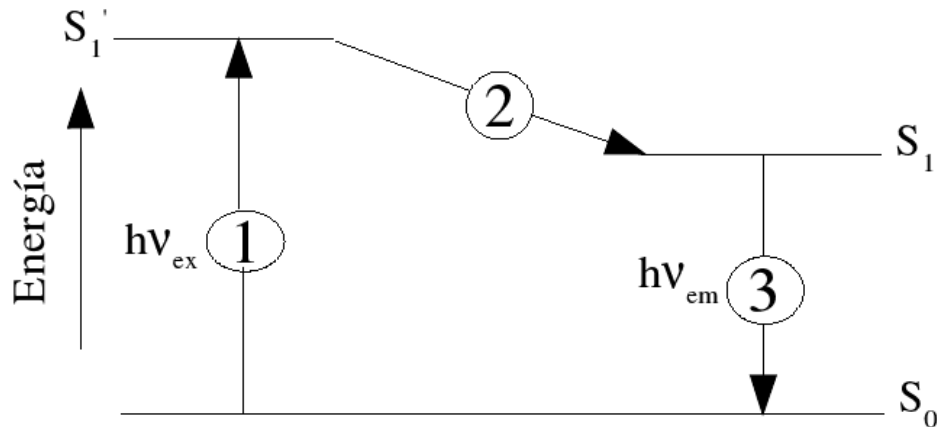


Figura 13. Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos involucrados en la creación de un estado electrónico excitado por absorción óptica y subsecuente emisión de fluorescencia. Los números corresponden a cada etapa del proceso. Tomado de Valeur, B. 2002.⁽⁷¹⁾

- Etapa 1. Excitación

Una fuente externa proporciona un fotón de energía $h\nu_{ex}$ que es absorbido por el fluoróforo, creando un estado electrónico excitado singlete (S_1'). Este proceso distingue a la fluorescencia de la quimioluminiscencia en la cual el estado excitado es creado por una reacción química.⁷¹

- Etapa 2. Tiempo de vida del estado excitado

El estado excitado existe durante un tiempo finito (típicamente 1 a 10×10^{-9} segundos). Durante este tiempo, el fluoróforo sufre cambios conformacionales y una multitud de posibles interacciones con su entorno molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes: en primer lugar, la energía de S_1' es parcialmente disipada, proporcionando un estado excitado singlete relajado (S_1) a partir del cual

se origina la emisión fluorescente. En segundo lugar, no todas las moléculas inicialmente excitadas por absorción (etapa 1) retornan al estado fundamental (S_0) mediante emisión de fluorescencia.⁷¹

- Etapa 3. Emisión

Un fotón de energía $h\nu_{em}$ es emitido, volviendo el fluoróforo a su estado fundamental S_0 . Debido a la disipación de energía durante la vida del estado excitado, la energía de este fotón es menor y de aquí, la longitud de onda de emisión es mayor que la de excitación. La diferencia de energía ($h\nu_{ex} - h\nu_{em}$) o de frecuencia ($\nu_{ex} - \nu_{em}$) es llamada de Stokes y es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia puesto que permite la detección de los fotones de emisión aislados de los fotones de excitación, contra un bajo nivel de ruido.⁷¹

Las técnicas analíticas basadas en fluorescencia son muy populares debido a su alta sensibilidad y selectividad, junto con las ventajas que ofrecen las nuevas y sofisticadas técnicas de resolución espacial (acopladas a sistemas avanzados de microscopía) y temporal (en el rango del femtosegundo), así como el uso de dispositivos tipo sensor, basados en fibra óptica.⁶⁶

Durante los últimos 15 años, la aplicación de técnicas basadas en el fenómeno de la fluorescencia ha conocido un enorme impulso debido sobre todo a su competencia exitosa, en el campo analítico clínico, con las técnicas que involucran sustancias radioactivas. Como ejemplos se pueden citar los inmunoensayos tipo ELISA o las técnicas de fluorescencia de polarización). Así, en este período, se han utilizado diversas técnicas de fluorescencia para: análisis clínicos, secuenciación de ADN, análisis genético (hibridación fluorescente *in-situ*), identificación celular por citometría de flujo, entre otros.⁶⁶

En el campo de la Química, las técnicas de fluorescencia suelen utilizarse para detección fluorométrica directa, en modo espectroscópico, en modo cromatográfico, o en dispositivos tipo sensor, o bien para detección indirecta.⁶⁶

1.7.2.1 Sustratos Fluorescentes

El fármaco antitumoral llamado doxorubicina, R6G y el EtBr son buenos ejemplos de compuestos que exhiben diferentes niveles de fluorescencia intracelular y extracelular, la cual se produce debido a su interacción con los componentes celulares. En el caso de R6G y doxorubicina, su fluorescencia disminuye en el medio intracelular, mientras que sucede lo contrario con el EtBr. Este fenómeno simple puede ser utilizado para monitorear directamente el flujo de salida de estos compuestos en las células tratadas.⁴⁸

El colorante Hoechst 33342, sustrato de un número de bombas asociadas a la multiresistencia a antibióticos, es otra sonda fluorescente que es útil particularmente en los estudios de transporte en la membrana.⁸¹ Hoechst es fuertemente fluorescente en el entorno de la membrana, pero tiene baja fluorescencia en soluciones acuosas. Esta capacidad se ha utilizado para caracterizar a un número de los transportadores MDR incluyendo P-gp, LmrA, LmrP, NorA, YyvC, MdfA y HorA.⁶⁷

1.7.2.2 Método fluorométrico utilizando EtBr

El método fluorométrico referido en este apartado utiliza el bromuro de etidio debido a que es un sustrato de las diferentes bombas de expulsión por lo que se ha demostrado ser una sonda adecuada para este método. El EtBr emite una fluorescencia débil en soluciones acuosas, en este caso fuera de la célula y se convierte en fuertemente fluorescente cuando su

concentración dentro del periplasma supera la de la solución acuosa debido a su unión a los componentes celulares, es decir, debido a que se intercala a ácidos nucleicos presentes en la célula como ADN y ARN.⁵² Los cambios en la intensidad de fluorescencia son debidos a los diferentes rendimientos cuánticos entre la forma libre de la sonda en disolución y la forma unida al analito.²⁵

Se ha propuesto que en un estado excitado, el catión de etidio dona un protón al solvente que aumenta significativamente su tasa de descomposición.⁵⁰ La intercalación en el ADN aísla el EtBr del disolvente y en consecuencia elimina el mecanismo de transferencia de protones, provocando un aumento de fluorescencia del EtBr.¹⁶

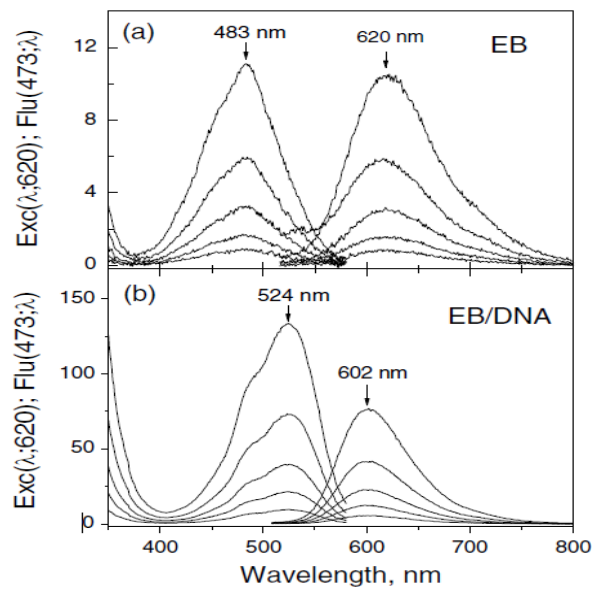


Figura 13. Espectro de fluorescencia y excitación del EtBr (EB en la figura) libre en solución (a) e intercalado en ADN (b). Tomado de Dragan, A et al., 2009.⁽¹⁶⁾

Este método puede distinguir la acumulación de EtBr en la célula, reflejando el equilibrio del flujo de entrada y salida de este⁷⁷, debido a la variación de la intensidad de fluorescencia descrita en los anteriores párrafos.

1.7.2.2.1 Bromuro de Etidio

El bromuro de etidio está constituido por cristales de color rojo oscuro, tiene una referencia CAS 1239-45-8 y su nombre sistemático es bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenentridinio o también llamado Bromuro de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridinio.⁷³ El EtBr funge como un fluoróforo catiónico aromático; es la sonda molecular fluorescente de más amplio uso en el campo de la Bioquímica para la detección de ADN, y se suele usar como revelador en la mayoría de las electroforesis.⁸

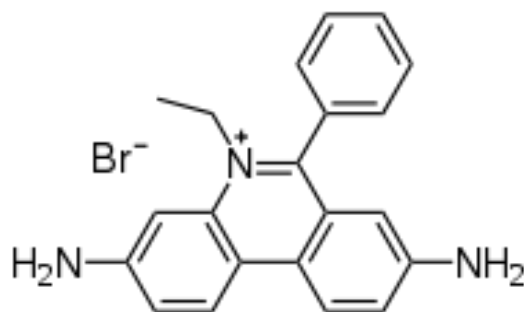


Figura 15. Estructura plana del bromuro de etidio. Tomado de Sigma-Aldrich, 2003-2004.⁽⁸⁾

Se usa para la detección de ácidos nucleicos, debido a que tras la unión a ADN el EtBr muestra cambios característicos en la absorbancia, mostrando un desplazamiento batocrómico e hipercrómico de su banda de absorción y propiedades de fluorescencia, demostrando una mejora en la intensidad de fluorescencia en aproximadamente un orden de magnitud, en comparación con el del EtBr libre en solución donde el rendimiento cuántico de la fluorescencia de EtBr es bajo.¹⁶

Debido a la intercalación del EtBr en el ADN, se ha comprobado que tiene un fuerte efecto carcinógeno y mutagénico. Es nocivo por ingestión, tóxico por inhalación e irritante para los ojos, la piel y las vías respiratorias.⁷³

1.7.3 Otros métodos

Comúnmente se utilizan técnicas de biología molecular que involucran la recombinación del DNA, un ejemplo de ellas es la RT-PCR (reverse transcription-PCR, por sus siglas en inglés).³⁷

La RT-PCR se ha usado como prueba cuantitativa para encontrar el incremento de la expresión de uno o más genes que codifican la clase MDR de bombas de expulsión presentes en la mitad de todas las cepas de *S. aureus*.¹⁵ Este ensayo requiere de instrumentación especial y es relativamente costoso en términos de instrumentación y suministros.²³

Estas técnicas tienen una alta especificidad, debido a la naturaleza de los componentes de la técnica.

1.8 Inhibidores de las Bombas de Expulsión

Se han desarrollado nuevas estrategias para contrarrestar la resistencia a los antibióticos. Algunas de ellas son la búsqueda de nuevos antibióticos, otras, la mejora del diseño molecular de antibióticos viejos para reducir su expulsión o bien, el uso de inhibidores de las bombas de expulsión.

Con respecto a la búsqueda de nuevos antibióticos tenemos como ejemplos algunas fluoroquinolonas como levofloxacin, moxifloxacin, gemifloxacin y garenoxacin; los cuales no son sustratos de las bombas de expulsión que causan la resistencia a múltiples fármacos, como la NorA y la PmrA en *S. aureus* y *S. pneumoniae*, respectivamente.²⁷

Por otro lado, la identificación y el desarrollo de inhibidores de las bombas de expulsión son un enfoque interesante para mejorar la eficacia clínica de los antibióticos. Estos agentes disminuyen la resistencia bacteriana

intrínseca a los antibióticos y reducen la frecuencia de aparición de cepas multi-resistentes.³⁸

La inhibición de las bombas de expulsión puede lograrse mediante diferentes mecanismos: (1) interferencia con pasos necesarios para la expresión de la bomba, (2) cambios en la estructura química de antibióticos por lo tanto, impidiendo su transporte, (3) interrupción del ensamble de los componentes de las bombas, (4) inhibición de la unión del sustrato (antibiótico) usando otros compuestos por unión competitiva o no competitiva, (5) bloqueo de poros exteriores responsables de la salida del antibiótico, (6) interferencia con la energía necesaria para la actividad de la bomba.²

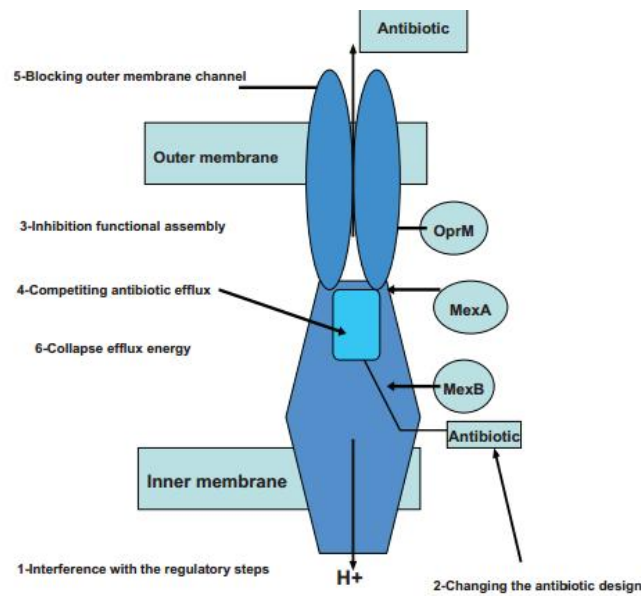


Figura 16. Mecanismos generales de inhibición de las bombas de expulsión utilizando la bomba MexAB-OprM como ejemplo. Tomado de Askoure, M. et al, 2011.⁽²⁾

La identificación de estos inhibidores comenzó con el estudio de algunos moduladores químicos que actúan sobre la P-gp, los cuales han sido usados para la quimio sensibilización de células en presencia de fármacos anti cancerígenos.³¹ Algunos de ellos son el verapamil y la reserpina, los

cuales fueron inicialmente documentados como inhibidor de transportadores de monoaminas y antagonista de los canales de calcio, respectivamente. Verapamil también actúa sobre los transportadores MDR, incluyendo NorA para *S. aureus* y otros como LmrP y LmrA. Reserpina bloquea el transportador Bmr en *Bacillus subtilis*.⁹

Estos moduladores químicos que actúan sobre la P-gp, pueden ser divididos en tres categorías: (a) sustratos con alta afinidad a la bomba, (b) inhibidores eficientes del transporte acoplado a la hidrólisis de ATP, (c) sustratos o inhibidores parciales. Igualmente, pueden ser clasificados en seis categorías de acuerdo a su estructura y función: (a) bloqueadores de canales de calcio o sodio, (b) agonistas de la calmodulina, (c) compuestos esteroides o flavonoides, (d) inhibidores de la proteína cinasa C, (e) alcaloides indólicos, (f) péptidos cíclicos, (g) quinolonas, (h) surfactantes y (i) anticuerpos.²² La mayoría de estos tienen en común muchas características como un alto nivel de hidrofobicidad, presencia de anillos aromáticos, etc.⁷⁹

Un inhibidor de la bomba de expulsión NorA de un *S. aureus* que se ha estudiado es el 5'-MHC (5'-metoxihidnocarpin, por sus siglas en inglés). Previamente, el inhibidor fue identificado como un componente menor del aceite chaulmoogra, una terapia tradicional para la lepra pero en realidad es un componente sintetizado a partir de la planta llamada berberina que se encuentra en varias plantas del género *Berberis*.⁵⁷



Figura 17. Plantas medicinales productoras de 5'-MHC inhibidor de bombas de expulsión. (Arriba) *B. fremontii*. (En medio) *B. repens*. (Abajo) *B. aquifolia*. Tomado de Stermitz, F., 2000.⁽⁵⁷⁾

5'-MHC es un ácido débil anfipático y es claramente diferente de los sustratos catiónicos de NorA. El componente se probó en células de *S. aureus* con bombas de expulsión MDR y la salida de bromuro de etidio fue completamente inhibida por 5'-MHC.⁶⁹

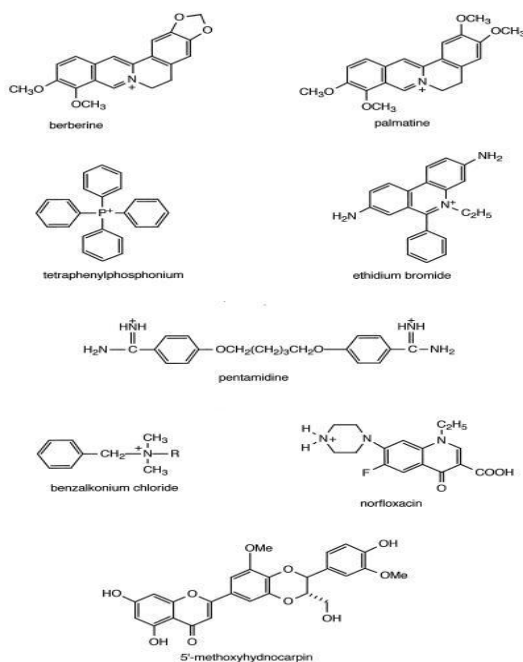


Figura 18. Formulas estructurales de sustratos e inhibidores de la bomba de expulsión NorA. Abajo 5'-MHC inhibidor de la MDR. Tomado de Stermitz, F., 2000.⁽⁶⁹⁾

El desarrollo de inhibidores de las bombas de expulsión es muy atractivo. Por ejemplo, un solo EPI (efflux pump inhibitor, por sus siglas en inglés) puede ser activo contra la bomba MDR y se puede utilizar como terapia adjunta.⁵⁸ Algunos EPIs estudiados han demostrado su eficacia pero las concentraciones necesarias para bloquear a las bombas son tóxicas; por ejemplo, las concentraciones que se necesitan del verapamil (inhibidor de bombas MDR) son neurotóxicas⁴; en caso del omeprazol, el cual se ha demostrado que actúa como EPI en NorA de bacterias Gram positivas, las dosis necesarias son muy altas.⁸ Es necesario realizar ensayos más eficaces para cuantificar los efectos de EPIs así como la definición de parámetros cinéticos y su relación con la estructura del componente que afecta a la bomba de expulsión para el desarrollo de nuevos EPIs.⁷⁶

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición continua de células bacterianas a compuestos catiónicos que son sustratos de bombas de expulsión puede inducir su sobreexpresión. Se busca estudiar la actividad de estas bombas de expulsión en cepas de *Escherichia coli* DH5 α tratadas anteriormente con SDS debido a que son un mecanismo de resistencia de las bacterias a los antibióticos. Por esta vía se puede tratar de buscar algunas alternativas contra este mecanismo de resistencia.

3. HIPOTESIS

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α tratadas anteriormente con SDS generan una mayor expulsión de agentes tóxicos como EtBr ocasionando resistencia cruzada a antibióticos.

4. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la actividad de bombas de expulsión generada por la adaptación a altas concentraciones de SDS de cepas de *Escherichia coli* DH5 α por medio de un método espectrofluorimétrico

4.1 Objetivos Particulares

- Determinar la concentración mínima inhibitoria del EtBr.
- Correlacionar la resistencia de la bacteria al EtBr con la adaptación de la bacteria a altas concentraciones de SDS.
- Estudiar la fluorescencia con respecto al tiempo del EtBr dentro de la célula.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas Bacterianas

- *Escherichia coli* DH5 α control
Cepa que no fue adaptada a concentraciones de SDS y que es sensible a todos los antibióticos.
- *Escherichia coli* DH5 α adaptada
Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* DH5 α adaptadas a su concentración máxima tolerada de 1.7 mg/mL del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), lo que podría producir resistencia cruzada a antibióticos. Estas cepas presentaron resistencia a 7 antibióticos: Cefotaxima, Ampicilina, Nitrofuratoina, Cloranfenicol, Ciprofloxacino, Netilmicina y Amikacina.

5.2 Reactivos

- Bromuro de Etidio
Se utilizó a una concentración de 5 mg/mL. Las soluciones de EtBr fueron preparadas con agua destilada y almacenadas a 4°C y protegidas de la luz, debido a que el EtBr es fotosensible.
- Medio Luria
Las cepas de *E. coli* se mantuvieron mediante resiembras periódicas en medio Luria.
El medio luria es un medio deshidratado utilizado para mantener y cultivar cepas de *E. coli*. Este medio provee de todos los requerimientos nutricionales necesarios para *E. coli*. La peptona provee de nitrógeno y carbono. Las vitaminas (incluida complejo B) y ciertos elementos trazas

son provistos por el extracto de levadura. Los iones sodio para el transporte y el balance osmótico son aportados por el cloruro de sodio.

Formula (g/L)

Triptona.....10 g

Extracto de Levadura.....5 g

Cloruro de sodio.....5 g

pH Final 7,0±0,2

5.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se trata de la dosis mínima con la que un fármaco o sustancia inhibe el crecimiento de un determinado microorganismo, y es indicativa de la eficacia que tiene la sustancia para inhibir el crecimiento.

- Se realizó la determinación de la MIC de EtBr de tres cepas problemas y la cepa control de *Escherichia coli* DH5 α mediante el método de dilución en caldo luria.
- A partir de una solución stock de 5 mg/mL se realizaron las siguientes diluciones de EtBr en 3 mL de medio Luria.

Tabla 2. Diluciones de bromuro de etidio

Diluciones ($\mu\text{g/mL}$)		
10	200	440
30	230	480
40	240	500
80	280	530
100	300	550
120	320	580
150	380	600
180	400	

- De cada una de las cepas sembradas en caldo luria junto con la cepa control se preparó una suspensión de aproximadamente 5×10^6 células/mL. La suspensión se preparó determinando por medio de un densitómetro con su respectiva curva de calibración, la cantidad de células por mililitro del medio luria en el que se encontraban para posteriormente calcular la cantidad de la cepa que se necesita agregar a cada dilución para tener la concentración de 5×10^6 células/mL. Cabe mencionar que se emplearon cultivos de 24 hrs.
- A cada dilución preparada de EtBr se le agregó la cantidad determinada de la cepa, incubando a 36.8°C por 24 hrs.

La concentración mínima inhibitoria de crecimiento fue evaluada observando la turbidez del medio después de 24 hrs de incubación.

Como prueba confirmatoria cada dilución se resembró en cajas Petri con agar chocolate y con agar Luria.

5.4 Fluorometría

Este método fue desarrollado usando la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , monitoreando la fluorescencia del EtBr en tiempo real por 30 minutos, usando un espectrofluorómetro Perkin-Elmer 203. El instrumento permitió la selección de longitudes de onda de excitación y emisión para EtBr de 540 nm y 545 nm respectivamente, en las cuales se podía visualizar las señales.

Se resembraron las tres cepas de *Escherichia coli* DH5 α así como la cepa control en 6 mL de medio Luria. Se preparó una solución de EtBr a una concentración de 5 mg/mL.

Se ajustaron las cepas a una OD_{660} de 0.4 en 3 mL del medio Luria, para después agregar a cada solución la cantidad de bromuro de etidio suficiente para tener la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos.

Después de la incubación se centrifugó a 10 000 rpm durante un minuto, se decantó y se resuspendió el pellet de células en 4 mL de medio Luria.

Por último, se procedió a medir la fluorescencia de cada cepa en el espectrofluorómetro. La fluorescencia fue obtenida por intervalos de 60 segundos durante 10 minutos; posteriormente cada 5 minutos hasta alcanzar el tiempo de 30 minutos.

Cabe mencionar que los ensayos se realizaron por tres veces teniendo reproducibilidad.

6. RESULTADOS

6.1 Concentración Mínima Inhibitoria

Tomando en cuenta a Patel, D et al. 2010, quienes mencionan que la exposición a compuestos catiónicos pueden incrementar la expresión de genes que codifican para las bombas de expulsión, se seleccionaron tres cepas diferentes de *Escherichia coli* DH5 α multiresistentes a antibióticos, las cuales previamente fueron tratadas y adaptadas con un compuesto catiónico llamado dodecilsulfato de sodio.

Dentro del estudio, las tres cepas de *E. coli* DH5 α denominadas α , β y γ junto con la cepa control de *E. coli* DH5 α no adaptada; se les sometió a concentraciones variables de bromuro de etidio de acuerdo a la tabla 2. Se observó una diferencia entre la MIC de la cepa control y la MIC de las cepas problemas, mostrando una resistencia a las concentraciones de este agente regularmente tóxico para la mayoría de las células.

Los resultados mostrados en la tabla 3, nos muestran la concentración mínima con la que el bromuro de etidio inhibe el crecimiento de *E. coli*; esta concentración fue evaluada observando la turbidez del medio después de 24 horas de incubación.

Tabla 3. Turbidez de cada tubo en diferentes concentraciones de EtBr

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Cepas					
	α	β	γ	Control		
400	+++	+++	+++	+++	+++	Mayor turbidez
440	+++	+++	+++	+++	++	Presencia de turbidez
480	+++	+++	+++	++	+	Poca turbidez
500	+++	+++	+++	++	-	Sin turbidez
520	++	++	++	+		
550	++	++	++	-		
580	+	+	+	-		
600	-	-	-	-		

La concentración mínima inhibitoria de bromuro de etidio para las tres cepas fue de 600 $\mu\text{g/mL}$ mientras que para la cepa control fue de 550 $\mu\text{g/mL}$. Como prueba confirmatoria cada dilución se resembró en cajas Petri con agar chocolate y con agar Luria.

6.2 Expulsión del bromuro de etidio

De acuerdo a las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en las cepas en estudio y a los estudios que nos dicen que el bromuro de etidio es un sustrato de las bombas de expulsión igual que el SDS; se procedió a monitorear la fluorescencia de EtBr a través del tiempo en cada cepa como se observa los datos en la tabla 4.

Tabla 4. Fluorescencia a través del tiempo de cada cepa

Tiempo (min)	Fluorescencia			
	Cepa control	Cepa α	Cepa β	Cepa γ
0	370 \pm 10,0	243 \pm 11,5	260 \pm 20,0	213 \pm 15,3
1	377 \pm 5,8	250 \pm 10,0	237 \pm 15,3	217 \pm 11,5
2	377 \pm 5,8	253 \pm 11,5	230 \pm 17,3	210 \pm 10,0
3	380 \pm 10,0	247 \pm 11,5	230 \pm 10,0	210 \pm 10,0
4	393 \pm 11,5	250 \pm 0,0	223 \pm 11,5	213 \pm 15,3
5	397 \pm 5,8	247 \pm 5,8	220 \pm 10,0	217 \pm 20,8
6	393 \pm 5,8	243 \pm 5,8	213 \pm 11,5	207 \pm 11,5
7	397 \pm 11,5	247 \pm 11,5	207 \pm 15,3	203 \pm 15, 3
8	397 \pm 5,8	233 \pm 15,3	207 \pm 5,8	207 \pm 11,5
9	397 \pm 5,8	233 \pm 10,0	203 \pm 5,8	197 \pm 11,5
10	397 \pm 5,8	230 \pm 5,8	203 \pm 15,3	200 \pm 17,3
15	397 \pm 5,8	227 \pm 5,8	203 \pm 5,8	190 \pm 17,3
20	403 \pm 5,8	223 \pm 5,8	200 \pm 0,0	180 \pm 10,0
25	407 \pm 5,8	223 \pm 5,8	197 \pm 11,5	173 \pm 5,8
30	410 \pm 0,0	220 \pm 0,0	193 \pm 11,5	167 \pm 5,8

Los datos de la cepa control indican que el bromuro de etidio se fue acumulando dentro de la célula a través del tiempo (figura 19), esto lo sabemos porque de acuerdo a Paixao, L. et al. el bromuro de etidio emite una fluorescencia débil en soluciones acuosas, en este caso fuera de la célula y se

convierte en fuertemente fluorescente cuando su concentración dentro del periplasma supera la de la solución acuosa debido a su unión a los componentes celulares, es decir, debido a que se intercala a ácidos nucleicos presentes en la célula como ADN y ARN.

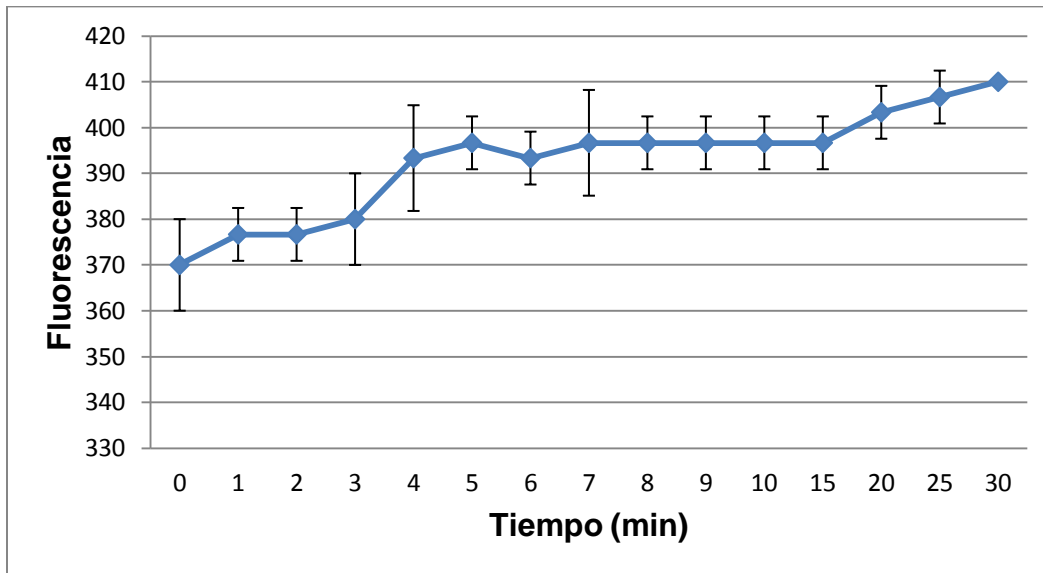


Figura 19. Acumulación de bromuro de etidio en cepa control de *Escherichia coli* DH5 α .

Con los datos de las cepas tratadas en estudio se observó que el bromuro de etidio se fue expulsando de las células a través del tiempo.

En la figura 20 se observa que en la cepa de *E. coli* α DH5 α , la fluorescencia aumentaba y disminuía a través de algunos minutos pero alrededor del minuto 9 se fue estabilizando mostrando una disminución constante hasta llegar a una disminución de alrededor de 20 unidades de fluorescencia.

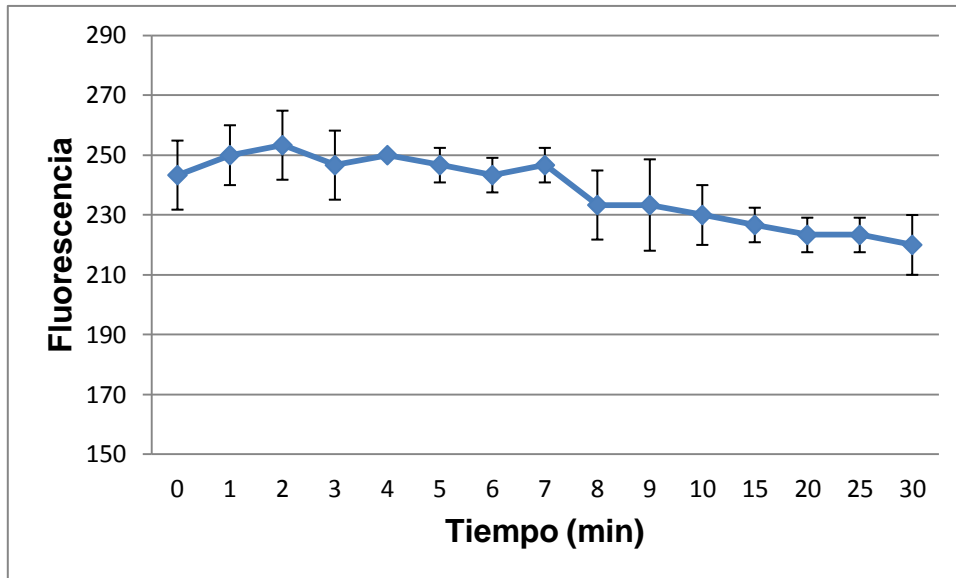


Figura 20. Expulsión de bromuro de etidio en cepa alfa de *Escherichia coli* DH5 α .

En la figura 21 se observa inmediatamente que la cepa de *E. coli* β DH5 α expulsó progresivamente el bromuro de etidio a través del tiempo, hasta llegar a la disminución de alrededor de 100 unidades de fluorescencia.

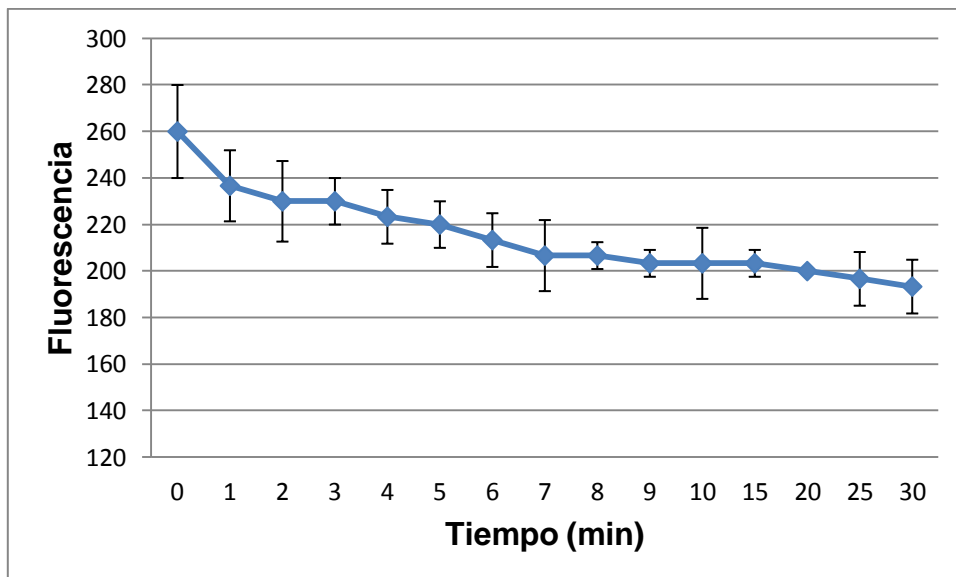


Figura 21. Expulsión de bromuro de etidio en cepa beta de *Escherichia coli* DH5 α .

La figura 22 muestra una menor expulsión del bromuro de etidio por la cepa de *E. coli* γ DH5 α , con una disminución de la fluorescencia de unas 50 unidades en 20 minutos.

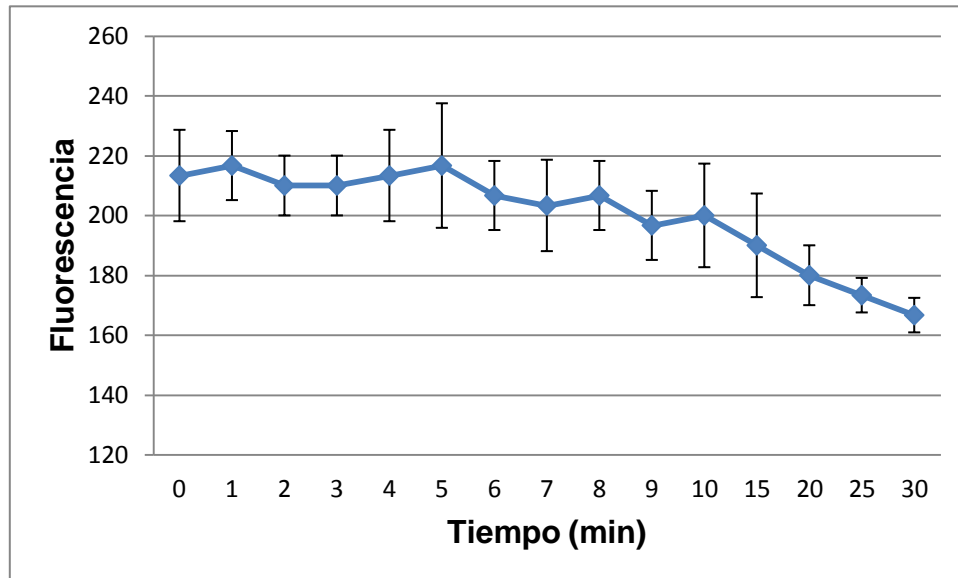


Figura 22. Expulsión de bromuro de etidio en cepa gama de *Escherichia coli* DH5 α .

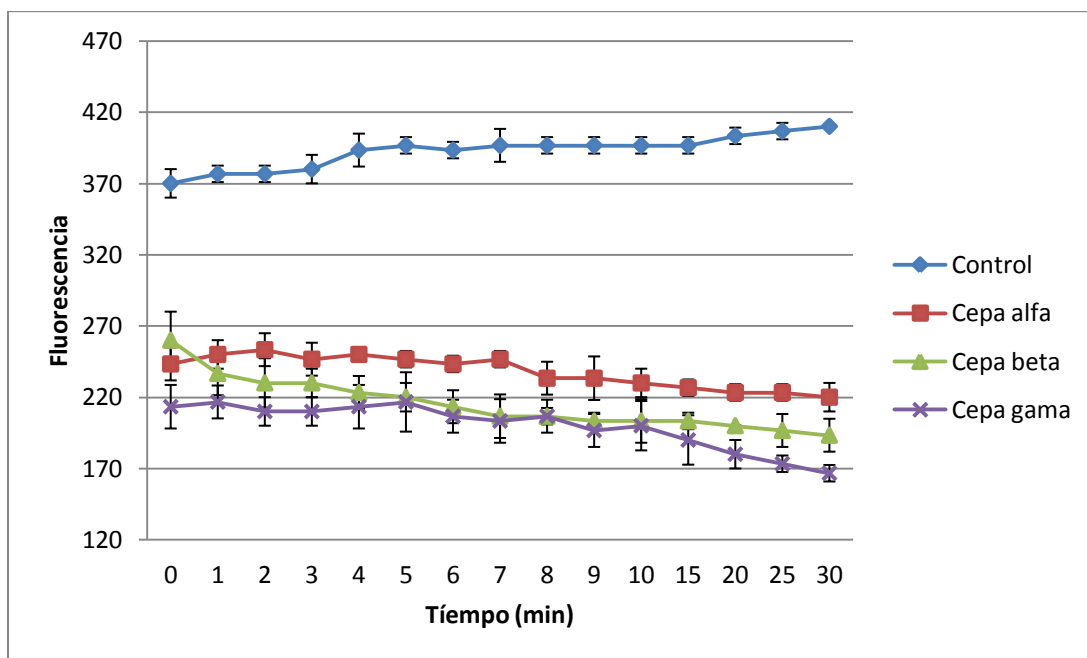


Figura 23. Resumen de la acumulación (control) y expulsión de bromuro de etidio en cepas de *Escherichia coli* DH5 α .

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la resistencia intrínseca debido a que las bombas de expulsión son proteínas que se encuentran naturalmente en las bacterias.

Suponemos que nuestras cepas problema cuentan con bombas de expulsión por ser parte de la naturaleza de las células y porque algunas bacterias al ser multiresistentes a diversos antibióticos hacen uso de estos transportadores llamados bombas de expulsión.

Las cepas de *E. coli* DH5 α utilizadas en el presente estudio fueron anteriormente adaptadas a una concentración de 1.7 mg/mL de dodecilsulfato de sodio que fue la concentración máxima tolerada; esto debido a que el SDS es un tensoactivo iónico empleado frecuentemente en diversos productos de limpieza e higiene personal. Estas cepas, al ser expuestas al SDS, adquirieron resistencia a 7 antibióticos: Cefotaxima, Ampicilina, Nitrofuratoína, Cloranfenicol, Ciprofloxacino, Netilmicina y Amikacina.

De acuerdo a Patel, D et al. 2010, han demostrado que *S. aureus* adquiere altos niveles de resistencia debido a la exposición frecuente y prolongada de sustratos como los compuestos catiónicos un ejemplo el SDS, los cuales pueden incrementar la expresión de genes que codifican las bombas de expulsión.

Iniciando el estudio de la MIC de bromuro de etidio necesaria para inhibir el crecimiento de nuestras cepas en estudio de *E. coli*, se realizaron a partir de un stock de 5 mg/mL diversas diluciones de bromuro de etidio en medio luria las cuales fueron de un rango de 10 μ g/mL a 600 μ g/mL con un inóculo de 5×10^6 células/mL.

La diferencia entre las MIC de EtBr obtenida en el estudio de las cepas problema con la cepa control no fue muy grande, con lo que podemos

inferir dos supuestos. El primero es que el bromuro de etidio por lo general presenta problemas de solubilidad. Por esta razón, aunque se siga añadiendo EtBr al medio y se encuentre una concentración mínima inhibitoria como es el caso, puede que no sea confiable debido a que no todo el EtBr del medio se encontraba soluble, pero cabe mencionar que la solubilidad reportada es de 40 g/L la cual nos hace inferir que en el trabajo experimental que el EtBr se encontraba soluble. Comparando con Patel, D et al, 2010 y anteriores estudios las concentraciones de EtBr utilizadas son correctas.

El segundo supuesto es que tomando como confiable la MIC encontrada tanto en las cepas problemas como la cepa control, podemos inferir que en las cepas tratadas con SDS se aumentó la resistencia al EtBr por las bombas de expulsión las cuales tienen como sustrato común el EtBr.

Al analizar los resultados obtenidos durante el ensayo de la MIC, se procedió a realizar un ensayo en el cual fuese sencillo observar la expulsión o acumulación de bromuro de etidio.

El bromuro de etidio es un buen ejemplo de compuestos que exhiben diferentes niveles de fluorescencia intracelular y extracelular. Tomando en cuenta esta propiedad del bromuro de etidio se decidió utilizar un ensayo fluorométrico.

Mediante el ensayo fluorométrico podemos observar la acumulación de EtBr en la célula, debido a que se refleja el equilibrio del flujo de entrada y salida de este.

Se observó de acuerdo a las gráficas obtenidas, que las cepas problema tratadas anteriormente con SDS y que tuvieron una MIC de bromuro de etidio de 600 $\mu\text{g/mL}$, mostraron una disminución de la fluorescencia a través del tiempo, indicando una expulsión del bromuro de etidio de la célula.

En el caso de la cepa control, la cual no fue pre-expuesta a SDS, se observó la acumulación del bromuro de etidio a través del tiempo. La célula durante el ensayo fue acumulando el EtBr del medio en el que se encontraba. Esto debido a que el bromuro de etidio ingresa a la célula y como no hubo una inducción de las bombas de expulsión, el bromuro de etidio que entraba era mayor del que era expulsado.

El presente estudio demuestra que la inducción de las bombas de expulsión favorece la multiresistencia a antibióticos y la capacidad de agentes tensoactivo que utilizamos diariamente, de generar mayor resistencia a antibióticos así como nos hace suponer la sobreexpresión de estas.

Tomando en cuenta este estudio, posteriormente se puede profundizar la investigación determinando las proteínas, así como buscar nuevos compuestos que puedan inhibir a las bombas de expulsión y atacar al fenómeno creciente de resistencia bacteriana.

8. CONCLUSIÓN

De acuerdo a la determinación de la concentración mínima inhibitoria de EtBr y los resultados obtenidos del monitoreo respecto al tiempo de la fluorescencia de EtBr dentro de la células obtenidas de las cepas de *Escherichia coli* DH5 α tratadas anteriormente con SDS, se observó que la adaptación a las altas concentraciones de este agente generaron un aumento en la resistencia de la bacteria hacia algunos antibióticos y hacia el EtBr así como un aumento en la expulsión de EtBr lo que nos hace suponer una sobreexpresión de bombas de expulsión.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alekshun, M and Levy, S. *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. Cell, USA 128:1037-1050, 2007.
2. Askoure, M. et al. *Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against*. Libyan J. Med. 6:5870-5878, 2011.
3. Borges-Walmsley, M., McKeegan, K., and Walmsley, A. *Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs*. Biochem. J. 376:313-38, 2003.
4. Brenwald, N., Gill, M., and Wise, R. *The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in vitro susceptibilities of fluorquinolone-resistant strains of Streptococcus pneumoniae to norfloxacin*. J Antimicrob Chemother, 40:458-460, 1997
5. Burke, A. *Antibiotic Resistance*. Medical Clinic of North America, 84(6):222-235, 2000.
6. Bustos-Martinez, J., Hamdan-Partida, A. and Gutiérrez-Cárdenas, M. *Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad*. Rev. Biomed.17:287-305, 2006.
7. Callaghan, R. *Multidrug efflux pumps: the big issue*. The FEBS Journal 1:277, 2010.
8. Catalogo Sigma-Aldrich de reactivos bioquímicos y orgánicos para investigación en biociencias, 2002-2003, pp 780.
9. Cohn, R. C. and Rudzienski, L. *Substituted amines synergistic with tobramycin against Burkholderia cepacia in vitro*. Chemotherapy, 43:100-107, 1997.
10. Cortada, C., Gil, A., et al. *Funcionalidad de la glicoproteína P linfocitaria en la colitis ulcerosa*. Medicina (Buenos aires) 69:437-441, 2009.
11. Cortés, J. *Resistencia en enterobacterias: evolución, enzimas y ambiente*. Infectio. 15(3):145-146, 2011.
12. Dantas G., Sommer MO., Oluwasegun RD., Church GM: *Bacteria subsisting on antibiotics*. Science 320:100-103, 2008.

13. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. *Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72:317-364, 2008.
14. De Lencastre H, Oliveira D and Tomasz A. *Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptative power*. Curr. Opin. Microbiol. 10:428-435, 2007.
15. DeMarco, C et al. *Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother, 51:3235-3239, 2007.
16. Dragan, A et al. *Metal-enhanced ethidium bromide emission: Application to dsDNA detection*. Chemical Physics Letter, 480:296-299, 2009.
17. Endicott, J. A and Ling, V. *The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance*. Annu. Rev. Biochem, 58:137-171, 1989.
18. Everts, S. *Researchers solve the structure of P-glycoprotein, which kicks molecules out of cells*. A Cell's Vacuum Cleaner. 87(3):10, 2009.
19. Ferraro, M. J. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards Eleventh Informational Supplement. 21:100-111, 2001
20. Ferry, DR and Kerr, DJ. *P-glycoprotein: a transporter with allosterically coupled drug-acceptor sites as a target for rational drug design*. In new molecular targets for cancer chemotherapy. 177-193, 1994.
21. Forbes, B., Sahm, D., and Weissfeld, A. *Bailey & Scott; diagnostic microbiology*. 12th edition, pp 190-201, 2009.
22. Ford, J. M. and Hait, W. N. *Pharmacologic circumvention of multidrug resistance*. Cytotechnology, 12:171-212, 1993.
23. Frempong-Manso, E. et al. *Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pumps genes in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Agents, 33:360-363, 2009.
24. Gottesman MM and Pastan, I. *Biochemistry of multidrug resistance by the multidrug transporter*. Annu Rev Biochem, 62:385-427, 1993.

25. Haugland, R. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th Edition, Molecular Probes, Eugene, Oregon, 503-584, 2001.
26. He, X et al. *Structure of a Cation-bound Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter*. *Nature*, 467(7318):991-994, 2010.
27. Hooper D.C. *Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones*. *Clin. Infect. Dis.*, 31(2):24-28, 2000.
28. Jack, D., Yang, N., and Saier, M. *The drug/metabolite transporter superfamily*. *Eur J. Biochem.*, 68:3620-3639, 2001.
29. Johnson & Son, Inc. (2011), *Sodium Lauryl Sulfate*. Obtenido el 27 de agosto 2012 del sitio web: <http://www.whatsinsidescjohnson.com/es-us/ingredients/S/sodium-lauryl-sulfate-1.aspx>
30. Kaatz, G et al. *Evidence for the existence of multidrug efflux transporter distinct from NorA in S. aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(5):1404-1406, 2000.
31. Krishna, R. and Mayer, L. D. *Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs*. *Eur. J. Pharmacol. Sci.*, 11:265-283, 2000.
32. Kumar, A. and Schweizer, H. *Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake*. *ELSEVIER*, 57(10):1486-1513, 2005.
33. Legare, D. et al. *The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase*. *J. Biol. Chem.* 276: 26301-26307, 2001.
34. Leslie, E., Deeley, R. and Cole, S. *Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1(ABCC1) and related transporters*. *Toxicology*, 167:3-23, 2001.
35. Li, H.Z. and Nikaido, H. *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. *Drugs.*, 64:159-204, 2004.
36. Livermore DM. *The need for new antibiotics*. *Clin. Microbiol. Infect.* 10(4):1-9, 2004.

37. Locher, K., Lee, A. and Rees, D. *The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism*. Science, 296:1091-1098, 2002.
38. Lomovskaya, O. and Bostian, KA. *Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic- a vision for applied use*. Biochem Pharmacol, 71:910-918, 2006.
39. Martin, C et al. *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein*. Molecular pharmacology, 58(3):624-632, 2000.
40. Martins, M., I. Couto, M. Viveiros, and L. Amaral. *Identification of efflux-mediated multi drug resistance in bacterial clinical isolates by two simple methods*. Methods Mol. Biol., 642:143-157, 2010.
41. Moore BM and Flurkey WH. *Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase*. The Journal of Biological Chemistry, 265:4982-4988, 1990.
42. Morita, C., et al. *VmrA a member of a novel class of Na⁽⁺⁾- coupled multidrug efflux pumps from Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol., 184:572-576, 2002.
43. Morita, Y. et al. *NorM a putative multidrug efflux protein of Vibrio parahaemolyticus and its homolog in Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1778-1782, 1998.
44. Nargotre, A. et al. *Quantitative structure activity relationship (QSAR) of aryl alkenyl amides/imines for bacterial efflux pump inhibitors*. Eur. J. Med. Chem., 10:2-15, 2008.
45. Nelson, D and Cox, M. Lehninger. Principles of Biochemistry. 4° edición. W.H. Freeman and Company. New York, 2008.
46. Neyfakh, A., Bidnenko, V. and Chen, L. *Efflux-mediated multidrug resistance in Bacillus subtilis: similarities and dissimilarities with the mammalian system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry 88:4781-4785, 1991.

47. Nikaido, H. *Multidrug Resistance in Bacteria*. Annu Rev. Biochem, 78:119-146, 2009.
48. Nishino, K. and Yamaguchi, A. *Overexpression of the response regulator evgA of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters*. J. Bacteriol., 183:1455-1458, 2001.
49. Normark, H and Normark, S. *Evolution and spread of antibiotic resistance*. Journal of internal medicine, 252:91-196, 2002.
50. Olmsted III, J., Kearns, D.R. Biochemistry 16:3647, 1997.
51. Ovalles, D. et al. *Desarrollo de un método espectrofluorométrico para determinar astemizol*. Revista de la Facultad de Farmacia, 44:29-35, 2002
52. Paixao, L. et al. *Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in Escherichia coli*. Journal of Biological Engineering, 3:18, 2009.
53. Pao, S., Paulsen, I. and Saier, M. *Major Facilitator Superfamily*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(1):1-34, 1998.
54. 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.
55. Paulsen, I. et al. *The SMR family; a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs*. Mol. Microbiol. 19:1167-1175, 1996.
56. Paulsen, I.T., Brown, M.H and Skurray, R.A. *Proton-dependent multidrug efflux systems*. Microbiol. Rev., 60:575-608, 1996.
57. Pei-Chung Hsied et al. *Bacteria lacking a multidrug pump: A sensitive tool for drug discovery*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(12):6602–6606, 1998.
58. Piddock LVJ. *Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance*. Nat. Rev. Microbiol. 4:629-636, 2006.

59. Poole, K. *Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organism*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 3:255-264, 2001.
60. Putman, M., Van Veen, H. W, and Konings, W. N. *Molecular properties of bacterial multidrug transporters*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:672-693, 2000.
61. Robcsek A, Jacoby GA, Hooper DC. *The worldwide emergence of plasmids-mediated quinolone resistance*. Lancet Infect. Dis. 6:629-640, 2006.
62. Rowe-Magnus DA, Mazel D. *The role of integrons in antibiotics resistance gene capture*. Int. F. Med. Microbiol. 292:115-125, 2002.
63. Saier, M. et al. *The major facilitator superfamily*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 1:257-279, 1999
64. Sanchez, P. *Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos*. Rev. Esp. Quimioterap 16(2):172-187, 2003.
65. Schinkel, AH. *Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice*. Int J Clin Pharmacol Ther 36:9-13, 1998.
66. Schulman, S. and Juchum, J. *Organic Chemistry Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Ed. J.C Lindon, G.E. Tranter, J.L. Holmes, 3:1718-1725, 2000.
67. Sharom, F.J., Liu, R. Qu. and Romsicki, Y. *Exploring the structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter using fluorescence spectroscopic tools*. Sernin. Cell Dev. Biol., 12:257-265, 2001.
68. Spratt BG. *Resistance to antibiotics mediated by target alterations*. Science 264:388-393, 1994
69. Stermitz, F. et al. *Synergy in a medical plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor*. Proc Natl Acad Sci, 97(4):1433-1437, 2000.
70. Taubes, G. *The bacteria Fight Back*. Science, 321:356-361, 2008.

71. Taroco R, Seija V, and Vignoli R. *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. 36:663-671, 2008.
72. Tseng, T. et al. *The RDN permease family; an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins*. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1:107-125, 2003.
73. Universidad Politécnica de Valencia, 2010. *Procedimiento estándar para trabajo con bromuro de etidio*. Obtenido el 24 de mayo del 2012 del sitio web http://www.spri.upv.es/D7_2_11_b.htm.
74. Valeur, B. *Molecular fluorescence. Principles and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
75. Van Veen, H. W. et al. *Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1*. Proc. Natl Acad Sci. USA, 93:10668-10672, 1996
76. Vidailiac, C. et al. *Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of multidrug efflux pump NorA of Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 51:831-838, 2007.
77. Viveiros, M. et al. *Demonstration of intrinsic efflux activity of Escherichia coli K-12 AG 100 by an automated ethidium bromide method*. Int J Antimicrob Agents, 31:458-462, 2008.
78. W van Veen, H et al. *A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gen*. Nature 391:291-295, 1998.
79. Wang, R. B., Kuo, C. L., Lien, L. L. and Lein, E. J. *Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors*. J. Clin. Pharmacol. Ther., 28:203-228, 2003.
80. Yerushalmi, H., Lebendiker, M., and Schuldiner, S. *EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents*. J. Biol. Chem., 271:31044-31048, 1995.

81. Yu, J.L., Grinius, L.L. and Hooper, D. C. *NorA functions as a multidrug efflux protein in both cytoplasmic membrane vesicles and reconstituted proteoliposomes.* J. Bacterial, 184:1370-1377, 2002.
82. Zamora, J., Pearce, H. and Beck, W. *Physical-chemical properties shered by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells.* Mol. Pharmacol, 33:454-462, 1988.
83. Zechini, B and Versace, I. *Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in Bacteria.* Recent patents on anti-infective drug discovery, 4:37-50, 2009.