



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA FILOSFERA DE LA CIUDAD DE MÉXICO:
AISLAMIENTO DE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MÓNICA GABRIELA ZAVALA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: María Elsa Escudero García**
VOCAL: **Profesor: María Guadalupe Tsuzuki Reyes**
SECRETARIO: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Rosalba Esquivel Cote**
2° SUPLENTE: **Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, ANEXO DEL LABORATORIO 1-A, DEPTO. BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO DISTRITO FEDERAL.

ASESOR DEL TEMA: DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ _____

SUSTENTANTE: MÓNICA GABRIELA ZAVALA MARTÍNEZ _____

ÍNDICE

Introducción	5
Marco teórico	6
1. Historia e importancia de los antibióticos y el fenómeno de multirresistencia	6
2. Mecanismos generales de acción de los antibióticos	
a) <i>Inhibición de la síntesis de la pared celular</i>	8
b) <i>Alteración de la membrana citoplasmática</i>	8
c) <i>Inhibición de la síntesis de proteínas</i>	9
d) <i>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</i>	9
e) <i>Inhibidores de betalactamasas</i>	11
3. Mecanismos de resistencia a antibióticos	
3.1. <i>Resistencia intrínseca</i>	
3.1.1 <i>Alteración mutacional del blanco de la proteína</i>	11
3.1.2 <i>Inactivación enzimática del fármaco</i>	11
3.1.3 <i>Evasión del blanco</i>	12
3.1.4 <i>Bombas de expulsión</i>	13
3.1.4.1 <i>MFS (major facilitator superfamily)</i>	14
3.1.4.2 <i>SMR (small multidrug resistance)</i>	15
3.1.4.3 <i>RND (resistance-nodulation-cell division)</i>	15
3.1.4.4 <i>ABC (ATP-binding cassette)</i>	16
3.1.4.5 <i>MATE (multidrug and toxic extrusion)</i>	17
3.2. <i>Resistencia adquirida</i>	
3.2.1. <i>Transferencia horizontal de genes</i>	
a) <i>Transformación</i>	18
b) <i>Transducción</i>	19
c) <i>Conjugación</i>	20
3.2.2. <i>Plásmidos</i>	21
3.2.3. <i>Transposones</i>	22
3.2.4. <i>Integriones</i>	23
4. La filósfera	24
4.1. <i>Características generales</i>	25
4.2. <i>Comunidades microbianas de la filósfera</i>	
a) <i>Agregados bacterianos</i>	26
b) <i>Composición comunitaria</i>	27
c) <i>Directores de la estructura comunitaria</i>	27
4.3. <i>Modificaciones del hábitat de la hoja por las comunidades microbianas</i>	
a) <i>Alteración de las propiedades de la superficie de la planta</i>	28
b) <i>Modificaciones dependientes de la densidad celular</i>	28
c) <i>Interacciones planta-bacteria</i>	30
4.4. <i>Interacciones bacteria-bacteria</i>	30

Objetivo general	32
Hipótesis	32
Objetivos particulares	32
Materiales y métodos	33
Resultados	35
Discusión	43
Conclusiones	47
Perspectivas	47
Referencias	48
Anexo I	50
Anexo II	51

Introducción

La introducción de los antibióticos en el ambiente clínico es uno de los eventos más importantes dentro del área de la salud pública a nivel mundial. Desde la introducción de la penicilina, descubierta por Alexander Fleming en 1928, la producción de centenas o millares de diferentes antibióticos no ha cesado. En un principio se pensaba que cualquier enfermedad infecto-contagiosa podría ser combatida a través de los antibióticos. Sin embargo, el desarrollo de mecanismos específicos de resistencia ha entorpecido su uso terapéutico (2).

Existen diversos factores involucrados en la aparición del fenotipo de multiresistencia. Entre los más destacados se encuentran el uso excesivo de los antibióticos dentro de la clínica y la industria agropecuaria. El uso irracional de estas moléculas ejerce una constante presión selectiva sobre los microorganismos favoreciendo la aparición de resistencia. De igual manera, los elementos genéticos tales como plásmidos, transposones, integrones y, más recientemente, las bombas de expulsión se sabe que juegan un papel crítico en el desarrollo del fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos.

Dado que el enfoque actual está dirigido al tratamiento contra infecciones nosocomiales y no desde el punto de origen de la diseminación del fenotipo de resistencia, es necesario ampliar la visión de hasta qué punto estas bacterias se encuentran distribuidas en los diferentes entornos ambientales.

Un ambiente natural que jamás ha sido evaluado con el fin de determinar perfiles de resistencia es la filosfera. Este nicho ecológico abarca a los diversos microorganismos conocidos como epífitos que se localizan en la parte aérea de las plantas (1,017,260,200 km²). Se estima que existen entre 10⁶ y 10⁷ bacterias/cm² por área foliar y, en total, la filosfera abarca aproximadamente 10²⁶ células bacterianas (24). Por consiguiente, sería de gran interés evaluar este nicho extremadamente ubicuo que puede ser considerado una fuente potencial de genes de resistencia.

Marco teórico

1. Historia e importancia de los antibióticos y el fenómeno de multirresistencia

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 fue seguido por la introducción, el desarrollo y la producción comercial de muchas otras moléculas antimicrobianas que son utilizadas en la clínica. En la actualidad, la producción mundial de antibióticos es de aproximadamente 100 mil toneladas por año. En el año 2009 se generaron ventas por 42 mil millones de dólares, lo cual representa 46% de los agentes anti-infecciosos adquiridos (en los que se incluyen fármacos antivirales, vacunas y antimicóticos). Entre los antibióticos más vendidos se encuentran las cefalosporinas, penicilinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas (1). A pesar de la gran cantidad de antibióticos que se producen, el fenómeno de resistencia ha ido incrementando de forma exponencial desde su aparición en 1937.

Los primeros reportes indican que una cepa de *Streptomyces sp* resistente a sulfonamida fue aislada en una base militar de EU en los años de 1930. En 1946 se reportó el primer caso de una cepa resistente a sulfonamida en civiles e incluso, antes del empleo de la penicilina como antibiótico comercial, se reportó la primera enzima bacteriana (penicilinasa) capaz de bloquear el efecto antibacteriano (2). A partir de entonces, múltiples casos de resistencia se han encontrado en diferentes partes del orbe.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la resistencia a antibióticos es una de las tres mayores amenazas a la salud humana (3). En el 2009 la ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database) publicó más de 20 mil genes, posiblemente involucrados en la resistencia, de casi 400 tipos diferentes de especies bacterianas (4).

En los últimos años se ha reportado el surgimiento de bacterias resistentes de importancia clínica tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), organismos ESKAPE (un acrónimo en inglés para *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de enterobacterias) y bacterias que contienen múltiples elementos genéticos como NDM-1 (Nueva Delhi metalobetalactamasa-1) (5). La mayor parte de estos microorganismos deben su importancia no por una patogenicidad o virulencia elevadas, sino a su alta resistencia a los antibióticos. Un ejemplo notable es la cepa MRSA, la cual no sólo es resistente a meticilina (antibiótico desarrollado en específico para combatir las penicilasas producidas por *S. aureus*) sino también a aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol y lincosamidas. En el año 2002 surgió la primera cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA, por su siglas en inglés). Es importante resaltar que la vancomicina, un glicopéptido, es el antibiótico utilizado en casos de infecciones severas en donde otros antibióticos han fallado, por lo que su uso se considera restringido. Existen otras amenazas sobresalientes tales como cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae* resistentes a múltiples antibióticos (6, 7).

Generalmente la resistencia a múltiples antibióticos está asociada a ambientes intrahospitalarios, a la industria agropecuaria y a diversas actividades de origen humano. El uso irracional de los antibióticos en la clínica, los factores de crecimiento en el ganado, etc., han generado una fuerte presión selectiva sobre las bacterias favoreciendo la aparición del fenotipo de multirresistencia a antibióticos (8).

En el año 2001 se reportó la presencia de una cepa resistente de *Salmonella enterica* serotipo *typhimurium* en carne molida destinada para consumo humano (9). Asimismo, se ha observado que el fenotipo de

resistencia ha alcanzado nichos nunca antes previstos tales como la piel humana y la flora gastrointestinal de humanos (10). La velocidad en que se han esparcido los diferentes genes de resistencia hace reconsiderar la forma en cómo las bacterias adquieren el fenotipo de multirresistencia, mecanismos que serán discutidos más adelante.

2. Mecanismos generales de acción de los antibióticos

Hoy en día, podemos encontrar una amplia variedad de moléculas de antibióticos así como diferentes formas de clasificación. Sus mecanismos de acción son diversos y de acuerdo a éstos, pueden ser organizados en cinco grupos:

a) *Inhibición de la síntesis de la pared celular:* Este grupo impide la reacción de transpeptidación en la pared celular de las bacterias, es decir, el entrecruzamiento de dos cadenas de peptidoglicano por su unión a las enzimas transpeptidasas (PBP, penicillin-binding proteins) que lleva a un debilitamiento de la pared que, por diferencias de presión osmótica y la estimulación de la liberación de autolisinas, termina rompiéndose. Ejemplos de este grupo son los antibióticos betalactámicos como la penicilina, las cefalosporinas y la vancomicina (11).

b) *Alteración de la membrana citoplasmática:* Su mecanismo de acción es la alteración de la membrana mediante la salida de cationes de la célula bacteriana que provoca un desequilibrio de cargas afectando la permeabilidad de la misma. Dentro de los antibióticos que actúan a este nivel está la polimixina B y la colistina (polimixina E), inhibidores de bacterias Gram negativas que tienen lípidos de carga negativa en su superficie. Otro antibiótico que actúa en la membrana es la gramicidina, la cual produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación

de poros por donde puede haber pérdida del contenido citoplasmático de la bacteria (11, 12).

c) Inhibición de la síntesis de proteínas: Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas subunidades constituyen el sitio de acción de agentes antibacterianos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen los antibióticos. Los aminoglucósidos (estreptomicina, neomicina, kanamicina, amikacina, etc.) son azúcares complejos que se obtienen de varias especies de *Streptomyces* e interfieren con la función ribosomal bacteriana, específicamente con la subunidad 30S.

Por otra parte, tres clases importantes de drogas actúan en la subunidad ribosomal 50S: cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas (lincomicina, clindamicina). El cloranfenicol es un agente bacteriostático que actúa contra organismos Gram positivos y Gram negativos inhibiendo la formación de uniones peptídicas al bloquear la enzima peptidil-transferasa. Los macrólidos (eritromicina, oleandomicina) son compuestos con grandes anillos de lactona y al unirse a la subunidad 50S interfieren con la actividad de la peptidil-transferasa, con la translocación o con ambas funciones. Las lincosamidas actúan de manera similar a los macrólidos (11, 12).

d) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: Los más significativos de este grupo son el trimetoprim y las sulfonamidas, los cuales interfieren con el metabolismo de los folatos por bloqueo competitivo en la biosíntesis de los tetrahidrolatos precursores del ácido fólico. Las sulfonamidas bloquean competitivamente la conversión del pteridina y ácido para-amino-benzoico (PABA) a ácido hidrofólico. El trimetoprim tiene una gran afinidad para la enzima dehidrofolato reductasa y al unirse a ella inhibe la síntesis de tetrahidrolatos necesarios para la síntesis de ADN y ARN (12).

Otros mecanismos de acción en este grupo incluyen la unión a enzimas tales como polimerasas y girasas, la interconversión de bases y la incorporación a la cadena de polinucleótidos al actuar como análogos de éstas. Ejemplos de antibióticos con este mecanismo son la rifampicina y las quinolonas tales como el ciprofloxacino o el ácido nalidíxico (11).

e) Inhibidores de betalactamasas: Las betalactamasas son enzimas producidas por algunas especies bacterianas y son las responsables de la resistencia intrínseca hacia algunos antibióticos que en su estructura química presentan el anillo betalactámico (como penicilinas y cefalosporinas). Las betalactamasas rompen el anillo β -lactámico impidiendo la actividad antimicrobiana. Los antibióticos inhibidores de betalactamasas son el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (11,12).

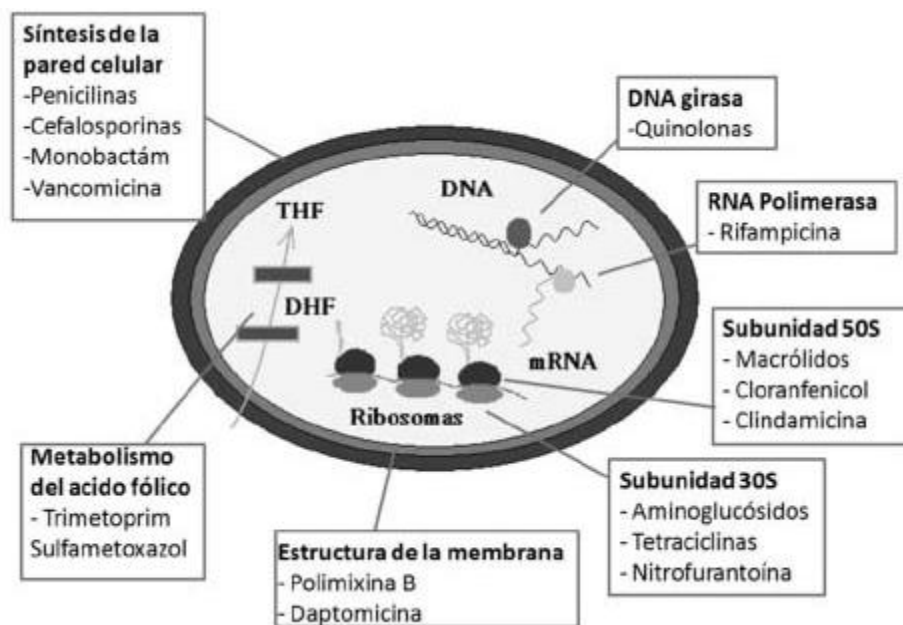


Figura 1. Representación esquemática de los blancos de acción de los antibióticos (13).

3. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Existen diferentes mecanismos para adquirir el fenotipo de resistencia. En general, los mecanismos pueden ser agrupados en dos categorías: resistencia intrínseca y resistencia adquirida.

3.1. Resistencia intrínseca

Todas las bacterias poseen diferentes mecanismos naturales que les permiten, entre otras cosas, evadir los efectos de los antibióticos. A este tipo de procesos se le ha denominado resistencia intrínseca. Existen diversos tipos de resistencia intrínseca, entre los que destacan los siguientes:

3.1.1. Alteración por mutación de la proteína blanco

En el caso de compuestos sintéticos, es muy improbable que las bacterias empleen mecanismos enzimáticos para su desactivación. Sin embargo, éstas aún pueden desarrollar resistencia a través de mutaciones que pueden hacer a la proteína blanco menos susceptible al agente.

Ejemplo de este tipo de resistencia se da ante las fluoroquinolonas, principalmente por mutaciones en las enzimas blanco de ADN-topoisomerasas. Estas mutaciones no hacen completamente resistente a las bacterias y, además, no permiten la transferencia de diversos genes de resistencia (14).

3.1.2. Inactivación enzimática del fármaco

Este tipo de mecanismo es muy común para antibióticos de origen natural como aminoglucósidos inactivados a través de fosforilación enzimática por APH (aminoglucósido fosforiltransferasa), acetilación

por ACC (aminoglucósido acetiltransferasa) o adenilación (por aminoglucósido adeniltransferasa o nucleotidiltransferasa), y β -lactámicos inactivados por hidrólisis enzimática por β -lactamasas, usualmente en el periplasma. Los genes que codifican para estas enzimas pueden fácilmente producir resistencia. Entre los antibióticos más estudiados y que pertenecen a este grupo se encuentran:

a) Aminoglucósidos: Inactivados por modificaciones que reducen las cargas positivas netas de los antibióticos policationicos.

b) β -lactámicos: Los genes para β -lactamasas son probablemente los más conocidos. Estos genes codifican enzimas que pueden aumentar la catálisis y, por lo tanto, producir un mayor espectro de resistencia. Están clasificadas en varias familias filogenéticas: Clase A (que incluyen las enzimas de *S. aureus* y las tipo TEM producidas sobre todo por *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*) y Clase C (de enzimas codificadas cromosómicamente), ambas son similares a las serín-proteasas y a su mecanismo de acción (hidrólisis de enlaces peptídicos). Además, existen las metaloenzimas (clase B) que hidrolizan eficazmente carbapenems (14).

3.1.3. Evasión del blanco

El modelo de estudio para este grupo es la vancomicina. Este antibiótico tiene un inusual modo de acción debido a que en vez de inhibir una enzima, se une a un substrato, el disacárido-pentapéptido, un precursor del péptidoglicano de la pared celular. Se creyó que sería muy difícil que las bacterias generaran resistencia a la vancomicina. Sin embargo, hoy es una realidad entre los enterococos, los cuales son además naturalmente resistentes a las β -lactamasas, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclina.

Estudios relacionados con el mecanismo de resistencia revelaron que se había remplazado el final del pentapéptido D-Ala-D-Ala, sitio al que se liga la vancomicina, por una estructura de éster D-Ala-D-ácido láctico, impidiendo el efecto antibacteriano. La producción de esta estructura alterada requiere la participación de varios genes importados de otras especies de bacterias (14, 15).

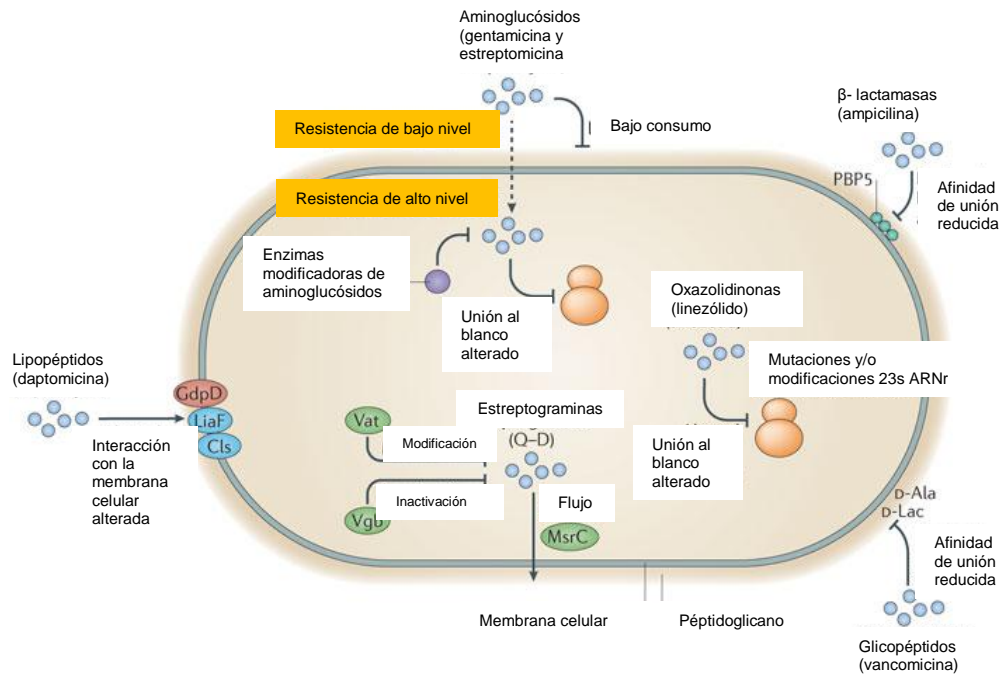


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de la resistencia intrínseca en bacterias (16).

3.1.4. Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión fueron descritas por vez primera en células eucariontes provenientes de pacientes con cáncer. Posteriormente, se describió la presencia de las mismas en células procariontes (17). Las bombas de expulsión son proteínas transmembranales altamente específicas. Filogenéticamente, están organizadas en cinco superfamilias: MFS, SMR, RND, ABC y MATE. Las familias RND, SMR y MFS utilizan fuerza protón motriz para realizar su acción,

mientras que MATE es impulsada por un sistema antiporte y la familia ABC utiliza ATP (18).

3.1.4.1. MFS (major facilitator superfamily)

Los transportadores MFS comprenden un número de subfamilias. De estas subfamilias, los transportadores de azúcares y fármacos son los más numerosos.

Están compuestas de aproximadamente 400 aminoácidos arreglados de tal manera que forman 12 hélices transmembranales, con un bucle largo citoplasmático entre las hélices seis y siete.

Un número menor de estos transportadores tienen una topología de 14 hélices, pero los transportadores de este tipo tienden a tener un bucle citoplasmático mucho más pequeño (17, 18).

A) Subfamilia de 12 hélices: El transportador cromosómicamente codificado por *norA* de *S. aureus* pertenece a esta subfamilia y produce resistencia tanto a fluoroquinolonas como a colorantes e inhibidores catiónicos, incluyendo puromicina y tetrafenilfosfato. El cromosoma de *S. aureus* contiene al menos otros dos homólogos de *norA* (*norB* y *norC*) que producen fenotipos similares. Estas bombas de expulsión son inhibidas por reserpina.

B) Subfamilia de 14 hélices: QacA y QacB fueron los primeros ejemplos de esta clase. Estas bombas expulsan activamente biocidas monocatiónicos y colorantes tales como benzalconio, cloruros, bromuro de cetiltrimetilamonio y bromuro de etidio. Adicionalmente, QacA expulsa biocidas dicatiónicos como

clorhexidina e isetionato de pentamidina. QacA es negativamente regulado por el represor QacR.

Otro transportador que pertenece a esta rama es EmrB de *E. coli*, el cual confiere resistencia a desacoplantes tales como carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona y a antibióticos como ácido nalidíxico y tiolactomicina (14).

3.1.4.2. SMR (small multidrug resistance)

Estos transportadores son mucho más pequeños que aquellos pertenecientes a las familia MFS y RND. Están normalmente compuestos de alrededor de 100 aminoácidos arreglados en cuatro hélices. Una de las bombas SMR mejor caracterizadas es EmrE de *E. coli*, la cual contribuye a la resistencia a bromuro de etidio y dipiridilio (herbicida cuaternario de amonio). Estas proteínas expulsan compuestos catiónicos como amonios cuaternarios o etidios (14, 17).

3.1.4.3. RND (resistance-nodulation-cell division)

Estos transportadores son mucho más grandes que los de la familia MFS ya que están compuestos por lo general de aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos. Pero, a pesar de la disparidad en tamaño, adoptan una estructura similar de 12 hélices. Sin embargo, difieren con los transportadores MFS en que poseen grandes dominios periplasmáticos entre las hélices 1 y 2 y entre las hélices 7 y 8.

La familia RND juega un papel sobresaliente en la multirresistencia de las bacterias Gram-negativas como *E. coli* por su bomba AcrB y *P. aeruginosa* gracias a MexB, ya que se

asocian con otras dos clases de proteínas: el canal extramembranal ejemplificado por TolC en *E. coli* (perteneciente a OMF-outer membrane factor) y a una proteína adaptadora periplásmica tal como AcrA de *E.coli* y MexA de *P. aeruginosa*, calificadas en la familia MFP (membrane fusion protein).

Estos transportadores confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos lipofílicos (penicilina G, oxacilina, cloxacilina, macrólidos, novobiocina, linezólido y ácido fusídico) y son muy substrato-específicos, por lo que la familia RND está haciendo contribuciones muy importantes a la resistencia de patógenos de relevancia clínica (14, 17, 18).

3.1.4.4. ABC (ATP-binding cassette)

En bacterias, los transportadores ABC poseen alta especificidad a substratos tales como azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, complejos órganoferrosos, vitaminas y antibióticos. Las bombas ABC bacterianas involucradas en multirresistencia son en gran parte transportadores específicos para un antibiótico y algunas de ellas pueden ser encontradas en organismos productores de antibióticos tal como *Streptomyces spp.*

Los transportadores ABC pueden ser encontrados también en bacterias Gram positivas del filo *Staphylococci* y *Enterococci* confiriendo resistencia a macrólidos y bacitracina.

Otro transportador ABC de importancia es MacB en *E. coli* el cual, acoplado con la proteína adaptadora MacA, confiere resistencia a macrólidos cuando se sobre-expresa (17, 18).

3.1.4.5. MATE (multidrug and toxic extrusion)

Estos transportadores son similares en tamaño a la familia MFS y están compuestos generalmente de 450 aminoácidos arreglados en 12 hélices; sin embargo, ambas familias no comparten ninguna secuencia genética similar.

NomM de *Vibrio parahaemolyticus* puede expulsar fluoroquinolonas, aminoglucósidos y bromuro de etidio. Una bomba similar fue encontrada en *Bacteroides fragilis* y homólogos de ésta están presentes en *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (17,18).

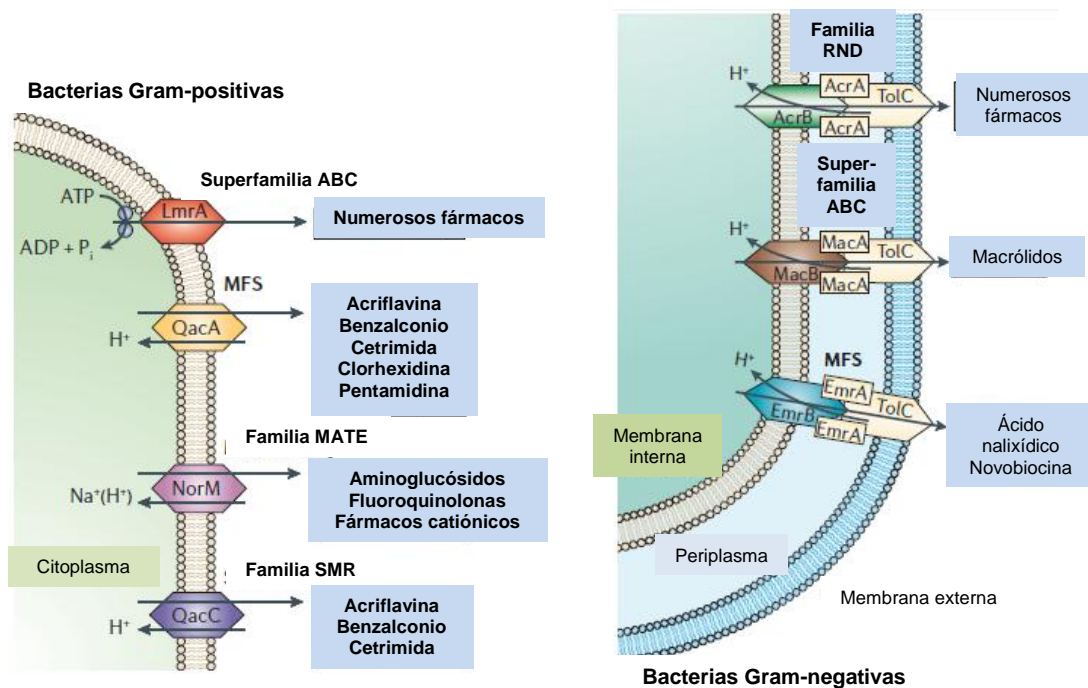


Figura 3. Representación esquemática de las familias de bombas de expulsión en bacterias Gram positivas y Gram negativas (18).

3.2. Resistencia adquirida

3.2.1. *Transferencia horizontal de genes*

Una bacteria puede adquirir material genético por medio de algunos de los tres mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG) conocidos: transformación, transducción y conjugación.

- a) La transformación bacteriana es un proceso de transferencia genética por el cual el ADN es incorporado en una célula receptora y lleva a cabo un cambio genético. Algunas especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas son naturalmente transformables.

Como en las bacterias el ADN está presente en la célula en forma de una sola molécula cromosómica larga, cuando la célula es lisada suavemente, el material genético sale. Debido a su gran longitud, los cromosomas bacterianos se rompen con facilidad dando lugar a fragmentos de un tamaño transformable típico de alrededor de 10 kpb cada uno (aprox. 10 genes). Normalmente, una célula individual incorpora sólo uno o unos pocos de estos fragmentos, de modo que sólo una pequeña proporción de los genes de una célula se pueden transferir a otra mediante un acto de transformación individual (11).

Incluso dentro de los géneros transformables, sólo determinadas cepas o especies se pueden transformar. Una célula que es capaz de aceptar DNA y ser transformada se dice que es *competente*, y esta capacidad está determinada genéticamente. Para cepas de difícil transformación, puede ser empleada la técnica física de electroporación, en la cual las células se mezclan con ADN y después se exponen a breves pulsos eléctricos de alto voltaje. Esto hace permeable la envoltura celular y permite la entrada del ADN.

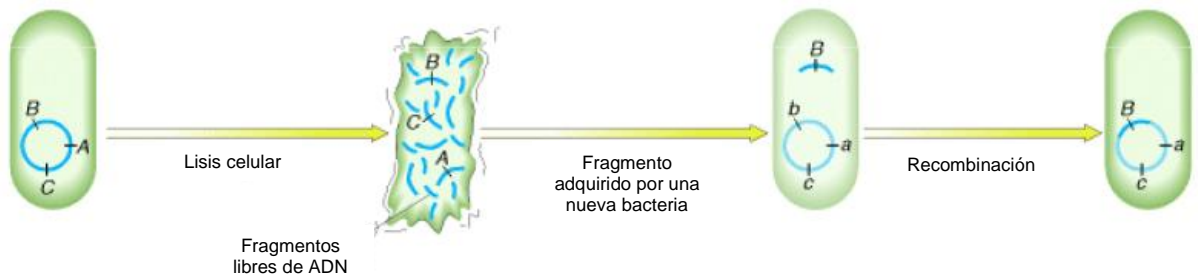


Figura 4. Representación esquemática del proceso de transformación (19).

- b) En la transducción, un virus bacteriano (bacteriófago) transfiere el ADN de una célula a otra. Los virus pueden transferir los genes del hospedador de dos maneras.

En la primera, llamada transducción generalizada, el ADN derivado de prácticamente cualquier fragmento del genoma del hospedero es empacado en el interior del virión maduro en lugar del genoma vírico. En la segunda, llamada transducción especializada, el ADN de una región específica del cromosoma del hospedero se integra directamente en el genoma del virus (reemplazando a alguno de los genes víricos), pero sólo ocurre con ciertos virus atemperados (11).

El bacteriófago transductor en ambos tipos de transducción es normalmente no-infeccioso porque los genes bacterianos han sustituido a todos o a algunos de los genes víricos necesarios.

No todos los fagos pueden transducir, ni todas las bacterias son transducibles, pero es un fenómeno importante en la transferencia de material genético.

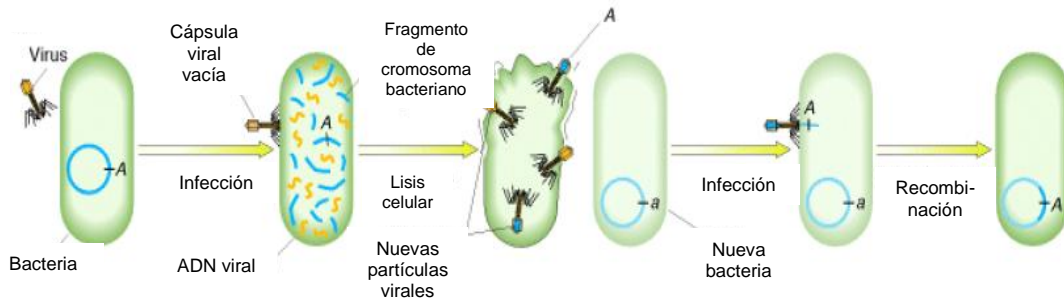


Figura 5. Representación esquemática del proceso de transducción (19).

c) La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia de material genético (plásmido con o sin parte del cromosoma bacteriano de una bacteria) en el cual una célula donante (F+) tiene que entrar en contacto físico con la ayuda de un pili sexual con una célula receptora (F-). La capacidad para actuar como célula donadora es una propiedad hereditaria conferida por el plásmido de fertilidad o plásmido F que está codificado junto con el pili sexual en el grupo de genes *tra* (19).

Durante este proceso sólo una de las hebras del plásmido sexual de la célula F+ se inserta a la célula F- y luego, la replicación del ADN por la ADN polimerasa restaura la cadena complementaria tanto de la célula donante como de la célula receptora. Esta replicación tiene como resultado que aparezca una copia del plásmido F en la célula receptora.

Existen estirpes con alta frecuencia de recombinación (Hfr), las cuales cuentan con un plásmido integrado a su material cromosómico y por ello son capaces de transferir porciones de su cromosoma cuando se les ha transferido el Plásmido F (células conocidas como F') (11, 19).

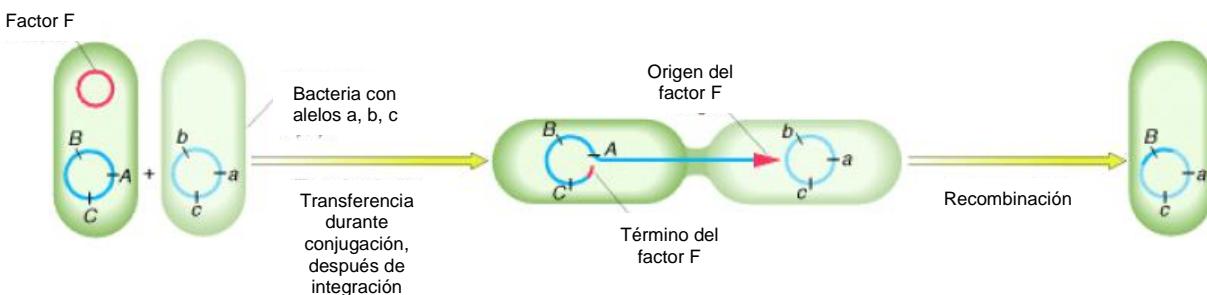


Figura 6. Representación esquemática del proceso de conjugación (19).

3.2.2. Plásmidos

Un plásmido es un elemento extracromosomal de ADN circular que cuenta con un origen de replicación autónomo y diferentes genes.

La mayor parte de los genes de resistencia son dispersados entre las bacterias a través de plásmidos. Un plásmido puede contener más de un gen de resistencia a antibióticos. De esta manera, en cada evento de conjugación entre las bacterias, se incrementa la dispersión de genes de resistencia. Cuando los plásmidos de resistencia (entonces nombrados plásmidos R) fueron descubiertos en los años cincuenta, muchos de ellos ya contenían genes de resistencia a aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol y sulfonamidas (14).

Existen dos tipos de plásmidos: los naturales y los sintetizados *in vitro* para actuar como vectores de clonación, llamados plásmidos recombinantes. Estos últimos se pierden frecuentemente de las células hospederas, incluso cuando existen en un relativo número elevado de copias. En contraste, la mayoría de los plásmidos naturales son muy estables y permanecen durante la división de las células receptoras incluso cuando su número es bajo. Esto es debido a que el plásmido contiene genes que aseguran la repartición correcta de copias a las células hijas, mientras que los recombinantes no. En la secuencia de plásmidos se observa que la mayoría de los genes de resistencia son componentes de transposones que los pueden transportar a diferentes partes del ADN (11, 14, 19).

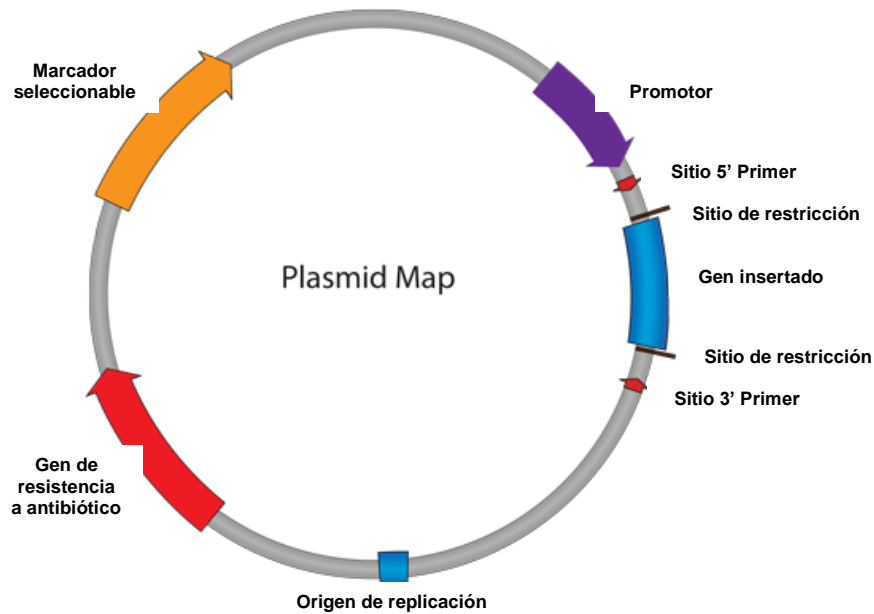


Figura 7. Representación esquemática de un plásmido recombinante y sus principales componentes (20).

3.2.3. *Transposones*

Un transposón es un elemento genético de gran movilidad que puede existir en plásmidos o integrado en otros transposones o el cromosoma de la célula hospedera. Están caracterizados por dos componentes principales: repeticiones cortas invertidas en ambos extremos de éste y un gen que codifica para la enzima transposasa, la cual reconoce las repeticiones invertidas y mueve el segmento de ADN flanqueado por ellas de un sitio a otro (11).

En bacterias Gram-positivas, un gran transposón de una clase especial, llamados transposones conjugativos, juegan un rol esencial. Éstos usan una especie de mecanismo de transposición del fago λ que genera un ADN circular como intermediario, el cual puede insertarse en un sitio predeterminado en el plásmido o ADN cromosomal, pero también puede comportarse como plásmido conjugativo transfiriendo su copia a otra bacteria por conjugación (14, 15)

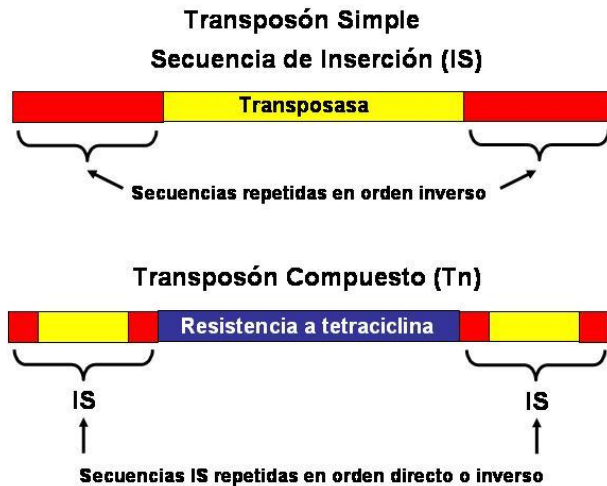


Figura 8. Representación esquemática de un transposón simple y un transposón compuesto (21).

3.2.4. Integrones

Los integrones son plataformas de montaje que incorporan marcos de lectura abiertos exógenos (open reading frames, ORF) que por recombinación sitio-específica se convierten a genes funcionales mediante la aseguración de su correcta expresión. Todos los integrones caracterizados hasta la fecha se componen de tres elementos clave necesarios para la captura de genes exógenos: un gen (*intI*) que codifica para una integrasa que pertenece a la familia de la tirosina-recombinasa, un sitio de recombinación primario (*attI*), y un promotor externo orientado (*Pc*) que dirige la transcripción de los genes capturados (23). Las integrasas codificadas por el integrón pueden recombinar unidades discretas de ADN circular conocidas como cassettes en una manera independiente de RecA. La integración se produce hacia 3' del promotor *Pc* residente en el sitio *attI*, que permite la expresión de los genes presentes en el cassette.

Una vez integrados, los genes de resistencia son marcados por la secuencia tag, por lo que pueden ser fácilmente integrados a otro integrón,

el cual puede contener un juego de genes de resistencia diferentes. Además de esta ventaja de alta movilidad, cuando los genes de resistencia se insertan a un integrón se organizan en un solo operón, con la misma orientación de transcripción bajo un promotor dado por la estructura del integrón (14, 22)

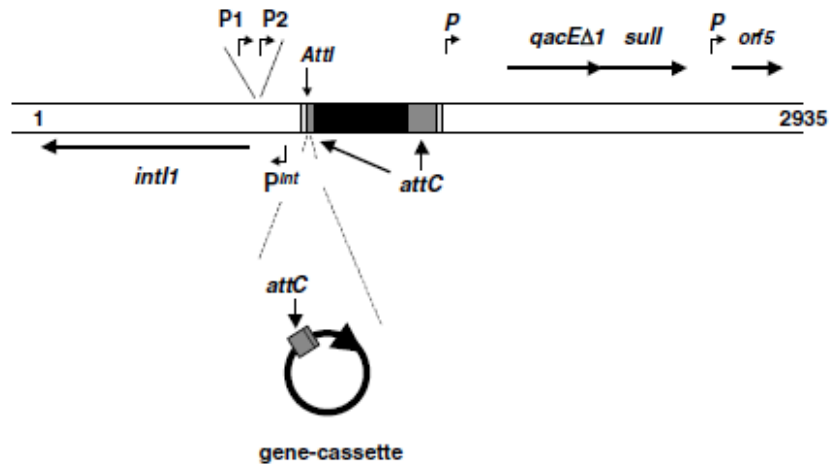


Figura 9. Representación esquemática de un integrón clase 1 (23).

4. La filofera

Actualmente, el fenómeno de resistencia ha sido ampliamente estudiado en ambientes intrahospitalarios y en diversas enfermedades infecto-contagiosas en humanos y animales. Sin embargo, el uso intensivo de los antibióticos ha contribuido a la generación de la multiresistencia mediante los distintos mecanismos bioquímicos antes descritos. A causa de este fenómeno, se ha vuelto de suma importancia a nivel mundial estudiar no sólo los mecanismos de resistencia sino los nichos en donde podrían encontrarse este tipo de microorganismos. Con la finalidad de comenzar a elucidar este tema, se ha aislado y caracterizado ADN de las bacterias que viven sobre las hojas de los árboles con el objetivo de secuenciar el genoma de cada uno de los filos presentes.

Las plantas están pobladas de microorganismos tanto en su superficie como en sus partes inferiores. El hábitat aéreo colonizado es llamado filosfera y sus habitantes son denominados epífitos.

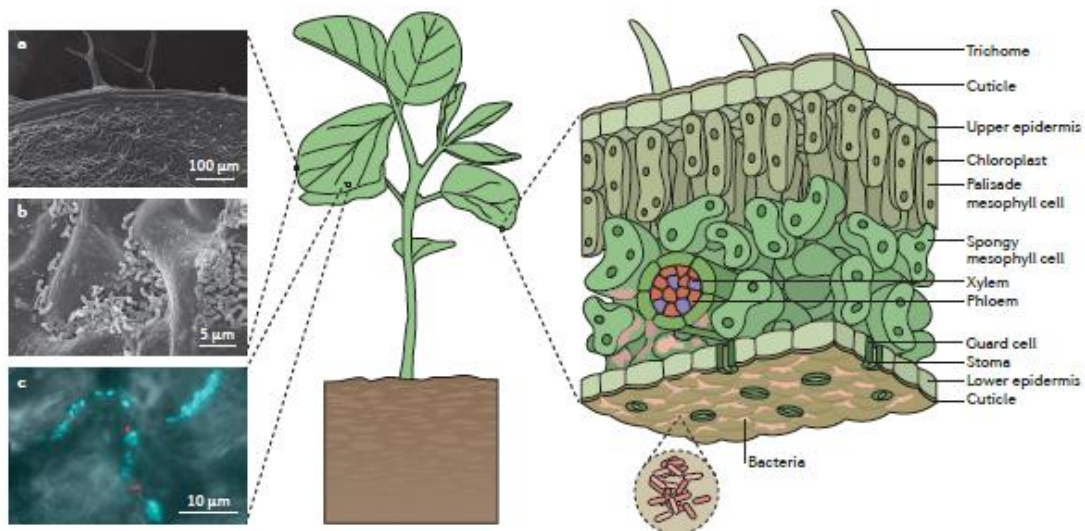


Figura 10. Representación gráfica del hábitat de la filosfera (24).

4.1. Características generales

La filosfera está conformada por las hojas de las plantas. El hábitat de la superficie de una hoja es vasto: el modelaje de la vegetación da un estimado de área total de 508,630,100 km², que corresponde a 1,017,260,200 km² de superficie tanto superior como inferior, una superficie que es aproximadamente el doble de grande que la de la Tierra. Asumiendo que hay un promedio de 10⁶-10⁷ bacterias por centímetro cuadrado de superficie de hoja, la población global bacteriana presente en la filosfera podría comprender ¡más de 10²⁶ células bacterianas! (24)

Algunas características de la topografía de la superficie de las hojas hacen resaltar a sus habitantes y evoca preguntas interesantes sobre la adaptación de las bacterias a la vida en la interfase atmósfera-hoja.

Las hojas están compuestas de una cutícula superior de epidermis formada de cutina (ácidos grasos hidroxiestericados) y ceras, formando una barrera lipofílica de baja permeabilidad. Sobresaliendo de la superficie se encuentran estomas, tricomas y otros muchos relieves que le dan a la planta una gran rugosidad que parecería hacer difícil su colonización y que clasificaría a la filosfera como un ambiente hostil. Tomando en cuenta una primavera cálida o un viento hidrotermal, los 40°C a veces registrados en las hojas expuestas a luz solar intensa son relativamente benignos. A pesar de que la desecación de la superficie puede causarles estrés a las bacterias, ésta no puede ser mayor al de la piel animal expuesta, suelo muy seco u otros hábitats parecidos (25, 26).

De manera similar, las temperaturas frescas de 5 a 10°C y las concentraciones diluidas de substratos poco nutritivos que pueden ser típicos en las hojas que están mojadas con rocío, son benignas en comparación a las condiciones frías y concentradas en el lecho marino.

Tampoco es la radiación UV mucho más intensa en la superficie de la hoja que en agua clara, por ejemplo, mas lo que podría hacer único a estas bacterias de las hojas es que están expuestas a todas estas condiciones en un solo día y a diario. Si la superficie de las hojas es un ambiente difícil, no es debido a los extremos a los que está expuesta, sino a la frecuente, repetida y rápida alteración de las condiciones, cada una de las cuales puede ser considerada estresante para las bacterias.

Además, las hojas proveen recursos limitados de nutrientes a las bacterias y están sujetas a los cambios de estación naturales que generalmente llevan a que sus poblaciones sean sólo temporales, en contraposición con la rizosfera (25, 26).

4.2. Comunidades microbianas de la filosfera

- a) Agregados bacterianos:** la mayoría de las bacterias en la superficie de las hojas forman estas estructuras, las cuales son particularmente comunes en las depresiones formadas en las conjunciones de las células epidermales, a lo largo de las venas y en las bases de los tricomas (excrecencias de origen epidérmico glandulares o no glandulares), donde las bacterias se encuentran embebidas en sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que las ayudan a mantener una superficie hidratada alrededor de ellas y eventualmente, también a concentrar enzimas detoxificantes (24).
- b) Composición comunitaria:** la riqueza en especies bacterianas de este nicho es substancial en regiones templadas y sobre todo en subtropicales y tropicales, pero es comparativamente menor a aquella de la rizosfera debido a que usualmente las hojas tienen una vida menor y son entidades discretas en comparación a las raíces que viven rodeadas por el suelo, en el que los microorganismos pueden sobrevivir en estado latente por años. Sin embargo, los filos más comunes registrados en laboratorio son aquellos de las Proteobacterias (clases Alfa y Gama), Actinobacterias y Bacteroidetes (24).
- c) Directores de la estructura comunitaria:** factores ambientales como la radiación, la contaminación y la fertilización por nitrógeno, además de factores biológicos inherentes a la planta tales como la edad de la hoja y la presencia de otros microorganismos, afectan la estructura comunitaria. Y estudios recientes han demostrado que también el genotipo de la planta es un factor importante. El descubrimiento de que varios

géneros de bacterias en una especie de planta están representados por diferentes cepas del mismo género en plantas vecinas de diferentes especies, indica que las plantas ofrecen distintos nichos a diferentes cepas bacterianas del mismo género, lo que podría estar contribuyendo a variación intragénero (24, 26).

4.3. *Modificaciones del hábitat de la hoja por las comunidades microbianas*

- a) Alteración de las propiedades de la superficie de la planta: Múltiples factores químicos y físicos limitan el crecimiento bacteriano y la sobrevivencia en la filosfera. Es así que debe esperarse que haya una selección de cualquier fenotipo bacteriano que permita a las bacterias epífitas sobrellevar esta limitación. Tales fenotipos pueden incluir características que le confieran a la bacteria la habilidad de modificar su microhábitat para aumentar la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, las bacterias pueden incrementar la humedad de las hojas produciendo compuestos con propiedades surfactantes o facilitar la colonización produciendo siringomicina, toxina que afecta el transporte de iones a través de la membrana celular, lo cual lleva incluso a un proceso de lisis de las células vegetales (25).

- b) Modificaciones dependientes de la densidad celular: ayudan a la formación y mantenimiento de los agregados bacterianos sobre las hojas, al utilizar compuestos tales como EPS (substancias poliméricas extracelulares) para regular la disponibilidad de agua, nutrientes y proteger contra formas reactivas de oxígeno.

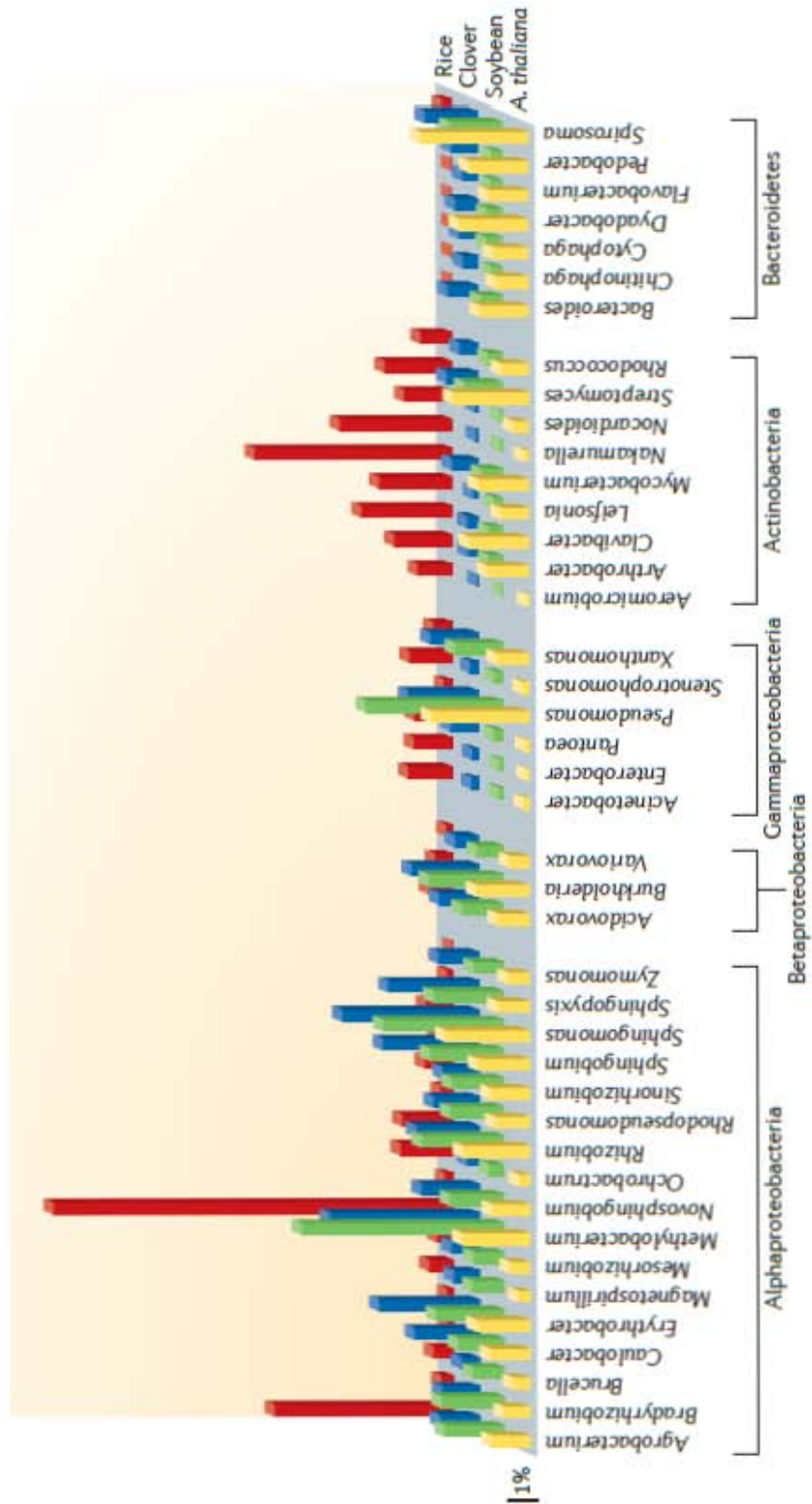


Figura 11. Principales microorganismos presentes en la filosfera (24).

Además, una alta densidad celular también induce la expresión de ciertos fenotipos que son comunicados vía *quorum-sensing* entre diferentes especies de bacterias (25).

- c) Interacciones planta-bacteria: la alteración bacteriana del ambiente de la planta hospedera es tradicionalmente asociado con bacterias patógenas de ésta. Por ejemplo, la habilidad de la bacteria *Pseudomonas syringae* de causar alguna enfermedad está fuertemente correlacionada con los tamaños de sus poblaciones epifíticas en las hojas (25).

4.4. Interacciones bacteria-bacteria

La naturaleza agregativa de los epífitos bacterianos en las hojas, sobre todo en sitios de relativa abundancia de nutrientes, puede explicar las muy altas velocidades de transferencia de plásmidos observados entre las bacterias de la filosfera.

Sorpresivamente, la velocidad de transferencia de plásmidos en plantas expuestas a una humedad elevada, es igual a aquellas en humedades bajas. Sin embargo, la actividad metabólica de las células, evidentemente, es menor en condiciones de menor humedad.

Dado que las comunidades bacterianas en las plantas soportan cambios substanciales de composición durante una estación de crecimiento y que las bacterias epifíticas comprenden una diversidad de plásmidos (entre ellos de resistencia), el potencial de transferencia de genes en estas comunidades parece grande. En conjunto, estas observaciones indican que, comparado a otros hábitats como el suelo, las superficies de las hojas son sitios importantes para la diseminación de genes de resistencia mediante procesos de transmisión horizontal de genes. La búsqueda de

bacterias multirresistentes a antibióticos en este nicho ecológico cobra mayor importancia debido a que podría ser una fuente de genes de resistencia a partir de la cual habría dispersión constante (25, 26).

Objetivo General

Aislar bacterias multirresistentes a antibióticos a partir de hojas de árboles recolectadas en cuatro zonas diferentes de la Ciudad de México

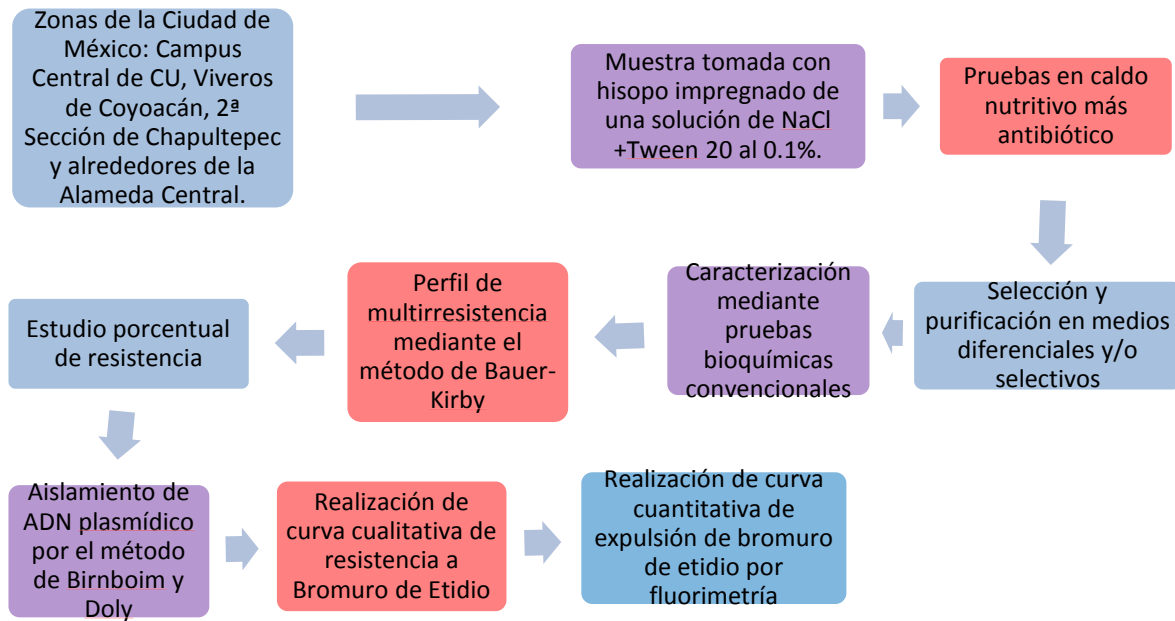
Hipótesis

Debido a la amplia presencia de bacterias resistentes y multirresistentes a antibióticos en diferentes nichos ecológicos, es probable que existan bacterias con el mismo fenotipo de resistencia en la biosfera.

Objetivos Particulares

- 1) Determinar la multirresistencia a los antibióticos mediante el método de Bauer-Kirby.
- 2) Determinar el número relativo de cepas resistentes a antibióticos en las muestras, utilizando la técnica de replica plating de Lederberg (27).
- 3) Evaluar la posible sobre-expresión de las bombas de expulsión como probable mecanismo de multirresistencia.

Materiales y métodos



Primera parte: Aislamiento, purificación, determinación de los perfiles de resistencia y caracterización

- Se tomaron 5 muestras de 3 hojas de árboles diferentes (*Ligustrum lucidum*, *Buddleja cordata*, *Ficus elastica*, *Liquidambar styraciflua*, *Ulmus parvifolia*) en cada una de las siguientes zonas de la Ciudad de México: Campus central de CU, Viveros de Coyoacán, 2ª Sección de Chapultepec y alrededores de la Alameda Central.
- Cada muestra fue frotada con un hisopo impregnado de una solución de NaCl + Tween 20 al 0.1%, los cuales fueron colocados en tubos con caldo nutritivo e incubados por 24 horas a 37°C.
- Se realizaron pruebas en caldo nutritivo más antibiótico (ceftazidima y estreptomycin) utilizando la concentración mínima inhibitoria (32µg/mL y 64 µg/mL, respectivamente) establecida en la literatura (28).
- Las cepas que presentaron crecimiento en ambos antibióticos fueron seleccionadas en medios diferenciales y/o selectivos (Agar MacConkey y Manitol Sal Agar) y purificadas en un medio general (Agar Nutritivo).

- Las cepas purificadas se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas convencionales.
- Posteriormente, a las cepas se les realizó un perfil de multirresistencia por el método de Bauer-Kirby (29).
- Así mismo, se realizó un estudio porcentual de resistencia (replica plating) utilizando agar nutritivo más ceftazidima o estreptomina.

Segunda parte: Búsqueda de mecanismos de resistencia

- En primer lugar, se aisló ADN plasmídico por el método de Birnboim y Doly (30).
- A continuación, se estudió cualitativamente la actividad de bombas de expulsión inoculando cada cepa a una concentración de 5×10^6 células/mL en caldo Luria más una cantidad conocida de bromuro de etidio (5-100 $\mu\text{g/mL}$), incubándose por 24 horas y registrándose la presencia o ausencia de crecimiento (29, 30).
- Finalmente, se estudió la actividad de bombas de expulsión cuantitativamente por fluorimetría, empleando de nuevo bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en tubos con caldo nutritivo y crecimiento bacteriano con un valor de 2-2.3 en la escala de McFarland, registrando durante 30 min las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia del bromuro de etidio.

Resultados

Tipo de cepa	Número de cepas aisladas	Porcentaje (%)
Bacilos Gram negativos	12	31
Bacilos Gram positivos	13	33
Cocos Gram positivos	14	36
Total	39	100

Cuadro 1. Número de cepas Gram positivas y Gram negativas aisladas totales.

Durante este estudio se aislaron un total de 39 cepas a partir de las diferentes muestras de hojas. De éstas, 31% (12) fueron bacilos Gram negativos, 33% (13) bacilos Gram positivos y 36% (14) cocos Gram positivos (Cuadro 1).

La relativa homogeneidad entre los porcentajes de los diferentes tipos de bacterias aisladas es visualizada más claramente en la Figura 12.

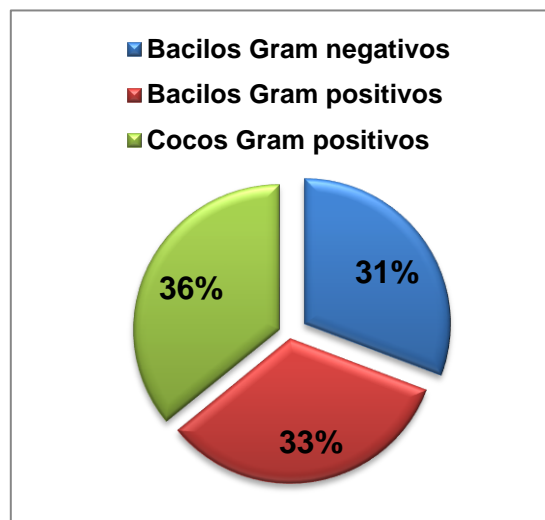


Figura 12. Representación gráfica de la distribución de las bacterias aisladas.

Las cepas fueron aisladas a partir de muestras de hojas tomadas de diferentes árboles que se encontraban en cuatro zonas de la Ciudad de México. El Campus central de CU fue la zona de muestreo de la que se obtuvo un mayor número de cepas aisladas (49%), seguida de la Alameda Central (30%), la 2ª Sección de Chapultepec (12%) y Viveros de Coyoacán (8%) (Figura 13).

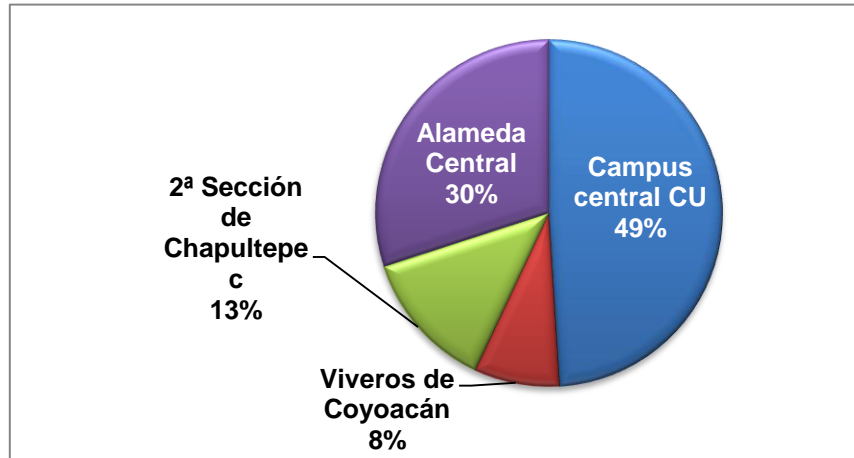


Figura 13. Distribución de las bacterias aisladas por zona de toma de muestra.

Posteriormente, a las cepas se les realizó un perfil de multiresistencia que nos permitió diferenciarlas entre cepas multirresistentes y no multirresistentes. El porcentaje se calculó con base al número total de cepas aisladas ($n=39$), de las cuales 74% resultó resistente a 3 o más antibióticos, un porcentaje importante para bacterias que teóricamente no tienen un contacto directo con antibióticos (Figura 14).

La Figura 17 muestra algunos ejemplos de los resultados obtenidos en los antibiogramas realizados, en los cuales se pueden apreciar los halos de inhibición alrededor de los sensidiscos; la cepa probada se consideró como resistente si el halo tenía un diámetro igual o menor a 15mm.

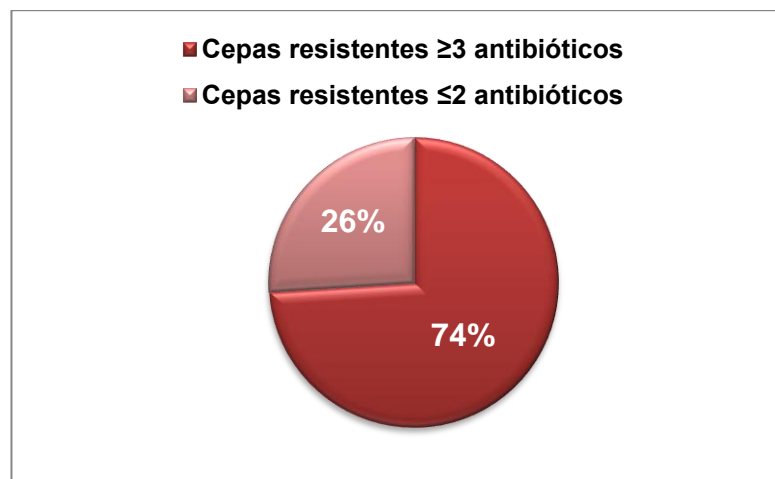


Figura 14. Porcentajes de cepas multirresistentes y no multirresistentes.

Tras obtenerse el número total de cepas multirresistentes se volvió a hacer el análisis estadístico para cada zona de muestreo, considerando solamente el 74% de cepas resistentes a 3 o más antibióticos. El Campus central de CU continuaba dominando el porcentaje de aislamiento (55%), seguido una vez más por la Alameda Central (28%), la 2ª Sección de Chapultepec (14%) y Viveros de Coyoacán (3%) (Figura 15).

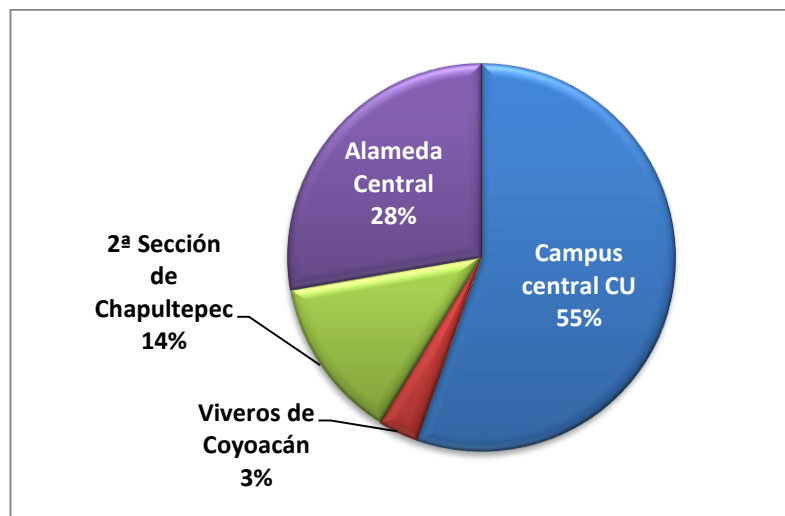


Figura 15. Porcentaje de cepas aisladas multirresistentes por zona de muestreo.

De la misma manera, incluyendo sólo el 74% de cepas multirresistentes, se calculó la distribución por tipo de bacteria aislada que permitió determinar la predominancia de las bacterias Gram positivas con este fenotipo, tanto cocos (48%) como bacilos (42%), y la disminución altamente notoria de los bacilos Gram negativos con tan sólo el 10% de los aislamientos (Figura 16).

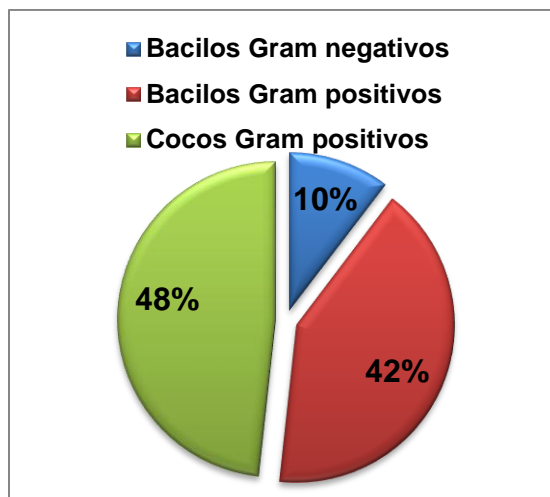


Figura 16. Distribución de las bacterias multirresistentes.

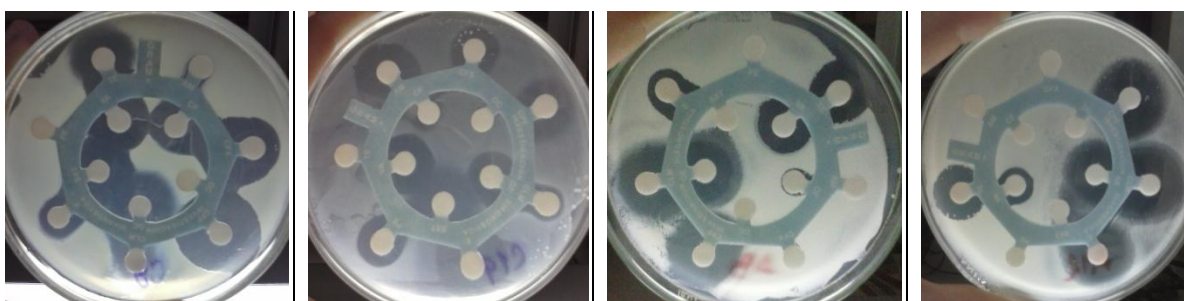


Figura 17. Fotografías correspondientes a cuatro antibiogramas realizados que ejemplifican los resultados encontrados.

Continuando con el estudio se emplearon los cultivos iniciales sin purificación para hacer un estudio poblacional por el método de replica-plating de Lederberg. Los dos antibióticos utilizados en este estudio, ceftazidima y estreptomina, se consideran de uso restringido. En el caso de la estreptomina, la población no resistente (81%) fue mucho mayor a la población resistente (19%), mientras que en el caso de la ceftazidima se dio el resultado contrario, la población resistente (88%) superó por mucho a la no resistente (12%) (Figura 18).

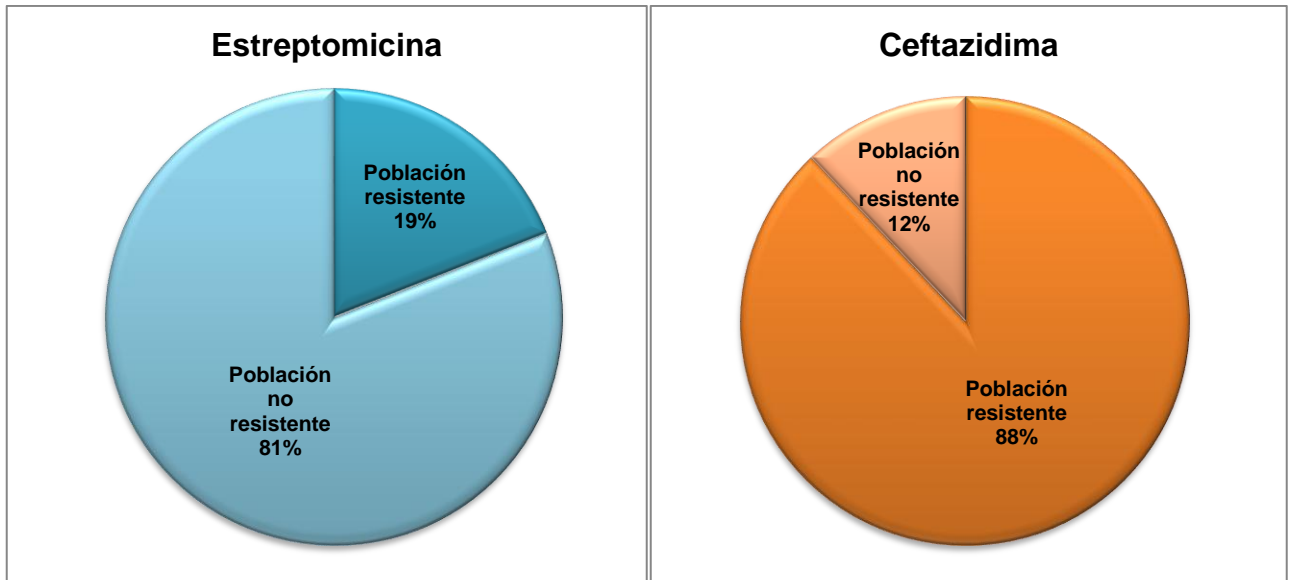


Figura 18. Resultados del estudio de replica plating de Lederberg.

Los antibiogramas realizados permitieron además conocer el número promedio de antibióticos resistidos por cepa y la frecuencia de resistencia por antibiótico.

En el primer caso, la mayoría de las cepas fue resistente a al menos 5 antibióticos y el mayor número registrado fue de 8 antibióticos resistidos. El promedio de resistencia de todas las cepas fue de 6 antibióticos (Figura 19).

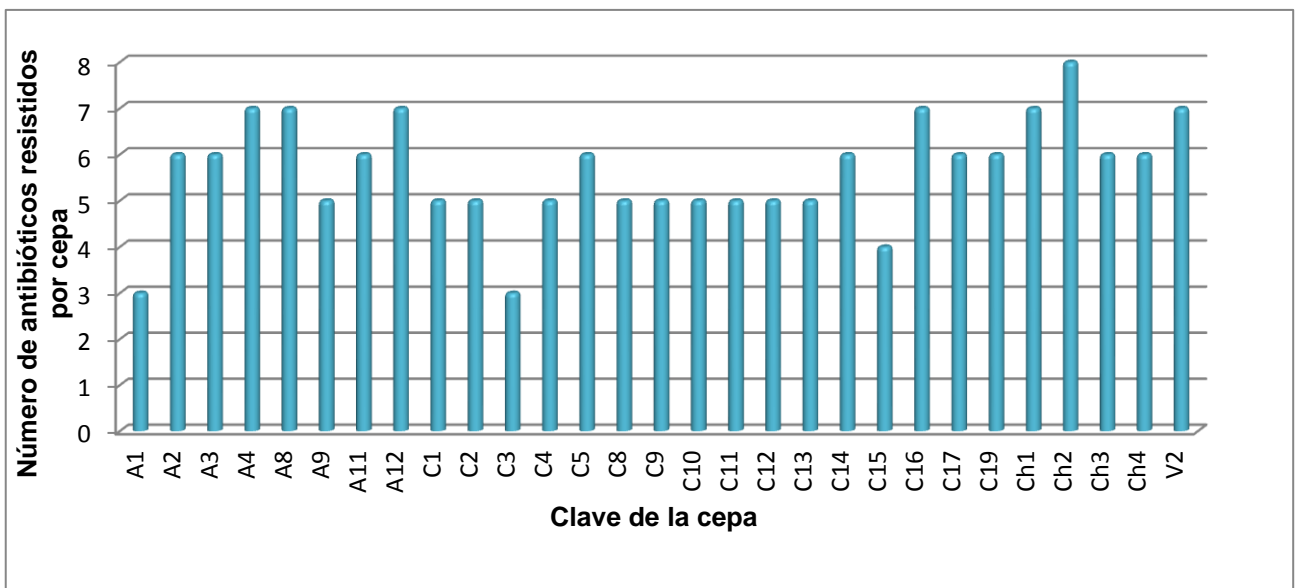


Figura 19. Distribución del número de antibióticos resistidos por cepa probada (Anexo 2).

Por otra parte, en el caso de la frecuencia de resistencia por antibiótico de las cepas Gram positivas se dio al menos 1 caso de resistencia a todos los

antibióticos probados, registrándose una frecuencia superior para PE, DC, CF y CLM (Anexo 1) (Figura 20A), mientras que para las cepas Gram negativas cuatro antibióticos no registraron resistencia, teniéndose la mayor frecuencia para los antibióticos CF, CTX, CB y AM (Figura 20B).

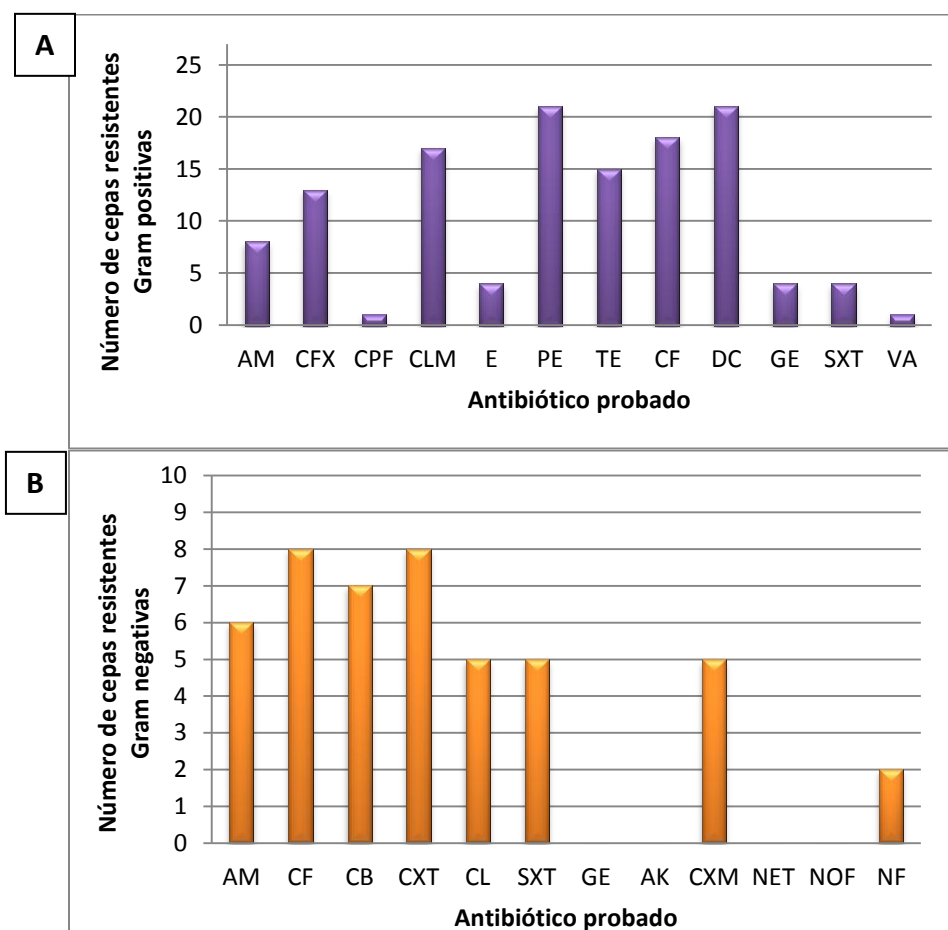


Figura 20.A) Frecuencia de resistencia por antibiótico de las cepas Gram positivas. **B)** Frecuencia de resistencia por antibiótico para cepas Gram negativas.

La segunda parte del estudio se enfocó en la búsqueda de posibles mecanismos de resistencia en las cepas aisladas. Con ese fin se realizó una extracción de ADN plasmídico visualizado a través de electroforesis en gel de agarosa (Fig. 21).

Los carriles Ch2, V2, A12, C19 y A4 corresponden a las cepas multirresistentes seleccionadas con respecto a sus resultados obtenidos en los antibiogramas correspondientes (resistencia a 6 ó 7 antibióticos) y el marcador utilizado fue ADN

del fago λ cortado con Hind III. En todos los carriles se puede apreciar una posible franja de material genético plasmídico.

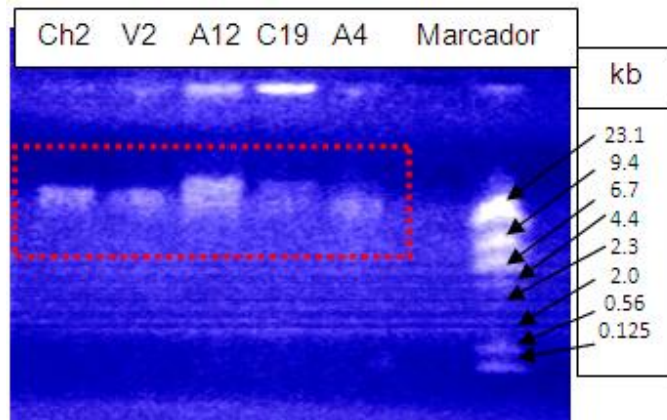


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa.

Para la parte final del estudio, se empleó como cepa control negativa al coco Gram positivo *Staphylococcus aureus* ATCC25923, la cual demostró su sensibilidad a todos los antibióticos probados en el antibiograma realizado (Figura 22).

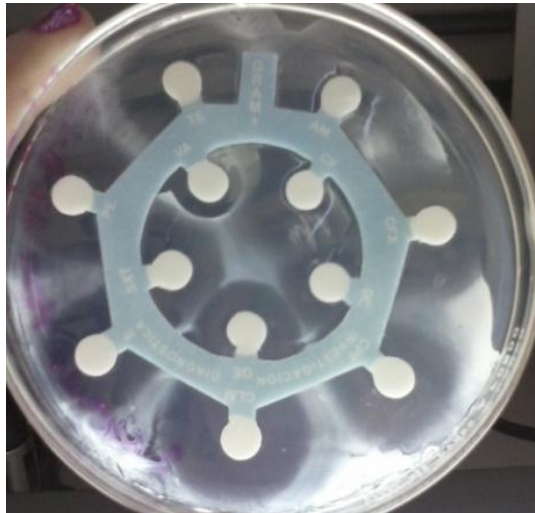


Figura 22. Resultados del antibiograma realizado a la cepa control *S. aureus* ATCC25923.

La búsqueda de actividad de bombas de expulsión se realizó, en primer lugar, mediante una curva cualitativa de resistencia a bromuro de etidio. Todas las cepas estudiadas fueron Gram positivas (las barras azules corresponden a cocos y las barras verdes a bacilos) y se utilizó como control negativo a *Staphylococcus*

aureus ATCC25923. Cada barra representa la concentración máxima de BrEt a la que fue capaz de crecer cada cepa. Todos los cocos Gram positivos fueron capaces de crecer en una concentración de al menos 20µg/mL, mientras que en el caso de los bacilos el crecimiento fue escaso o nulo en la mayoría de las cepas, si bien se registró crecimiento a concentraciones máximas en ambos tipos de bacterias con las cepas C10 y A9. Como se esperaba, *S. aureus* no registró crecimiento (Figura 23).

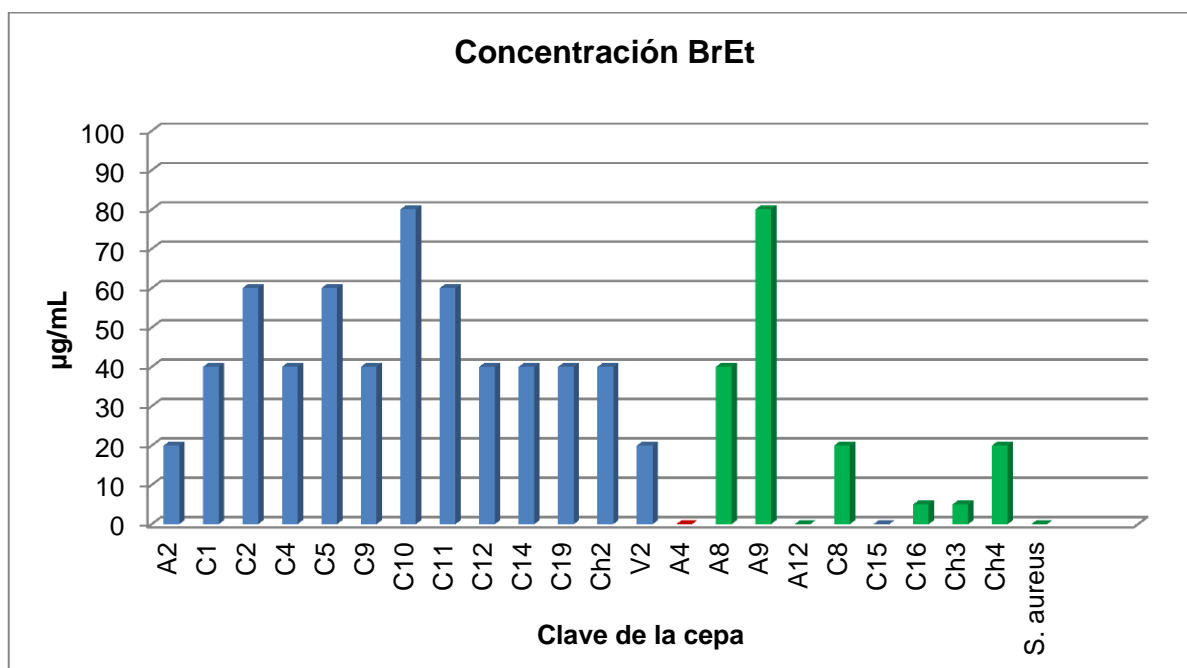


Figura 23. Curva cualitativa de resistencia a bromuro de etidio.

Finalmente, se realizó una curva semi-cuantitativa de expulsión de bromuro de etidio a través del tiempo. Las cepas utilizadas (7+cepa control) fueron escogidas de entre el total de las cepas multirresistentes a partir de los criterios siguientes: ser cocos Gram (+), el resultado de los antibiogramas realizados (mayor multirresistencia) y/o resultado de la curva cualitativa de resistencia a BrEt (crecimiento a mayor concentración). De nuevo se utilizó como control negativo a *S.aureus* ATCC25923, la cual registró la mayor intensidad de fluorescencia. Las cepas estudiadas registraron a lo largo de todo el experimento intensidades de fluorescencia menores a la de la cepa control.

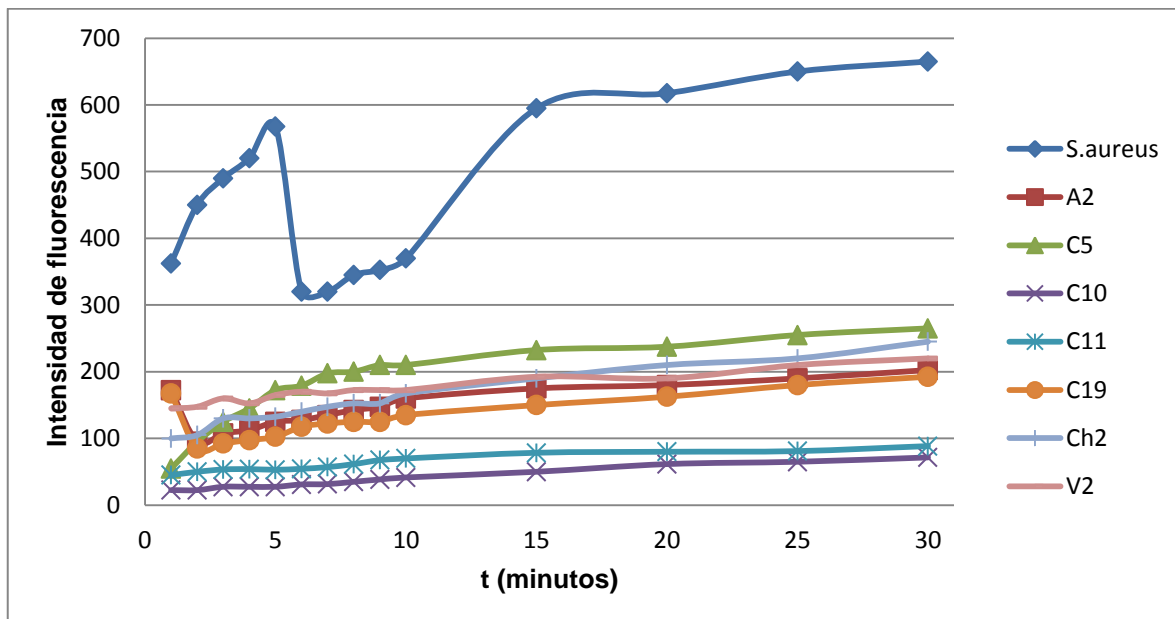


Figura 24. Curva semi-cuantitativa de expulsión de bromuro de etidio a través del tiempo.

Discusión

Se aislaron un total de 39 cepas a partir de un muestreo total de 60 hojas de diferentes árboles en las zonas escogidas del Distrito Federal. De estas cepas, el 69% fueron bacterias Gram positivas (tanto bacilos como cocos) y el 31% pertenecen a Gram negativas (bacilos) (Cuadro 1, Figura 12). Cabe mencionar que éstas cepas podrían no ser representativas de la filósfera mayoritaria de los árboles muestreados, simplemente fueron las cepas capaces de desarrollar en presencia de antibióticos en las condiciones presentes en el laboratorio.

Por zona de muestreo, se observó que el mayor número de cepas aisladas fue a partir de las hojas de árboles pertenecientes al campus central de CU con 49%, siguiéndole la Alameda Central (30%), Chapultepec (13%) y Viveros de Coyoacán (8%) (Figura 13). Al considerar solamente el 74% de las cepas multirresistentes (Figura 14), tanto la predominancia de CU como el orden de los demás porcentajes se mantiene (Figura 15). Para explicar con total claridad esta repartición, se requeriría conocer con exactitud las condiciones en las que crecen los árboles en cada zona, ya que incluso sabiéndose que cada una es muy

concurrida y que en los árboles habita fauna propia (ardillas y aves, principalmente), las condiciones de riego, abono, poda y localización de éstos podrían estar influyendo en la aparición de una mayor población bacteriana cultivable *in vitro*.

Tras la realización de los perfiles de resistencia por el método de Bauer-Kirby (Figura 17), se determinó que del total de cepas aisladas, el 74% de ellas mostró resistencia a 3 o más antibióticos (Figura 14). Entre este último porcentaje el 10% fueron bacilos Gram negativos, 42% bacilos Gram positivos y 48% cocos Gram positivos (Figura 16). Es de considerar la disminución tan marcada entre el porcentaje de bacilos Gram negativos aislados y los que resultaron resistentes a múltiples antibióticos (Figuras 12 y 16).

El proceso de aislamiento requerido para la realización de los perfiles de resistencia necesitó investigar si el fenotipo de multirresistencia era inherente a unas pocas colonias o a la población en general de las bacterias, por lo que se realizó un estudio de replica plating de Lederberg utilizando las muestras totales (muestras iniciales). Al sembrar las muestras en placas con estreptomycinina y ceftazidima (ambos antibióticos son de uso restringido, por lo que se esperaría poca resistencia), se obtuvo como resultado que del total de 16 poblaciones estudiadas, todas eran resistentes a al menos uno de los dos antibióticos utilizados. La ceftazidima tuvo resistencia en 14 de 16 placas estudiadas (88%) mientras que la resistencia a estreptomycinina fue en 3 de 16 placas (19%). Un dato interesante de la ceftazidima (cefalosporina de tercera generación de amplio espectro) es que no se considera como antibiótico de uso generalizado en la clínica (Figura 18).

Tanto las cepas de bacterias Gram positivas como las cepas de bacterias Gram negativas mostraron resistencia a varios grupos de antibióticos utilizados (Figura 20). El fenómeno es más notorio en las primeras debido a un mayor número de cepas probadas. En el caso de las cepas Gram positivas (Figura 20A), las penicilinas (PE y DC) y cefalosporinas (CF y CLM) registraron la mayor resistencia. Para las cepas Gram negativas (Figura 20B) se registró que la mayor

resistencia corresponde a las cefalosporinas (CF, CB, CTX) y la ampicilina (AM), tal como fue el caso de las bacterias Gram positivas. El promedio de multirresistencia por cepa es de 6 antibióticos (Figura 19), un número alto si suponemos que son cepas que, teóricamente, nunca han sido expuestas directamente a ningún antimicrobiano.

Por otra parte, tras comprobar la existencia de bacterias multirresistentes en las hojas de árboles, se continuó el estudio de éstas buscando los posibles mecanismos que les confieren dicha resistencia, centrándonos en dos principalmente: presencia de plásmidos y sobre-expresión de bombas de expulsión.

La extracción de ADN plasmídico se realizó por el método de Birnboim y Doly a las 5 cepas que habían demostrado una mayor multirresistencia (6 ó 7 antibióticos). El electroforegrama mostró la presencia de un posible ADN plasmídico en todas las cepas probadas (Figura 21).

Finalmente se buscó demostrar la sobre-actividad de bombas de expulsión en las células bacterianas a través de dos estudios que emplean al agente citotóxico bromuro de etidio (BrEt) como sustrato.

El primer estudio consistió en la realización de una curva de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de BrEt, en la que se evaluó cualitativamente la capacidad de las cepas de sobrevivir y desarrollarse en la presencia del sustrato, lo cual ayuda a vislumbrar la existencia de un mecanismo encargado de expulsarlo de la célula antes de que se integre al ADN. Los resultados del experimento (Figura 23) muestran crecimiento en presencia de bromuro de etidio (al menos 5µg/mL) en 19 de las 22 cepas estudiadas (sólo fueron tomadas en cuenta para el estudio las bacterias Gram positivas); éstas fueron capaces de continuar su desarrollo a una concentración máxima promedio de 34.1µg/mL de bromuro de etidio. Se utilizó una cepa control (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) sensible a todos los antibióticos (Figura 22), la cual no registró crecimiento a ninguna concentración. Son de resaltar dos cuestiones: la

primera es que las cepas que tuvieron desarrollo a más altas concentraciones (C10, A9, C2, C5 y C11) no corresponden a las de mayor multirresistencia (Figura 21). Además, las cepas con mayor tolerancia a bromuro de etidio correspondieron a cocos Gram positivos (Figura 23).

El segundo experimento consistió en un análisis semi-cuantitativo de expulsión de bromuro de etidio por espectrofluorimetría, haciendo uso de la gran afinidad de esta molécula por el ADN y su habilidad de emitir fluorescencia en presencia de una fuente de excitación al estar unido al material genético. En los resultados de este análisis se puede observar la diferencia entre la curva obtenida para *S. aureus* (cepa control, control negativo) y las cepas de estudio (Figura 24). Con base a la premisa de que mientras menor sea la fluorescencia del BrEt, menor será la intercalación de este sustrato con el ADN y, por consiguiente, mayor es la sobreexpresión de las bombas. Las siete cepas de estudio mostraron, consecuentemente, una alta sobreexpresión de las bombas en comparación con el control utilizado.

Con respecto a resultados individuales y comparativos con el estudio cualitativo (Figura 23), entre las 7 cepas escogidas para el estudio, 3 de ellas registraron crecimiento a mayor concentración de BrEt (C5, C10 y C11); una registró crecimiento menor (A2) y las tres restantes (C19, Ch2 y V2) correspondieron a tres de las cepas de mayor multirresistencia (Figura 21) y que también habían crecido en BrEt (Figura 23), todas ellas cocos Gram positivos. Consistentemente con los resultados cualitativos, C10 y C11 tuvieron los menores niveles de fluorescencia, mientras que las cepas restantes registraron fluorescencia medianamente mayor pero siempre muy por debajo de la cepa control.

Conclusiones

- Entre las bacterias residentes de la filosfera, fue posible encontrar epífitos multirresistentes a antibióticos. De un total de 39 cepas aisladas, 74% de éstas mostraron resistencia a 3 ó más antibióticos, siendo las bacterias Gram positivas las predominantes.
- Los antibióticos a los que las bacterias mostraron mayor resistencia fueron del tipo β -lactámico y cefalosporinas; sin embargo, el fenómeno está presente para la mayoría de las clases de antibióticos.
- La extracción de ADN plasmídico mostró la presencia de plásmidos en las cinco cepas que habían tenido mayor multirresistencia, los cuales podrían estar involucrados en el fenotipo de multirresistencia.
- A través de un estudio tanto cualitativo como cuantitativo con bromuro de etidio, se demostró la sobre-expresión de las bombas de expulsión en las bacterias estudiadas, las cuales también podrían jugar un papel determinante en el fenotipo de multirresistencia.

Perspectivas

Este trabajo se enfocó en el estudio general de la multirresistencia de las bacterias aisladas a partir de la filosfera. Sin embargo, un estudio a profundidad que involucre el conocimiento de los géneros y especies de éstas con base a un muestreo mayor en un número más grande de zonas de la Ciudad de México, así como un análisis detallado que lleve a la identificación de las bombas de expulsión y tipo de plásmidos por técnicas de metagenómica sería uno de los siguientes pasos a realizar para establecer la metodología adecuada antes de escalar el estudio.

Referencias

1. Hamad, B. The antibiotics market. *Nature Rev.* **9**, 675-676 (2010).
2. Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417-433 (2010).
3. Editorial. Standing up to antimicrobial resistance. *Nature Rev.* **8**, 836 (2010).
4. Antibiotic Resistance Genes Database, <http://ardb.cbcb.umd.edu/>
5. Moellering, R. NDM-1 — A cause for worldwide concern, *N Engl J Med.* **363**, 2377-2379 (2010).
6. Livermore, D. Introduction: the challenge of multiresistance. *Int J Antimicrob Agents.* **29**, S1–S7 (2007).
7. Wright, G. & Sutherland, A. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *TRENDS Mol Med.* **13**, 261-267 (2007).
8. Acar, J.; Cassell G.; Cohen, M.; *et al.* Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *N Engl J Med.* **330**, 1247-1251 (1994).
9. White, D.; Zhao, S.; Sudler, R.; *et al.* The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N Engl J Med.* **345**, 1147-1154 (2001).
10. Ready, D.; Lancaster, H.; Mullany, P.; *et al.* Antibiotic resistance in the cultivable plaque microbiota of children from different ethnic groups. *Int J Antimicrob Agents.* **27**, 376–382 (2006).
11. Madigan, M.; Martinko, J.; Dunlap, P.; *et al.* Brock, biología de los microorganismos. 12^a Edición. Editorial Pearson. 331-336, 399, 883-888, (2009).
12. Dr. José Molina López, Drogas antibacterianas, <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html>
13. Tafur, J.; Torres, J. & Villegas, M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infect.* **12**, 56-63 (2008).
14. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 119–146 (2009).
15. Alekshun, M. & Levy, S. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* **128**, 1037-1050 (2007).
16. Arias, C. & Murray, B. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Rev.* **10**, 266-278 (2012).
17. Borges-Walmsley, M.; McKeegan, K. & Walmsley, A. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* **376**, 313–338 (2003).
18. Piddock, L. Multidrug-resistance efflux pumps— not just for resistance. *Nature Rev.* **4**, 629-636 (2006).
19. Gardner, E.; Simmons, M. & Snustad, D. Principios de genética. 4^a Edición. Editorial Limusa Wiley. 208-215 (1998).
20. <http://www.addgene.org/static/cms/images/PlasmidMap.png>
21. <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/grupod/Mutacion/mutacion.html>
22. Fluit, A. & Schmitz, F. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* **10**, 272–288 (2004).

23. Mazel, D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Rev.* **4**, 608-620 (2006)
24. Vorholt, J. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Rev.* **10**, 828-840 (2012).
25. Lindow, S. & Brandl, M. Microbiology of the Phyllosphere. *App Enviromn Microb.* **69**, 1875–1883 (2003).
26. Hirano, S. & Upper, C. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microb Mol Biol Rev.* **64**, 624–653 (2000).
27. Lederberg, J. & Lederberg, E. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **63**, 399-406 (1951).
28. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2012.
29. Bauer, A., Perry, D. & Kirby, W. Single-disk antibiotic-sensitivity testing of *Staphylococci*, and analysis of technique and results. *AMA Arch Intern Med.* **104**, 208-216 (1959).
30. Birnboim, H. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1514-1523 (1979).
31. Zechini, B. & Versace, I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. *Drug Discovery.* **4**, 37-50 (2009).
32. Kaatz, G.; Seo, S.; O'Brien, L.; *et al.* Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**, 1404–1406 (2000).

Anexos

Anexo 1. Relación de las claves de las cepas multirresistentes con su morfología y Gram.

Clave de cepa	Morfología	Gram	Clave de cepa	Morfología	Gram
A1	Bacilo	(-)	Ch2	Coco	(+)
A2	Coco	(+)	Ch3	Bacilo	(+)
A3	Bacilo	(+)	Ch4	Bacilo	(+)
A4	Bacilo	(+)	V2	Coco	(+)
A8	Bacilo	(+)			
A9	Bacilo	(+)			
A11	Bacilo	(-)			
A12	Bacilo	(+)			
C1	Coco	(+)			
C2	Coco	(+)			
C3	Coco	(+)			
C4	Coco	(+)			
C5	Coco	(+)			
C8	Bacilo	(+)			
C9	Coco	(+)			
C10	Coco	(+)			
C11	Coco	(+)			
C12	Coco	(+)			
C13	Bacilo	(+)			
C14	Coco	(+)			
C15	Bacilo	(+)			
C16	Bacilo	(+)			
C17	Bacilo	(-)			
C19	Coco	(+)			
Ch1	Bacilo	(+)			

Anexo 2. Relación del nombre de los antibióticos empleados con su abreviatura.

Multidiscos cepas Gram (+)		Multidiscos cepas Gram (-)	
Abreviatura	Nombre	Abreviatura	Nombre
AM	Ampicilina	AM	Ampicilina
CFX	Cefotaxima	CF	Cefalotina
CPF	Ciprofloxacina	CB	Carbenicilina
CLM	Clindamicina	CTX	Ceftriaxona
E	Eritromicina	CL	Cloranfenicol
PE	Penicilina	SXT	Sulfametoxasol/ Trimetroprim
TE	Tetraciclina	GE	Gentamicina
CF	Cefalotina	AK	Amikacina
DC	Dicloxacilina	CXM	Cefuroxima
GE	Gentamicina	NET	Netilmicina
SXT	Sulfametoxasol/ Trimetroprim	NOF	Norfloxacina
VA	Vancomicina	NF	Nitrofurantoína